

SEP

DGEST

DITD



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE ATLIXCO

Organismo Público Descentralizado del Gobierno del Estado de Puebla

ANÁLISIS DEL EFECTO DE *TOURNEFORTIA HIRSUTISSIMA L.* COMO ANTIMICROBIANO.

OPCIÓN I.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO BIOQUIMICO

PRESENTA:

FREDDY RAMÍREZ ZARATE

**ASESOR: M.T.A. GUADALUPE GABRIELA BÁRCENA
VICUÑA.**

ATLIXCO, PUE. FEBRERO 2020

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres (Efraín y Carmen), a mis hermanos (Mariwvey, Ariana, Asael, Fray y Jorge), y a mi abuela que desde el cielo me ha guiado y cuidado (Taide Morales Sarmiento).

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a Dios por haberme dado unos padres maravillosos, quienes, a pesar de no tener estudios superiores, fueron dotados de sabiduría divina, tanto que nunca terminare de aprender de sus sabios e invaluable consejos, pues gracias a ellos todas mis metas, anhelos y sueños los he podido realizar. Gracias Carmen y Efraín.

Gracias a todos los integrantes de mi familia, mi abuela Taide, mis tíos, Lucas, Isabel.... Gracias por enseñarme a dar todo sin pedir nada a cambio... nunca los olvidare.

Gracias a mis asesora de tesis la M.T.A. Guadalupe Gabriela Bárcena Vicuña, por su esfuerzo y dedicación. Sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su persistencia, su paciencia y su motivación han sido fundamental para este trabajo de investigación.

TABLA DE CONTENIDO	PAGS
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
1.1 JUSTIFICACIÓN.....	2
1.2 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.3 HIPÓTESIS.....	5
1.4 ALCANCES.....	6
capítulo 2 ANTECEDENTES.....	7
2.1 PLANTA DE TLACHICHINOLE.....	7
2.2 HÁBITAT Y CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DEL TLACHICHINOLE.....	8
2.3 USOS MEDICINALES.....	9
2.4 EXTRACTOS VEGETALES.....	9
2.4.1 CONSERVACIÓN DE LOS EXTRACTOS	9
2.5 Métodos de extracción	10
2.5.1 MACERACIÓN	10
2.5.1.1 MACERACIÓN EN FRÍO	10
2.5.1.2 MACERACIÓN CON CALOR	11
2.6 DESTILACIÓN AL VACÍO	11
2.7 PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DEL ROTAVAPOR	12
2.8 SOLVENTES	14
2.8.1 QUE ES UN DISOLVENTE.....	14
2.8.2 TOXICIDAD.....	15
2.8.3 ETANOL.....	15
2.8.4 METANOL	16
2.8.5 BENCENO.....	17
2.8.6 DIMETILSULFOXIDO (D.M.S.O.).....	19
2.8.6.1 TOXICIDAD EN SERES HUMANOS.....	19
2.9 Antibióticos	20
2.9.1 AMPICILINA	20

2.9.2 NISTATINA	21
2.9.3 DICLOXACILINA.....	21
2.9.4 RESISTENCIA BACTERIANA	22
2.10 Microorganismos.....	23
2.10.1 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS	24
2.10.2 CEPAS BACTERIAS.....	24
2.10.2.1 Staphylococcus aureus	24
2.10.2.2 Pseudomona aeruginosa.....	25
2.10.2.3 Candida albicans.....	26
2.10.2.4 Escherichia coli	27
2.10.3 MÉTODOS DE ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS	27
2.10.3.1 ESTERILIZACIÓN POR CALOR	28
2.10.3.2 RADIACIÓN ULTRAVIOLETA.....	28
2.11 Antibiograma.....	29
2.11.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR	29
CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA.....	31
3.1 Localización	31
3.2 RECOLECCIÓN DE MATERIA VEGETAL	31
3.3 TRATAMIENTO DE LA MATERIA VEGETAL	32
3.4 MACERACIÓN	32
3.5 DESTILACIÓN	32
3.6 MICROORGANISMOS	35
3.6.1 CEPAS	35
3.6.2 RECUPERACIÓN DE MRICOORGANISMOS.....	35
3.7 ENSAYOS BIOLÓGICOS.....	36
3.7.1 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	36
3.7.2 TÉCNICA DE DIFUSIÓN DE DISCO EN AGAR.....	37
RESULTADOS	40
DISCUSIÓN	52
Conclusiones.....	52
PERSPECTIVAS.....	53
GLOSARIO.....	54
ANEXO 1.....	55

ANEXO 2.....	56
ANEXO 3.....	57
ANEXO 4.....	58
ÍNDICE DE FIGURAS	59
ÍNDICE DE TABLAS	60
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	61
Referencias	62

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo tiene la finalidad de conocer el efecto antimicrobiano que tiene el extracto de *Turnefortia hirsutissima L.* ante diferentes cepas bacterianas. El uso de extractos vegetales actualmente se considera como una referencia indispensable para determinar la calidad especialmente cuando van a ser empleadas en medicamentos fisioterapéuticos o especialidades farmacéuticas. Ya que en la actualidad se están enfocando técnicas principalmente a la conservación del medio ambiente y evitando la contaminación, es por eso que se requieren nuevas alternativas para minimizar costos.

La fitoterapia es el nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas. A principio de este siglo, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica desembocaron en la puesta en marcha, por parte de la industria farmacéutica, de una nueva producción de medicamentos. Para la fabricación de muchos de ellos utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales. [1]

La actividad biológica de una planta depende en primer lugar del principio o principios activos mayoritarios que contiene, pero éstos suelen estar acompañados de otros principios que potencian o modulan la acción de los primeros; la proporción en la que se encuentran unos de otros es muy variables. [2]

CAPÍTULO I PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La planta *Tournefortia hirsutissima* L. contiene componentes químicos con efectos medicinales y antimicrobianos que no han sido aprovechados ni aprobados mediante un proceso químico-biológico, con esto se estaría aprovechando a una planta que crece abundantemente.

1.1 JUSTIFICACIÓN

Actualmente se tiene conocimiento que las plantas medicinales han abarcado un mercado amplio, puesto que en los últimos años el ser humano ha vuelto a utilizar plantas para poder curar algunos síntomas o calmar ciertas enfermedades que los aquejan.

Investigando en diversas bibliografías se indago que el tlachichinole (*Tournefortia hirsutissima* L). Es una planta que posee efectos medicinales tales como el tratamiento de las rozaduras y para la inflamación del vientre ya que es una planta medicinal que tiene la característica de ser fresca.

Con dicho trabajo se pretende evaluar más acerca de dicha planta y comprobar su efectividad antimicrobiana.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de *Tournefortia hirsutissima* L frente a los microorganismos patógenos *Staphylococcus aureus* ATCC6538, *Pseudomona aeruginosa* ATCC27853, *Candida albicans* ATCC10231 y *Escherichia coli* ATCC 11229 y ATCC 25922.

1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Obtención de extractos con diferentes solventes mediante procesos de maceración
- ❖ Determinar la CMI.
- ❖ Realizar análisis estadísticos.
- ❖

1.3 HIPÓTESIS

La acción de *Tournefortia hirsutissima* L. contra las cepas bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans* y *Escherichia coli* ATTCC 11229 y ATTCC 25922). Presentará inhibición microbiana.

1.4 ALCANCES

En este proyecto se busca aprovechar los componentes en *Tournefortia hirsutissima* L. Ya que se ha utilizado de manera tradicional con ciertos beneficios, por lo tanto, se pretende obtener extractos y aceite esencial para realizar análisis microbiológicos y fisicoquímicos para de esta manera comprobar su efecto antimicrobiano.

CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen.

Los remedios a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre sí, de forma que en general no se acumulan en el organismo, y sus efectos indeseables están limitados. Sin embargo, a pesar de que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades.

2.1 PLANTA DE TLACHICHINOLE

El tlachichinole (*Tournefortia hirsutissima L.*). Es una hierba quemada, ahumada y cenicienta, de tlachichin, quemadura, quemarse. El significado de tlachichinole puede referirse a su aspecto y a los cambios de color de sus tallos, ya que inicialmente al crecer tiene un tallo negrito, luego va cambiando hasta tornarse de color verde, después, a los dos o tres años, el color del tallo adquiere un tono gris-blanco o ceniciento, es decir, como si fuese sido quemado por una fogata. [3]



Figura 1. Plantas de tlachichinole (*Tournefortia hirsutissima* L). Nayeli Manzano, 2011.

2.2 HÁBITAT Y CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DEL TLACHICHINOLE.

Su clima debe ser cálido y un poco húmedo se reproduce en tierra de tipo barro negro o tierras arenosas, puede crecer entre la hierba o también en zonas totalmente libres de hierba y también crece en los sembradíos; en los lugares donde no se hace ningún tipo de agricultura es muy difícil que crezca y no es fácil encontrarlo por lo regular necesita estar hidratada ya que es una planta que ayuda a refrescar y necesita suficiente agua para estar viva. En época de lluvias es más frecuente encontrar el tlachichinole principalmente en cerros o en lugares donde todavía no está muy poblado.

La planta de tlachichinole es de color verdoso y llega a medir unos dos metros de altura según el lugar y el tipo de tierra donde se encuentre el tlachichinole cuando alcanza su madurez sus hojas se vuelven muy rígidas, muy rasposas de color verde oscuro desarrolla una flor color blanco y una semilla blanda de color blanquizco y lechosa, en algunos lugares en donde hay mucha humedad y es muy fértil la tierra el tlachichinole se vuelve frondoso y llega a expandirse varios metros a la redonda esto es solo en algunos lugares pero por lo regular solo crece poco y no se esparce mucho

porque hoy en día casi no hay lugar para que pueda crecer y por otro lado los depredadores como la plaga del chapulín de temporal se la come y es como una plaga que termina siendo muy dañina para esta magnífica planta. [4]

2.3 USOS MEDICINALES

Se usa principalmente para el tratamiento de las rozaduras y para la inflamación del vientre ya que es una planta medicinal que tiene la característica de ser fresca. [3]

2.4 EXTRACTOS VEGETALES

Los extractos vegetales son las sustancias que se obtiene de hojas, tallos, flores o semillas, según sea la parte que contiene el ingrediente activo que actúa contra insectos, hongos, nematodos. Para obtener el extracto vegetal, en algunos casos se macera (muele o machaca) la parte seleccionada, pero lo más común es la cocción o la infusión (como hacer un té), al que se agrega generalmente alcohol como agente extractor.

Existen plantas que pueden utilizarse, pero es importante tener en cuenta que la concentración de las sustancias activas que actúan sobre insectos, hongos, nematodos, pueden también tener efecto sobre las personas, por lo tanto, se debe tomar precauciones ya sea a la hora de preparación, así como al momento de su aplicación. [5]

2.4.1 CONSERVACIÓN DE LOS EXTRACTOS

Los extractos son medicamentos naturales en donde la alteración modifica y varía notoriamente la naturaleza del producto. Algunos extractos se descomponen al aire, otros absorben humedad atmosférica. Algunos se recubren de hongos y permiten el desarrollo de gérmenes bacterianos. Por otra parte, las alteraciones más frecuentes consisten en modificaciones químicas no aparentes como sucede con los extractos de flores verdes que por la oxidación de la clorofila pierden su color.

Según Corpas y Barriga (1993), la conservación de los extractos es indispensable y debe cumplir las siguientes condiciones:

- a. Se deben conservar protegiéndolos de la luz.
- b. Los envases deben estar bien tapados.
- c. Se deben conservar en un ambiente seco. [5]

2.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Las extracciones se pueden hacer por “extracción continua en soxhlet”, en la cual el material seco se sitúa en una cámara central y el solvente se hace vapor en caliente, en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal. Por “reflujo”, el material vegetal y el solvente se colocan en un balón el cual tiene acoplado un refrigerante, se calienta, el solvente evaporado se condensa y vuelve a mezclarse con el material vegetal. Y por “maceración en frío”, el material se mezcla con el solvente triturando constantemente en frío. [6]

2.5.1 MACERACIÓN

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. El proceso de maceración genera dos productos que pueden ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto. La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada, así como del líquido de extracción. Existen dos métodos de maceración de acuerdo a la temperatura, caliente y frío. [7]

2.5.1.1 MACERACIÓN EN FRÍO

Consiste en sumergir el producto a macerar en un recipiente con la cantidad suficiente de solvente para cubrir totalmente lo que se desea macerar. Esto se lleva a cabo por un lapso de tiempo largo, dependiendo de la materia prima que se vaya a macerar.

Las ventajas de la maceración en frío consisten en la utilización de equipos simples que requieren mínimas cantidades de energía y en la capacidad de extraer la mayoría de las propiedades de lo que se macera, prácticamente en su totalidad sin alterarla por efectos de temperatura. Sin embargo, se necesitan periodos de tiempo mucho más extensos para lograr una extracción adecuada. [6]

2.5.1.2 MACERACIÓN CON CALOR

Este proceso consiste en el contacto entre las fases, el producto a macerar y el solvente; con la diferencia de la variación en la temperatura, en este caso pueden variar las condiciones de la maceración. El tiempo que se desea macerar varía mucho de la maceración en frío ya que al utilizar calor se acelera el proceso.

La desventaja de la maceración en calor es que no logra extraer totalmente pura la esencia del producto, ya que regularmente destruye algunas propiedades, es decir, muchas veces se trata de compuestos termolábiles que se ven afectados por la temperatura, además de requerir equipos más sofisticados que permitan el control de la temperatura. [8]

2.6 DESTILACIÓN AL VACÍO

Un líquido entra en ebullición cuando al calentarlo su presión de vapor se iguala a la presión atmosférica. En una destilación a vacío la presión en el interior del equipo se hace menor a la atmosférica con el objeto de que los componentes de la mezcla a separar destilen a una temperatura inferior a su punto de ebullición normal. Una destilación a vacío se puede realizar tanto con un equipo de destilación sencilla como con un equipo de destilación fraccionada. Para ello, cualquiera de los dos equipos herméticamente cerrado se conecta a un sistema de vacío -trampa de agua o bomba de vacío de membrana o aceite- a través de la salida lateral del tubo colector acodado. La destilación a vacío se utiliza para destilar a una temperatura razonablemente baja, productos muy poco volátiles o para destilar sustancias que descomponen cuando se

calientan a temperaturas cercanas a su punto de ebullición normal. Un tipo de destilación a vacío muy utilizado en un laboratorio químico es la evaporación rotatoria. Este tipo de destilación se realiza en equipos compactos comerciales denominados genéricamente rotavapores y se usa para eliminar con rapidez el disolvente de una disolución en la que se encuentra presente un soluto volátil habitualmente a temperaturas próximas a la temperatura ambiente, con lo que se minimiza el riesgo de descomposición del producto de interés que queda en el matraz de destilación. [9]

A continuación, se muestra un esquema de un rotavapor típico.



Figura 2. Rotavapor (Anónimo, 2014).

2.7 PRINCIPIO DE FUNCIONAMIENTO DEL ROTAVAPOR

En un Rotavapor, se llevan a cabo destilaciones de una sola etapa de forma rápida con el producto. La base de este método es la evaporación y la condensación de disolventes utilizando un matraz evaporador rotativo bajo vacío. Destilar productos bajo vacío incrementa el rendimiento y ayuda a proteger los productos.

Se puede alcanzar un nivel de vacío estable en combinación con un controlador de vacío y una bomba de vacío. El vacío también elimina emisiones de vapores no

deseadas o peligrosas durante el proceso y es un importante elemento de seguridad. La presión baja disminuye el punto de ebullición del medio dentro del Rotavapor. Esto permite tratar el producto con delicadeza incluso con un rendimiento de evaporación superior comparado con el manejo a presión ambiental. [10]

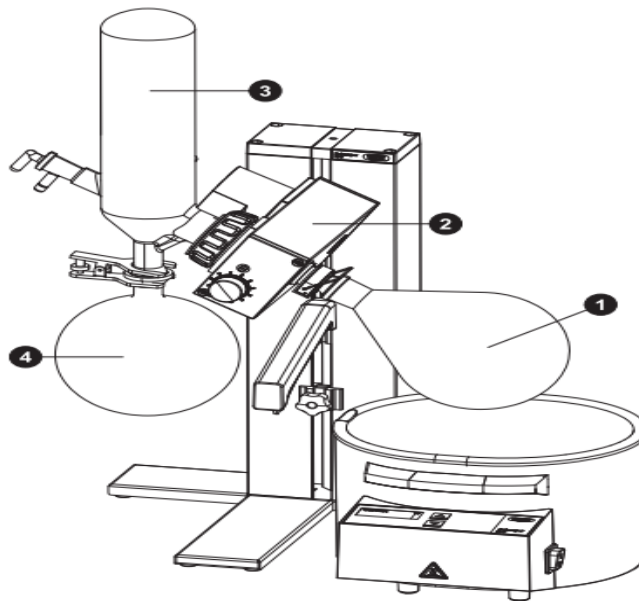


Figura 3. Partes del rotavapor (Anónimo, 2013).

1.- Superficie de evaporación: El disolvente se calienta por medio de un baño calefactor. Con los líquidos, la mezcla turbulenta dentro del matrazo de evaporación rotativo da lugar a un rango de evaporación incrementada. La rotación también previene un sobrecalentamiento local de la mezcla y la vibración.

2.- Accionamiento de rotación con conducto de vapor incluido: La unidad de accionamiento garantiza que el matrazo de evaporación rote de forma uniforme. El conducto de vapor integrado transporta el vapor desde la superficie de evaporación hasta la de refrigeración.

3.- Superficie de refrigeración: Del vapor del disolvente fluye muy rápidamente hacia dentro del condensador. Allí, la energía del vapor de disolvente se transfiere al refrigerante (agua, en la mayoría de los casos), de forma que se condensa el disolvente.

4.- Matraz receptor: El matraz receptor recoge el disolvente condensado.

2.8 SOLVENTES

Son compuestos basados en el elemento químico Carbono. Ellos producen efectos similares a los del alcohol o al de los anestésicos. Estos efectos se producen a través de la inhalación de sus vapores. El sector industrial que emplea este tipo de productos es muy amplio. Cabe destacar la fabricación de automóviles, fibras artificiales, pinturas, barnices y similares, papel, tintas, vidrio, poliuretanos, piel artificial, electrodomésticos, laminados metálicos, lubricantes, aditivos, resinas y pigmentos, a lo que se debe añadir el sector del transporte y distribución de disolventes, la industria farmacéutica y laboratorios, procesos de impresión y artes gráficas, talleres de reparación de vehículos, industria química en general, centros de gestión de residuos municipales como puntos limpios o similares, etc. [11]

2.8.1 QUE ES UN DISOLVENTE

Los disolventes orgánicos son sustancias que a temperatura ambiente se encuentran en estado líquido y pueden desprender vapores, por lo que la vía de intoxicación más frecuente es la inhalatoria, aunque también se puede producir por vía digestiva y cutánea. Algunos de ellos tienen aplicaciones industriales como son pegamentos, pinturas, barnices y fluidos de limpieza. Otros son utilizados como gases en aerosoles, extinguidores de fuego o encendedores para cigarrillos.

El término disolvente significa “material usado para disolver otro material” e incluye sistemas acuosos y no acuosos.

Los sistemas acuosos son aquellos que tienen como base al agua; como ejemplos tenemos soluciones acuosas de ácidos, álcalis, detergentes y otras sustancias. [11]

2.8.2 TOXICIDAD

La toxicidad de una sustancia química se refiere a la capacidad de causar daño en un órgano determinado, alterar los procesos bioquímicos o alterar un sistema enzimático.

Todas las sustancias, naturales o sintéticas, son tóxicas, es decir que producen efectos adversos para la salud en alguna condición de exposición. Es incorrecto denominar algunas sustancias químicas como tóxicas y otras como no tóxicas. Las sustancias difieren grandemente en su toxicidad. Las condiciones de exposición y la dosis son factores que determinan los efectos tóxicos. Entre algunas sustancias tóxicas se encuentra el etanol, metanol y benceno. [11]

2.8.3 ETANOL

El etanol se obtiene de la fermentación del almidón (u otro carbohidrato) y por hidratación del etano.

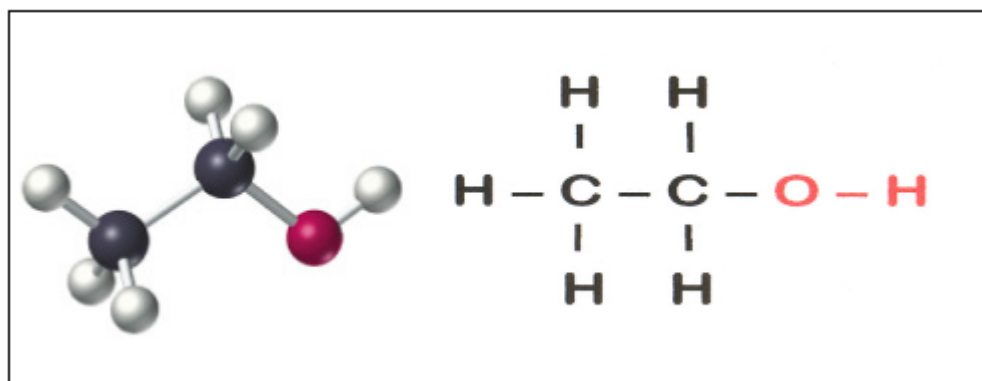


Figura 4. Modelo del etanol (Anónima, 2015).

El etanol es un alcohol alifático importante. En la industria se emplea en su forma desnaturalizada. Se metaboliza rápidamente, convirtiéndose principalmente en dióxido de carbono y es el menos tóxico de los alcoholes. Cualquier acción tóxica puede ser atribuible con mayor posibilidad a los desnaturalizantes.

El etanol afecta principalmente al Sistema Nervioso Central, produciendo deterioro del nivel de consciencia, convulsiones y coma. La dosis tóxica es de 10-30 ml, considerándose potencialmente letal una dosis de 60-240 ml; los niveles plasmáticos tóxicos son superiores a 0.2 g/L, y potencialmente mortales los que superan 1 g/L.

En pequeñas cantidades de alcohol estimulan, cantidades mayores, deprimen y una sobredosis puede provocar pérdida del conocimiento y en algunos casos la muerte [12]. El etanol mata las bacterias, primero, al hacer que los lípidos que forman parte de la membrana protectora celular externo de cada célula bacteriana sean más solubles en agua, de modo que la membrana celular comienza a perder su integridad estructural y se deshace. [13]

2.8.4 METANOL

El metanol (CH_3OH) es un líquido incoloro y volátil a temperatura ambiente. Por sí mismo es inofensivo, pero sus metabolitos son tóxicos. El metanol se prepara por hidrogenación catalítica del monóxido de carbono y algún día podrá remplazar a la gasolina y al gas natural como combustible debido a que puede obtenerse del carbón. Tiene una amplia utilización industrial como disolvente, utilizándose en la fabricación de plásticos, material fotográfico, componente de la gasolina, anticongelantes, líquido limpia cristales, líquido para fotocopias, limpiadores del hogar, etc. La intoxicación se produce generalmente por ingesta accidental o intencionada. También se han dado casos de intoxicación por adulteración de bebidas alcohólicas.

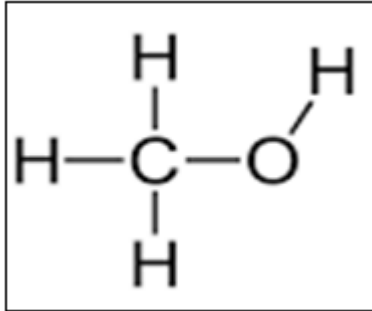


Figura 5. Estructura del metanol (Anónima, 2015).

El metanol afecta principalmente al Sistema Nervioso Central, produciendo deterioro del nivel de consciencia, convulsiones y coma. La dosis tóxica es de 10-30 ml, considerándose potencialmente letal una dosis de 60-240 ml; los niveles plasmáticos tóxicos son superiores a 0.2 g/l, y potencialmente mortales los que superan 1 g/l. [14]

Las bacterias, primero, al hacer que los lípidos que forman parte de la membrana protectora celular externo de cada célula bacteriana sean más solubles en agua, de modo que la membrana celular comienza a perder su integridad estructural y se deshace. A medida que la membrana de la célula se desintegra, el alcohol puede entrar en las proteínas celulares y desnaturalizar las proteínas que se encuentran dentro de cada bacteria. [13]

2.8.5 BENCENO

El benceno es un líquido claro ampliamente usado en la industria química, en la industria del calzado, como disolvente y en la fabricación de detergentes, explosivos, pinturas, barnices y plásticos. Es muy volátil e inflamable y presenta un intenso olor dulzón. Estas moléculas están generalmente caracterizadas por uno o más anillos de seis carbonos.

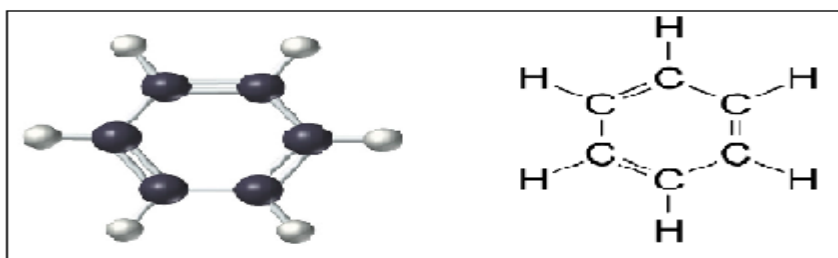


Figura 6. Estructura del benceno (Anónima, 2015).

Las reacciones de sustitución aromática del benceno dan lugar a una amplia variedad de productos útiles.

Se absorbe bien por vía respiratoria y digestiva, siendo escasa su absorción a través de la piel. Es muy liposoluble, por lo que se acumula con facilidad en el tejido graso, incluida la médula ósea. La mayor parte de la dosis absorbida se elimina en las primeras 48 horas tras la exposición. Más del 50% de la misma se excreta sin transformar por el pulmón, metabolizándose el resto a nivel hepático a través del sistema citocromo. [15]

El benceno produce alteraciones en la sangre. La gente que respira benceno durante períodos prolongados puede sufrir daño de los tejidos que producen las células de la sangre, especialmente la médula de los huesos. Estos efectos pueden interrumpir la producción de elementos de la sangre y producir una disminución de algunos componentes importantes de la sangre. Una disminución de los glóbulos rojos puede conducir a anemia. La reducción de otros componentes de la sangre puede causar hemorragias. La producción de elementos de la sangre puede normalizarse después que la exposición al benceno termina. La exposición excesiva al benceno puede ser perjudicial para el sistema inmunitario, aumentando las probabilidades de contraer infecciones y posiblemente disminuyendo las defensas del cuerpo contra el cáncer [11]. El benceno también mata las bacterias, pero no tiene el mismo resultado que los alcoholes. [16]

2.8.6 DIMETILSULFOXIDO (D.M.S.O.)

El DMSO es un compuesto químico es el miembro más simple del grupo de los alquil sulfoxidos, de formula química $\text{CH}_3\text{-SO-CH}_3$. Es un líquido orgánico oleoso, incoloro, de ligero olor azufrado y de sabor ligeramente amargo. Tiene un peso molecular de 78.13, punto de fusión 18.4°C y punto de ebullición $188\text{-}190^\circ\text{C}$.

Es higroscópico y altamente polar. El DMSO es miscible en agua en todas las proporciones es un solvente capaz de disolver numerosos compuestos orgánicos. En la industria se emplea principalmente como: 1) solvente de resinas, fibras sintéticas, pesticidas, colorantes, 2) solvente catalizador de reacciones, 3) solvente de reactantes y facilitadores de reacciones, 4) reactante químico en síntesis de compuestos. Tiene otras propiedades tales como anti-congelante, capacidad dispersante.

En biología, el DMSO centró su atención desde un comienzo por su extraordinaria propiedad de atravesar membranas orgánicas portando consigo otras sustancias en disolución, sin dañar la integridad de la membrana. También se emplea experimentalmente en la agricultura como solvente y portador de insecticidas antibióticos y pesticidas. [17]

2.8.6.1 TOXICIDAD EN SERES HUMANOS

En seres humanos el dimetilsulfóxido en concentraciones del 90 al 100 % y en dosis de 15 a 60 ml, al día ha sido bien tolerado. La aplicación tópica del DMSO, en concentraciones altas, produce en la zona tratada sensación de calor, eritema y edema ligero, prurito y rara veces urticaria local. Estos síntomas alcanzan el máximo en 10 a 30 min y desaparecen entre media y tres horas. [17]

2.9 ANTIBIÓTICOS

Un antibiótico ha sido definido como una sustancia química producida por unos microorganismos capaces de inhibir el desarrollo de otros microorganismos (bacterias, virus u hongos). Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacéutico y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo. El objetivo principal es controlar y disminuir el número de microorganismos viables, de modo que el sistema inmunológico se ha capaz de eliminar la totalidad de los mismos. [18]

Clasificación según el espectro de acción: estos se clasifican en 2:

Amplio: aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes.

Reducido: antibióticos solo activos sobre un grupo reducido de especies.

Clasificación según el mecanismo de acción: Es el mecanismo por el cual un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana. Se dividen en inhibidores de la formación de la pared bacteriana, inhibidores de la síntesis proteica, inhibidores de la duplicación del ADN, inhibidores de la membrana citoplasmática, inhibidores de vías metabólicas. [18]

2.9.1 AMPICILINA

La ampicilina, amoxicilina y otras son grupos de penicilinas de acción extendida porque abarcan microorganismos Gram-negativos. Estos medicamentos son hidrolizados por betalactamasas de amplio espectro de bacterias Gram-negativas. [19]

Es un antibiótico eficaz que actúa tanto contra gérmenes Gram-positivos como Gram-negativos. Conserva el modo de acción bactericida propio de las penicilinas. Mecanismo de acción: Antibacteriano. Su acción depende de su capacidad para alcanzar y unirse a las proteínas que ligan penicilinas localizadas en las membranas

citoplasmáticas bacterianas; otras penicilinas inhiben la síntesis del septo y pared celular bacterianas, probablemente por acetilación de las enzimas transpectidasas unidas a la membrana; esto impide el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglicanos, lo que es necesario para la fuerza y rigidez de la pared celular bacteriana; además, se inhibe la división celular y el crecimiento y con frecuencia se producen lisis y elongación de las bacterias sensibles; las bacterias que se dividen rápidamente son las más sensibles a la acción de las penicilinas. [19]

2.9.2 NISTATINA

La nistatina es un macrólido poliénico del tipo tetraeno con una micosamina. Es un antibiótico natural extraído de *Streptomyces noursei* y en ocasiones de *Streptomyces albulus*. Tiene un mecanismo de acción fungistática y fungicida, similar a la anfotericina B.

Aunque tiene un espectro *In vitro* mayor solo se recomienda para tipos banales o incipientes de candidiosis cutánea, gastrointestinal, y como profilaxis. La nistatina no se absorbe por vía gástrica y por vía parenteral es sumamente toxico, ya que este es un medicamento de acción tópica, e incluso las grageas solo sirven para candidiosis gastrointestinal. [20]

2.9.3 DICLOXACILINA

Es una penicilina semisintética perteneciente a la familia de las isoxazolicas (cloxacilina, flucloxacilina), que como todas ellas son activa por vía oral (ácido-resistente) y frente a las bacterias Gram-positivas o Gram-negativas productoras de betalactamasas. Su absorción digestiva es rápida pero irregular, luego de su administración oral se difunde bien a la sangre y los tejidos.

Como todas estas penicilinas isoxazólicas también llamadas anti estafilocócicas, por su selectividad bactericida sobre el *Staphylococcus aureus* (potencia inhibitoria 0,1 µm/ml), tiene una vida media corta (30-60 min), una elevada ligadura a las proteínas (90%-95%) y su eliminación es amplia (60%-80%) y rápida (6 h) por vía renal. La

dicloxacilina es activa contra algunos cocos Gram-positivos, entre los que se incluyen la mayor parte de las cepas de *Streptococcus* beta hemolítico, neumococos y estafilococos sensibles a la penicilina G. Su espectro antimicrobiano es bastante más reducido que el de la penicilina G. [21]

2.9.4 RESISTENCIA BACTERIANA

Cada antibiótico se caracteriza por un espectro natural de actividad antibacteriana. Este espectro comprende las especies bacterianas que, en su estado natural, sufren una inhibición de su crecimiento por concentraciones de su antibiótico susceptibles de ser alcanzadas *In vivo*. A estas especies bacterianas se les dice naturalmente sensibles a dicho antibiótico. Las especies bacterianas que no se encuentran incluidas dentro de dicho espectro se denominan naturalmente resistentes.

El uso indiscriminado de los antimicrobianos ejerce una fuerte presión selectiva entre las bacterias, lo que trae consigo la selección y diseminación de genes resistentes a los antimicrobianos, con mayor intensidad en los hospitales, y en los efluentes que estos tiran y que terminan en las playas de la ciudad con poco o ningún tratamiento pudiendo ser un reservorio importante de bacterias que presentan resistencia a diferentes antibióticos. [22]

- La **resistencia natural** es un carácter constante de todas las cepas de una misma especie bacteriana. El conocimiento de las resistencias naturales permite prever la inactividad de la molécula frente a bacterias identificadas (después del crecimiento) o sospechosas (en caso de antibiología empírica). En ocasiones, constituye una ayuda para la identificación, puesto que ciertas especies se caracterizan por sus resistencias naturales. Ejemplos: Resistencia natural del *Proteus mirabilis* a las tetraciclinas y a la colistina. Resistencia natural de la *Klebsiella pneumoniae* a las penicilinas (ampicilina, amoxicilina).
- La **resistencia adquirida** es una característica propia de ciertas cepas, dentro de una especie bacteriana naturalmente sensible, cuyo patrimonio genético ha

sido modificado por mutación o adquisición de genes. Contrariamente a las resistencias naturales, las resistencias adquiridas son evolutivas, y su frecuencia depende a menudo de la utilización de los antibióticos. En el caso de numerosas especies bacterianas, y teniendo en cuenta la evolución de las resistencias adquiridas, el espectro natural de actividad no es ya suficiente para guiar la elección de un tratamiento antibiótico. En ese caso, se hace indispensable el antibiograma.

- Una **resistencia cruzada** es cuando se debe a un mismo mecanismo de resistencia. En general, afecta a varios antibióticos dentro de una misma familia (Ejemplo: La resistencia a la oxacilina en los estafilococos se cruza con todos los β -lactámicos). En ciertos casos, puede afectar a antibióticos de familias diferentes (Ejemplo: La resistencia por impermeabilidad a las ciclinas se cruza con la resistencia al coloranfencol y a la trimetoprima).
- Una **resistencia asociada** es cuando afecta a varios antibióticos de familias diferentes. En general, se debe a la Asociación de varios mecanismos de resistencia (Ejemplo: La resistencia de los estafilococos a la oxacilina va frecuentemente asociada a las quinolonas, aminoglicósidos, macrolidos y ciclinas). [18]

2.10 MICROORGANISMOS

Los microorganismos constituyen un gran grupo de seres vivos sumamente heterogéneo cuya única característica común es su reducido tamaño. Todos son lo suficientemente pequeños como para pasar inadvertidos al ojo humano, siendo preciso el uso de dispositivos de aumento como el microscopio óptico o, en algunos casos, el microscopio electrónico para poder observarlos. La gran mayoría de los microorganismos. Son unicelulares, aunque una parte significativa de ellos tienen organización subcelular y unos pocos forman agrupaciones de células de tipo colonial sin llegar a construir verdaderos organismos pluricelulares. [23]

2.10.1 MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS

Existen varios métodos para la conservación de cepas interesantes de microorganismos. Entre los más frecuentes se encuentran la congelación de muestras de cultivos creciendo exponencialmente a los que se ha añadido un agente estabilizante (glicerol al 30%) y se mantienen a -80°C ; la liofilización y la conservación en medios sólidos herméticos.

La liofilización y la congelación son los métodos de conservación más efectivos a largo plazo; pero ambos causan una gran mortandad entre las bacterias (es decir, probablemente en torno al 80-90% de las colonias que se congelan o liofilizan mueren en el proceso). Estos métodos son muy aplicados para conservar bacterias; sin embargo, presentan más problemas en el caso de eucariontes ya que muchos de ellos no se recuperan después del tratamiento.

El método más usado a corto plazo es el mantenimiento de cultivos sólidos realizados en medios generales que se conservan sellados en condiciones de refrigeración (4°C). En este caso, suele ser necesario realizar un repicado del material cada cierto tiempo (entre 2 y 6 meses dependiendo del tipo de material). [24]

2.10.2 CEPAS BACTERIAS

2.10.2.1 Staphylococcus aureus

Los integrantes del género *Staphylococcus*, son cocos Gram positivos, de 0.5-1.5 μm de diámetro, catalasas positivas, que se encuentran microscópicamente aislados, en pares, tétradas o formando racimos irregulares (término derivado del griego *staphylé*: racimo de uvas, Ogston, 1883). Son inmóviles, facultativamente anaerobios, no formadores de esporas, generalmente no capsulados o con limitada formación de cápsula.

El género *Staphylococcus* está ubicado junto a los géneros *Micrococcus*, *Planococcus* y *Stomatococcus*.

Staphylococcus aureus, especie coagulasa positiva, es un reconocido patógeno humano, siendo agente etiológico de un amplio espectro de infecciones de origen comunitario y nosocomial.

S. aureus, tiene una amplia gama de determinantes de virulencia, que abarca componentes de pared celular y una gran variedad de exoproteínas que contribuyen en su habilidad para colonizar y causar enfermedad en mamíferos.

Casi todas las cepas producen un grupo de enzimas y citotoxinas que incluyen 4 hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta) nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasa. La principal función de estas proteínas sería convertir tejidos del huésped en nutrientes requeridos para el desarrollo bacteriano. [25]

2.10.2.2 *Pseudomona aeruginosa*

Pseudomona aeruginosa es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la rama y de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias. Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran también algunas otras especies como *Pseudomona fluorescens*, *Pseudomona putida*, *Pseudomona syringae* y *Pseudomona alcaligenes*. *Pseudomona aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, se puede aislar de muestras de suelo, aguas contaminadas, así como de plantas y animales. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre y algunas pueden infectar también a plantas como *Arabidopsis thaliana*, y a invertebrados como *Caenorhabditis elegans*. Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrimentos que otros organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de *Pseudomona aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón.

Pseudomona aeruginosa representa un problema importante de salud en centros hospitalarios, especialmente cuando se trata de pacientes con cáncer o quemados. Una vez que se establece la infección, *Pseudomona aeruginosa* produce una serie de compuestos tóxicos que causan no sólo daño tisular extenso, sino adicionalmente interfieren con el funcionamiento del sistema inmune. Entre las proteínas que intervienen en la infección de *Pseudomona aeruginosa* encontramos toxinas, como las exotoxinas A y S, así como enzimas hidrolíticas que degradan las membranas y el tejido conjuntivo de diversos órganos. Esta situación se ve agravada por la dificultad para tratar las infecciones por *Pseudomona aeruginosa*, ya que esta bacteria presenta una muy alta resistencia natural a distintos antibióticos y a desinfectantes. [26]

2.10.2.3 *Candida albicans*

Se encuentran diversas especies de *Candida* son componentes del microbiota habitual del cuerpo humano, atacando principalmente mucosas, entre ellas boca, faringe, laringe y tracto gastrointestinal. De más de 100,000 especies de hongos conocidos, solo 175 son los que colonizan el hombre y solo 20 producen infecciones entre ellas: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida kefyr*, *Candida Krusei*, *Candida guilliermondi*, *candida. parakrusei*, *Candida zeylanvides*, *Candida stellatoidea*. [27]

Los agentes patógenos son levaduras (el estado anamorfo) del género *Candida* pertenecientes al Phylum Ascomycotina. Muchas especies se han aislado de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos y algunas de ellas forman parte de la biota normal de la piel y membranas mucosas (boca, vagina, vías respiratorias altas, tracto gastrointestinal) de mamíferos. Este género incluye aproximadamente 150 especies identificadas. [28]

La *Candida albicans* tiene la forma de levadura, que es capaz de reproducción sexual, es una oportunista oral y genital de infecciones en los seres humanos. El aumento de la *Candida albicans* se relaciona con un factor pre disponente del huésped. La incubación de este hongo puede ser de días hasta años.

El contagio puede ser por tres vías:

- Directo (persona a persona)
- De animal a hombre
- Por fómites (estetoscopios, corbatas). [28]

2.10.2.4 *Escherichia coli*

Es un bacilo de 1 - 3 μm por 0.5 μm que se presenta solo en, pares, en cortas cadenas o formando grupos. No forma esporas y por lo general es no capsulado y Gram-negativo. En cultivos jóvenes la forma cocobacilar es bastante frecuente.

En agar forma colonias circulares de 3 a 5 mm convexas, de borde continuo o un tanto ondulado, brillante y de coloración blanca un poco amarillenta. Con producción de ácido y gas, fermenta la lactosa y un gran número de carbohidratos; algunas cepas son lactosas negativas.

Este bacilo es aerobio y anaerobio facultativo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, pero posee propiedades de desarrollo en una gama bastante amplia de temperaturas; el pH favorable es de 7 algunas cepas producen hemolisina. se ha considerado inicialmente solo como un habitante del intestino, desde hace cerca de tres décadas se empezó a estudiar su poder entero patógeno. Las cepas utilizadas de *Escherichia coli* fueron ATTCC 11229 y ATTCC 25922. [29]

2.10.3 MÉTODOS DE ELIMINACIÓN DE MICROORGANISMOS

2.10.3.1 ESTERILIZACIÓN POR CALOR

Los microorganismos mueren rápidamente cuando son sometidos a temperaturas superiores a su óptima de crecimiento. Esto permite utilizar altas temperaturas para eliminar microorganismos por termo destrucción. Los métodos basados en el calor son quizá los más utilizados para controlar el crecimiento microbiano.

La sensibilidad de los diferentes tipos de microorganismos a los tratamientos térmicos es distinta. Las esporas son la forma más termorresistente y las células vegetativas las más sensibles. Por otro lado, los microorganismos Gram-positivos tienden a ser más resistentes que los Gram-negativos. Por consiguiente, desde un punto de vista práctico, la esterilización por calor está destinada a matar las esporas bacterianas.

El medio en el que se encuentra un microorganismo influye en su sensibilidad al calor. Por lo general, los microorganismos son más sensibles a las altas temperaturas cuando se encuentran a pH ácidos, mientras que las concentraciones altas de proteínas o azúcares en el medio disminuyen la efectividad del calor y protegen a las bacterias. Las altas concentraciones de sal tienen efectos variables según el tipo de microorganismo.

La esterilización por calor se puede hacer en medio húmedo usando una autoclave. La autoclave esteriliza usando el calor húmedo transmitido por vapor de agua sobrecalentado debido al uso de altas presiones. El efecto del vapor de agua es facilitar la transmisión del calor al objeto en esterilización. El procedimiento usual es usar 121°C para lo que es necesaria una presión de 1.1 kg/Cm². En estas condiciones un tratamiento de 15 minutos es suficiente para eliminar las esporas de Gram-positivos.
[24]

2.10.3.2 RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

La radiación ultravioleta produce una disminución exponencial en el número de células vegetativas o de esporas vivas con el tiempo de irradiación. Por tanto, se pueden calcular los valores D para la irradiación.

Existe una falta de información precisa sobre la susceptibilidad de las diferentes especies microbianas a la radiación U.V. Diferentes cepas de una misma especie pueden tener una resistencia distinta.

El mayor valor del tratamiento con radiaciones U.V. se encuentra en el saneamiento del aire, aunque también pueden aplicarse para esterilizar superficies de alimentos o para el equipo de los manipuladores de alimentos. [24]

2.11 ANTIBIOGRAMA

Los antibiogramas son estudios que se realizan *In vitro* y nos permiten determinar la resistencia o el grado de sensibilidad de los microorganismos frente a los diferentes antimicrobianos; en lo posible tratan de reproducir en las condiciones en que se encuentra el agente infeccioso dentro los tejidos o líquidos orgánicos.

En la actualidad no se justifica implementar tratamiento con antimicrobianos selectivos en ausencia de un diagnóstico clínico y de estudios bacteriológicos previos, excepto que se trate de infecciones agudas de origen desconocido que requieran un tratamiento de emergencia, porque amenazan con la vida del paciente.

Los métodos más conocidos de antibiogramas para bacterias, en general son: 1) dilución en caldo, 2) difusión en agar, 3) dilución en agar. [30]

2.11.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Se basa fundamentalmente en incorporar el medio de cultivo el antibiótico o el microorganismo en concentración conocida para luego de solidificado el medio se adicione la contraparte y observar inhibición de crecimiento o halos de inhibición según la técnica utilizada. Esta técnica también abarca la llamada de discos de papel, en la cual el antibiótico a ensayar viene incorporado a discos de papel absorbente en concentración conocida, los cuales se colocan sobre la superficie de una caja de agar sembrado masivamente con el microorganismo en estudio, luego de incubar a la temperatura y tiempo adecuados se observan los halos de inhibición de crecimiento. [1]

Las ventajas de los métodos de difusión son que utilizan una pequeña cantidad de muestra a evaluar y ofrecen la posibilidad de ensayar varias sustancias contra un mismo microorganismo. Con esta técnica y realizando diluciones de los diferentes antimicrobianos a probar, se puede encontrar la concentración mínima inhibitoria (MIC), que se define como la menor concentración de antibiótico en Microgramos/Mililitros capaz de inhibir el desarrollo *in vitro* del microorganismo en estudio. [1]

Según la clasificación ATC (Anatomical Therapeutic Chemical) y DDD (Defined Daily Dose) expresa en peso de principio activo en [g (gramos), mg (miligramo), mcg (microgramo), mmol (milimol), E (unidad si se trata de utilización de medicamentos unidades internacionales como de otras unidades), TE (miles de unidades), ME (millones de unidades). [31]

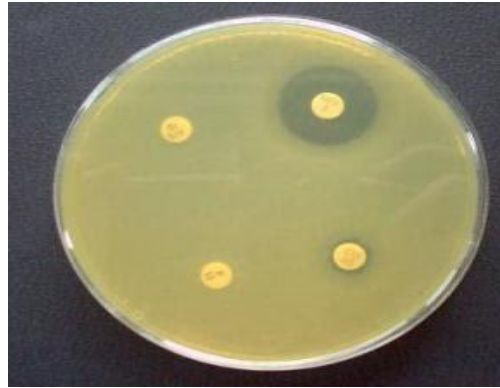


Figura 7. Antibiograma difusión en Agar (Anónimo, 2014).

CAPÍTULO 3 METODOLOGÍA

3.1 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo en las instalaciones de los laboratorios del instituto tecnológico superior de Atlixco.

3.2 RECOLECCIÓN DE MATERIA VEGETAL

Se recolectaron las hojas de la planta de tlachichinole (*Tournefortia hirsutissima* L), en los campos del municipio de Huaquechula, a fines del mes de septiembre, para su recolección se seleccionaron las hojas que estuvieran libres de plagas y en una etapa de madurez tomando como referencia su tonalidad de color siendo este el color verde oscuro, así como la sensación de la hoja rasposa al tacto.

3.3 TRATAMIENTO DE LA MATERIA VEGETAL

De la planta de tlachichinole (*Tournefortia hirsutissima* L), se tomaron solamente las hojas. Posteriormente se lavaron con agua de la llave, para después ponerlas a secar a los rayos del sol durante 5 días.

3.4 MACERACIÓN

Para el proceso de maceración se necesitó la reducción del tamaño de las partículas de las hojas secas para esto se realizó una trituración manual. Posteriormente se prepararon 3 mezclas cada una con un peso de 82.2 g de materia seca y 600 ml de solvente (etanol, metanol y benceno), cubriendo parcialmente la materia vegetal seca. Las mezclas se realizaron en recipientes de vidrio sellados, cubiertos en su totalidad evitando el ingreso de la luz solar y así cuidar la clorofila de la planta. Para la maceración se dejó en reposo un tiempo de 20 días para mejor obtención de principios activos de la planta.

Posteriormente al término de los 20 días de reposo se separó la materia sólida de la líquida obteniendo un contenido de 480 ml de extracto macerado de cada uno de los solventes.

3.5 DESTILACIÓN

Se sometió al proceso de destilación para la eliminación de los solventes mediante un ROTAVAPOR HAHN SHIN HS-3001 (figura 8). Obteniendo solo los extractos de Benceno (**EBe**), Etanol (**EEt**), Metanol (**EMe**). Manteniendo un proceso constante a una velocidad rotatoria de 50 Rpm.



Figura 8. Rotavapor hahn shin hs-3001 (Anónimo, 2015).

Cada uno de los solventes contiene diferentes condiciones para el proceso de destilación como se muestra en la tabla 1:

Tabla 1. Condiciones para la destilación de cada solvente.

Extracto	Temperatura de punto de ebullición (°C)	Presión (Bar)
EEt	55	0.4-0.75
EMe	52	0.5-0.7
EBe	45	0.4-0.75

De los 480 ml recuperados de la maceración solo 315 ml se utilizaron para para la destilación. El tiempo aproximado de cada una de las destilaciones fue de 5 a 7 horas. Esto depende de las características físicas y químicas de cada solvente.

Obteniendo las siguientes cantidades después del proceso de destilación:

Tabla 2. Cantidades iniciales y finales de la destilación.

Extractos	Cantidad inicial (ml)	Cantidad final del destilado (gr)
EEt	315	2.4
EMe	315	6.4
EBe	315	2.1

Para su recuperación de los extractos se necesitó resuspender en:

Tabla 3. Medios en que se resuspendieron los extractos y sus cantidades.

Extractos	Medio en resuspención	Cantidad (ml)
EEt	Agua destilada	10
EMe	Agua destilada	10
EBe	Dimetilsulfoxido (DMSO)	10

El extracto con benceno (EBe) fue el único que se necesitó resuspender con dimetilsulfoxido (DMSO) ya que este no se diluía con agua como los extractos. Después se realizaron dos distintas concentraciones al 5 y 25%. Con los tres extractos.

Tabla 4. Cantidad para las distintas concentraciones.

Concentración	Extracto (μL)	Agua destilada y/o Dimetilsulfoxido (DMSO). (μL)
5%	5	95
25%	25	75

3.6 MICROORGANISMOS

3.6.1 CEPAS

Se utilizaron las siguientes cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, y *Escherichia coli* ATCC 25922, 11229. Estas fueron seleccionadas por qué:

- Constituyen diferentes grupos.
- Son agentes patógenos para el ser humano.
- Creación de resistencia fácilmente a antibióticos. [23]

3.6.2 RECUPERACIÓN DE MRICOORGANISMOS

Para la recuperación de *Escherichia coli* ATCC 25922, 11229 y *Staphylococcus aureus*. Previamente se preparó medio de cultivo líquido LB (Luria Bertani) para *Escherichia coli*, caldo nutritivo para *Staphylococcus aureus*, después se colocaron 10 Mililitros de cada uno de los medios de cultivo, a cada uno de los tubos de ensaye. Posteriormente se sometió a un proceso de esterilización en autoclave los tubos con medio de cultivo, a una temperatura de 121°C durante 20 min. Al igual que se irradió el lugar de trabajo con campana de flujo laminar vertical CFLV-101(figura 9). Con la ayuda de la micropipeta se adicionaron 100 µl de cada cepa bacteriana mencionadas a cada uno de los tubos con medio de cultivo.

Las cuales se incubaron a 37 °C durante 24 horas. En agitación constante para su mejor reproducción. Posteriormente resguardándolas en tubos eppendorf con glicerol cada tubo con 500 µl de cada uno de microorganismos y 500 µl de glicerol previamente estéril y posteriormente pasándolos a una temperatura de -20°C para su resguardo.



Figura 9. Campana de flujo laminar CFLV-101 (Anónimo, 2015).

Para las cepas de *Candida albicans* y *Pseudomona aeruginosa* no se contaba con ningún medio líquido para su resguardo se volvieron a resembrar con el fin de no perder estos microorganismos. Se utilizó medio selectivo para cada uno de los microorganismos, para *Candida albicans* medio Papa Dextrosa (PDA), para *Pseudomona aeruginosa* medio Mc Conkey. Se incubaron a 27°C, durante 24 horas y posteriormente se resguardó a una temperatura de 4°C.

3.7 ENSAYOS BIOLÓGICOS

3.7.1 PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Se utilizó el método Kirby-Bauer (método difusión en Agar), esta prueba permite medir la susceptibilidad *In vitro* de microorganismos patógenos y fitopatógenos frente a sustancias de origen vegetal. [1]

3.7.2 TÉCNICA DE DIFUSIÓN DE DISCO EN AGAR

Después de tener las cepas totalmente aisladas en su medio de cultivo ideal se tomaron con ayuda de la micropipeta 250 µl y se sembró la muestra masivamente con una varilla de vidrio previamente estéril.

Tabla 5. Microorganismos, medios de cultivo, control positivo y control negativo.

Microorganismo	Medio de cultivo	Control positivo C+ (mg/ml)	Control (C-) negativo
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Agar baird-parker	Dicloxacilina	Etanol, Metanol y Benceno
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	Medio Mc Conkey	Dicloxacilina	Etanol, Metanol y Benceno
<i>Cándida albicans</i> ATCC10231	Agar papa dextrosa (PDA)	Nistatina	Etanol, Metanol y Benceno
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11229	Medio Mc Conkey	Ampicilina	Etanol, Metanol y Benceno
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Medio Mc Conkey	Ampicilina	Etanol, Metanol y Benceno

Posteriormente con la ayuda de pinzas de disección se tomaron discos de papel filtro calibre 0.21 mm estéril y se sumergieron en los extractos a 5 – 25 % de concentración y se distribuyeron en cada una de las cajas Petri figura 10.



Figura 10. Distribución de discos.

En la parte superior de la figura se encuentra el disco con extracto al 25% de concentración, en la parte inferior el disco con extracto al 5% de concentración, a la derecha se encuentra el disco con control negativo y a la izquierda el disco con control positivo.

Para su incubación se utilizó una estufa de cultivo modelo FE13AD (Figura 11), a una temperatura de 37 °C durante 48 horas. Después de este periodo de incubación se realizó la lectura con ayuda de un calibrador vernier de los halos de inhibición (mm), figura11. Cabe mencionar que todos los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron por triplicado.



Figura 11. Estufa de cultivo modelo. FE13AD.



Figura 12. Medición de halos de inhibición con calibrador vernier.

RESULTADOS

En la actualidad es común el uso de partes vegetales con la finalidad de obtener diversos efectos terapéuticos. Varios estudios han validado científicamente la eficiencia de numerosos usos de la medicina tradicional utilizada por la gente. [1]

Se diseñó un experimento en el que se comparó la capacidad del extracto vegetal de *Turnefortia hirsutissima* L. de inhibir el crecimiento de los microorganismos a través de una prueba de sensibilidad antimicrobiana usando Ampicilina, Nistatina, Dicloxacilina como control positivo (C+), y los solventes (etanol, metanol, benceno) como control negativo (C -). Tomando en cuenta que los antibióticos son de amplio espectro activo en técnicas *In vitro* contra gran diversidad de bacterias. [6]. [30]

En este experimento la capacidad antimicrobiana fue medida mediante el diámetro del halo de inhibición, el cual es afectado por factores tales como: el microorganismo y el extracto vegetal, donde la actividad antimicrobiana del extracto es evaluada sobre diferentes microorganismos seleccionados. A continuación, se presentan en las tablas siguientes.

Tabla 6. Tamaño halos de inhibición (mm), promedio, desviación estándar de extracto vegetal de *Turnefortia hirsutissima* L. (Extracto con etanol, metanol y benceno) para *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Etanol						
Extracto con etanol	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	0	0	0	0	0	0
Concentración 25%	0	0	0	0	0	0
Etanol	0	0	0	0	0	0
Dicloxacilina	3	3.5	3.5	10	3.33	0.22
Infusión	0	0	0	0	0	0
Triturado	0	0	0	0	0	0
Metanol						
Extracto con metanol	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	0	0	0	0	0	0
Concentración 25%	0	0	0	0	0	0
Metanol	0	0	0	0	0	0
Dicloxacilina	10	0	18	28	9.3	7.36
Infusión	0	0	0	0	0	0
Triturado	0	0	0	0	0	0
Benceno						
Extracto con benceno	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	0	0	0	0	0	0
Concentración 25%	0	0	0	0	0	0
Benceno	0	0	0	0	0	0
Dicloxacilina	6.3	12.3	20	38.6	12.8	5.6
Infusión	0	0	0	0	0	0
Triturado	0	0	0	0	0	0

Tabla 7. Tamaño halos de inhibición (mm), promedio, desviación estándar de extracto vegetal de *Turnefortia hirsutissima* L. (Extracto con etanol, metanol y benceno) para *Pseudomonas aureoginosa* ATCC 27853.

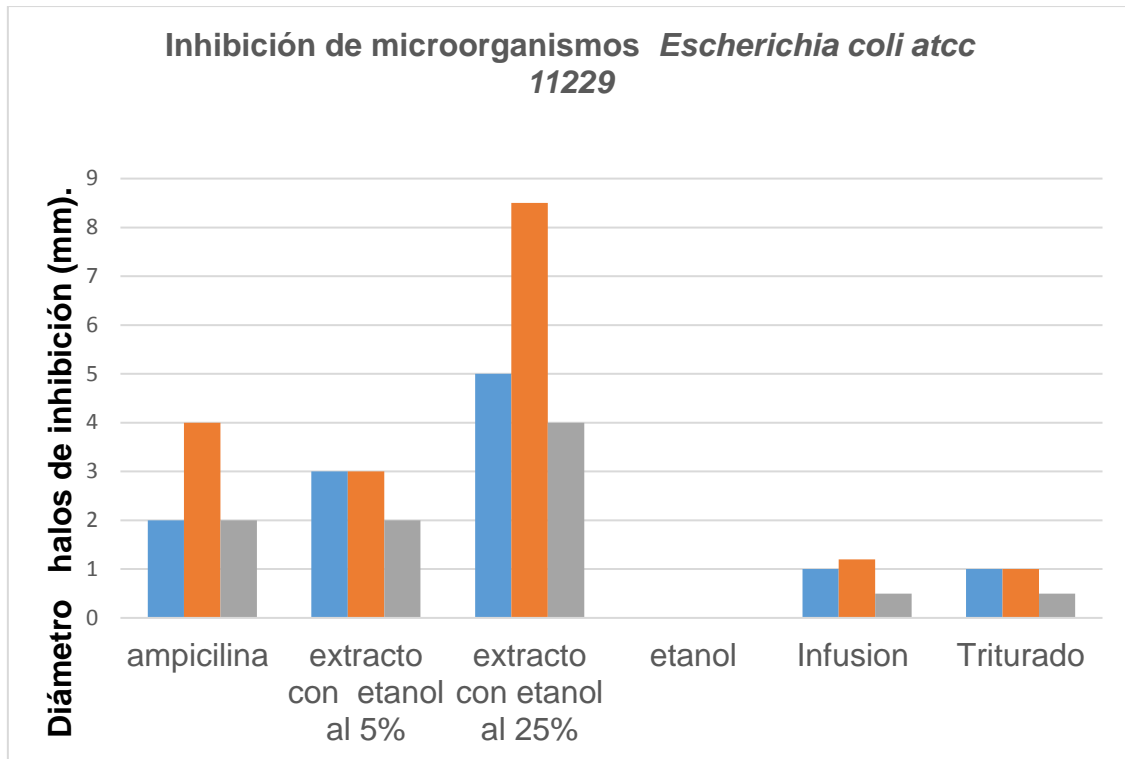
Etanol						
Extracto etanol	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	0	0	1	1	0.33	0.47
Concentración 25%	1	0	0	1	0.33	0.47
Etanol	0	0	1	1	0.33	0.47
Dicloxacilina	2	1	2	5	1.6	0.47
Infusión	0	0	0	0	0	0
Triturado	0	1	0	1	0.33	0.47
Metanol						
Extracto metanol	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	0	0	0	0	0	0
Concentración 25%	0	1	0	1	0.33	0.47
Metanol	1	0	0	1	0.33	0.47
Dicloxacilina	0	1	0	1	0.33	0.47
Infusión	0	0	1	1	0.33	0.47
Triturado	0	0	1	1	0.33	0.47
Benceno						
Extracto benceno	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	1	0	0	1	0.33	0
Concentración 25%	0	1	0	1	0.33	0
Benceno	1	0	0	1	0.33	0
Dicloxaxilina	1.5	1	0	2.5	0.83	0.62
Infusión	0	1	0	1	0.33	0.47
Triturado	1	0	0	1	0.33	0.47

Tabla 8. Tamaño halos de inhibición (mm), promedio, desviación estándar de extracto vegetal de *Turnefortia hirsutissima* L. (Extracto con etanol, metanol y benceno) para *Candida albican* ATCC 10231.

Etanol						
Extracto etanol	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	0	0	0	0	0	0
Concentración 25%	0	0	0	0	0	0
Etanol	0	0	0	0	0	0
Nistatina	14	10	20	44	14.6	4.1
Infusión	0	0	0	0	0	0
Triturado	0	0	0	0	0	0
Metanol						
Extracto metanol	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	0	0	0	0	0	0
Concentración 25%	0	0	0	0	0	0
Metanol	0	0	0	0	0	0
Nistatina	12	0	10	22	7.3	5.2
Infusión	0	0	0	0	0	0
Triturado	0	0	0	0	0	0
Benceno						
Extracto benceno	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	0	0	0	0	0	0
Concentración 25%	0	0	0	0	0	0
Benceno	0	0	0	0	0	0
Nistatina	11	10	4	25	8.3	3.0
Infusión	0	0	0	0	0	0
Triturado	0	0	0	0	0	0

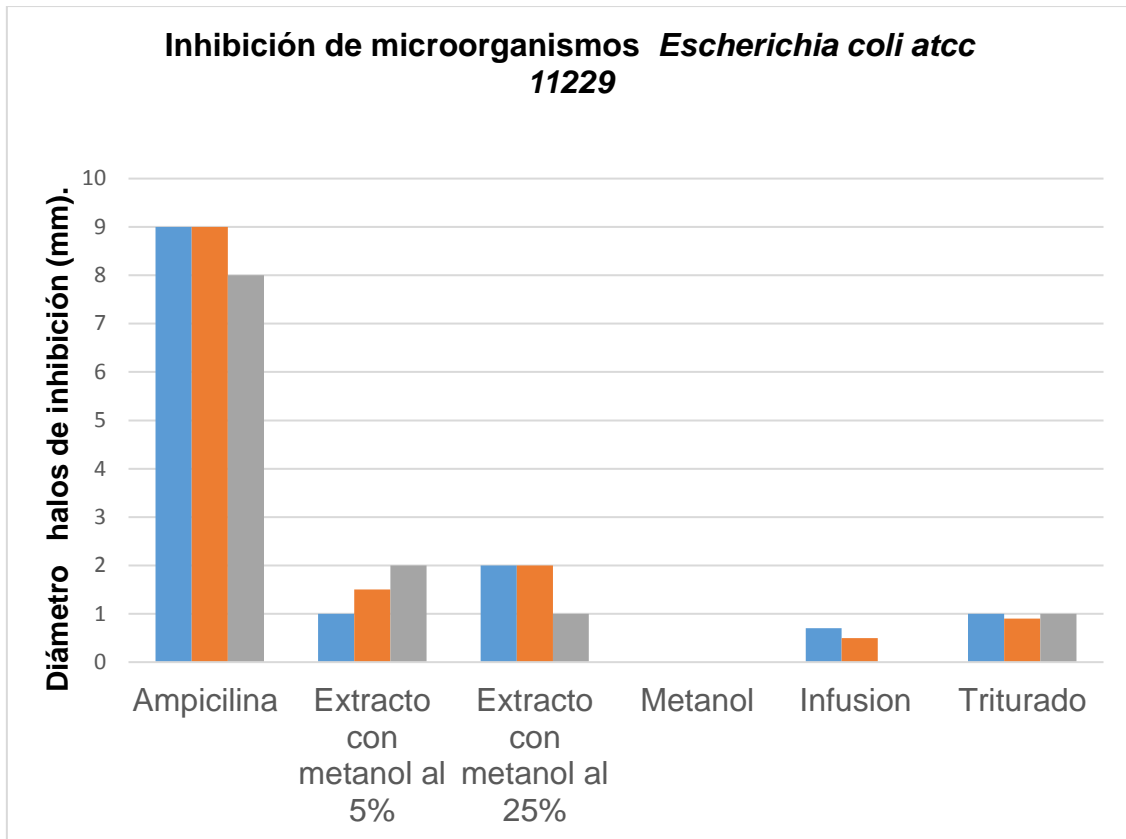
Tabla 9. Tamaño halos de inhibición (mm), promedio, desviación estándar de extracto vegetal de *Turnefortia hirsutissima* L. (Extracto con etanol, metanol y benceno) para *E. coli* ATCC 11229.

Etanol						
Extracto etanol	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	3	3	2	8	2.6	0.47
Concentración 25%	5.5	8.5	4	18	6	1.87
Etanol	0	0	0	0	0	0
Ampicilina	2	4	2	8	2.6	0.94
Infusión	1	1.2	0.5	2.7	0.9	0.08
Triturado	1	1	0.5	2.5	0.83	0.05
Metanol						
Extracto metanol	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	1	1.5	2	4.5	1.5	0.40
Concentración 25%	2	1	1	4	1.3	0.47
Metanol	0	0	0	0	0	0
Ampicilina	9	9	8	26	8.6	0.47
Infusión	0.7	0.5	0	1.2	0.4	0.08
Triturado	1	0.9	1	2.9	0.9	0.02
Benceno						
Extracto benceno	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	2	1.5	2	5.5	1.8	0.238
Concentración 25%	1.5	2	2	5.5	1.8	0.238
Benceno	0	0	0	0	0	0
Ampicilina	9.5	9.5	12	31	10.3	1.178
Infusión	1	0.5	0.5	2	0.6	0.06
Triturado	1	1	0.6	2.6	0.8	0.04



Gráfica 1. Diámetro de halos de inhibición contra las concentraciones del extracto con etanol, infusión, triturado y control positivo y negativo.

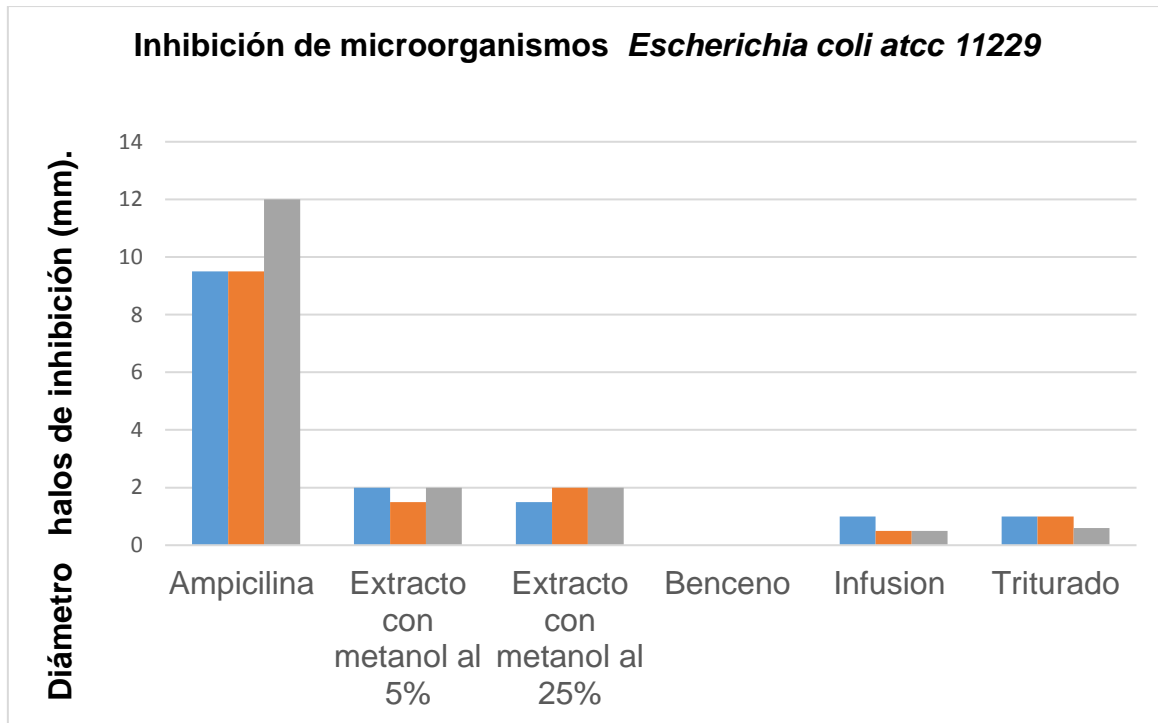
La gráfica 1 muestra los diámetros de los halos de inhibición y se puede observar que el extracto con etanol al 25% de concentración tiene mayor inhibición que la del extracto con etanol al 5%, la ampicilina, los extractos de infusión y el triturado. El etanol no tiene efecto inhibitorio por lo cual se puede decir que si el extracto tiene residuos de este no afecta.



Gráfica 2. Diámetro de halos de inhibición contra las concentraciones del extracto con metanol, infusión, triturado y control positivo y negativo.

La gráfica 2 muestra los diámetros de los halos de inhibición y se puede observar que las dos concentraciones del extracto con metanol tienen diámetros parecidos. En el extracto obtenido de la infusión y triturado los halos fueron menores que los del extracto con metanol a distintas concentraciones.

En el caso de la ampicilina tiene un gran efecto antimicrobiano. El metanol no tiene efecto inhibitorio por lo cual se puede decir que si el extracto tiene residuos de este no afecta.

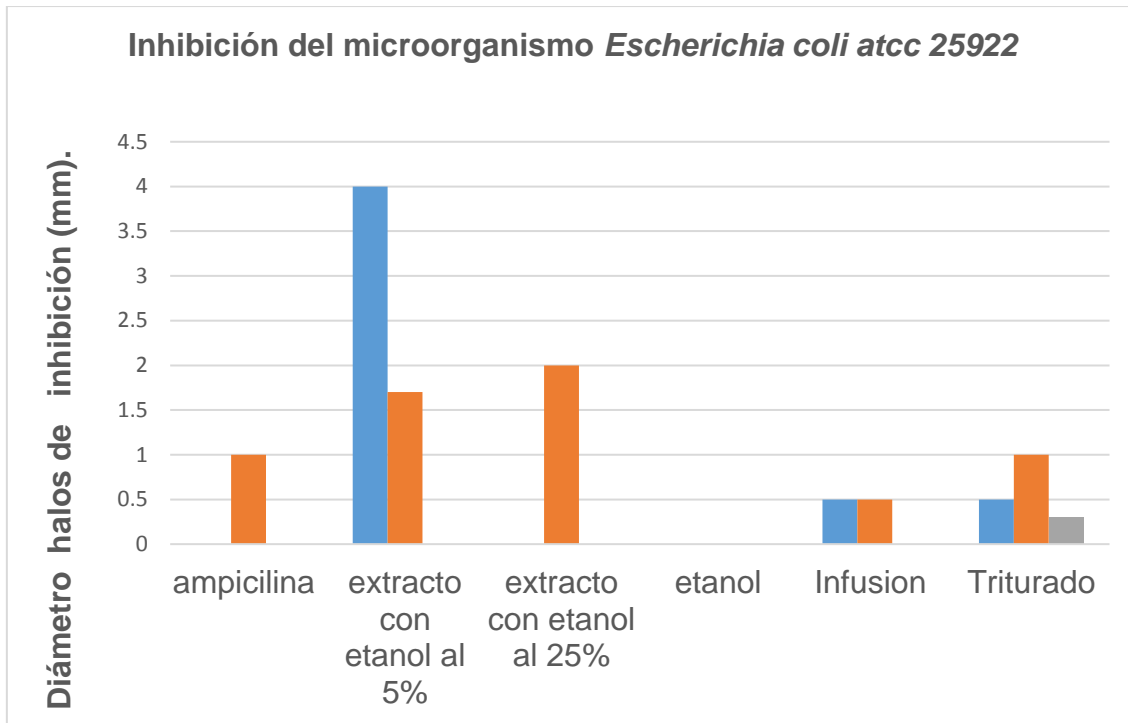


Gráfica 3. Diámetro de halos de inhibición contra las concentraciones del extracto con benceno y control positivo y negativo.

La gráfica 3 muestra los diámetros de los halos de inhibición se observa que las dos concentraciones del extracto con benceno tienen diámetros parecidos. Los extractos de infusión y triturado su diámetro de los halos son menores que el extracto con benceno. En el caso de la ampicilina tiene un gran efecto antimicrobiano. El benceno no tiene efecto inhibitorio por lo cual se puede decir que si el extracto tiene residuos de este no afecta.

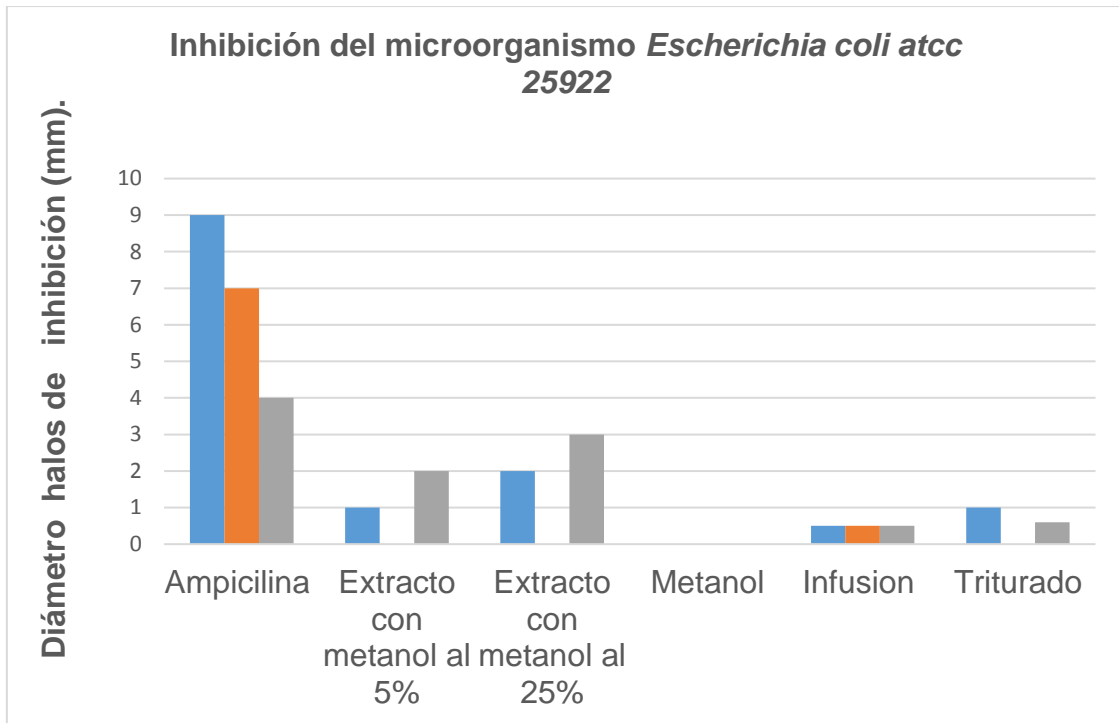
Tabla 10. Tamaño halos de inhibición (mm), promedio, desviación estándar de extracto vegetal de *Turnefortia hirsutissima* L. (Extracto con etanol, metanol y benceno) para *E. coli* ATCC 25922.

Etanol						
Extracto etanol	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	4	1.7	0	5.7	1.9	1.23
Concentración 25%	0	2	0	2	0.66	0.94
Etanol	0	0	0	0	0	0
Ampicilina	0	1	0	1	0.33	0.47
Infusión	0.5	0.5	0	1	0.33	0.05
Triturado	0.5	1	0.3	1.8	0.6	0.08
Metanol						
Extracto metanol	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	1	0	2	3	1	0.81
Concentración 25%	2	0	3	5	1.6	1.24
Metanol	0	0	0	0	0	0
Ampicilina	9	7	4	20	6.6	2.05
Infusión	0.5	0.5	0.5	1.5	0.5	0.16
Triturado	1	0	0.6	1.6	0.53	0.168
Benceno						
Extracto benceno	Ensayo 1 (mm)	Ensayo 2 (mm)	Ensayo 3 (mm)	Sumatoria	Promedio	Desviación estándar
Concentración 5%	0	2	4.5	6.5	2.1	1.84
Concentración 25%	2	2.5	2	6.5	2.1	0.244
Benceno	0	0	0	0	0	0
Ampicilina	3	2.5	6.5	12	4	1.77
Infusión	0	0.5	1	1.5	0.5	0.16
Triturado	0.5	0	1	1.5	0.5	0.16



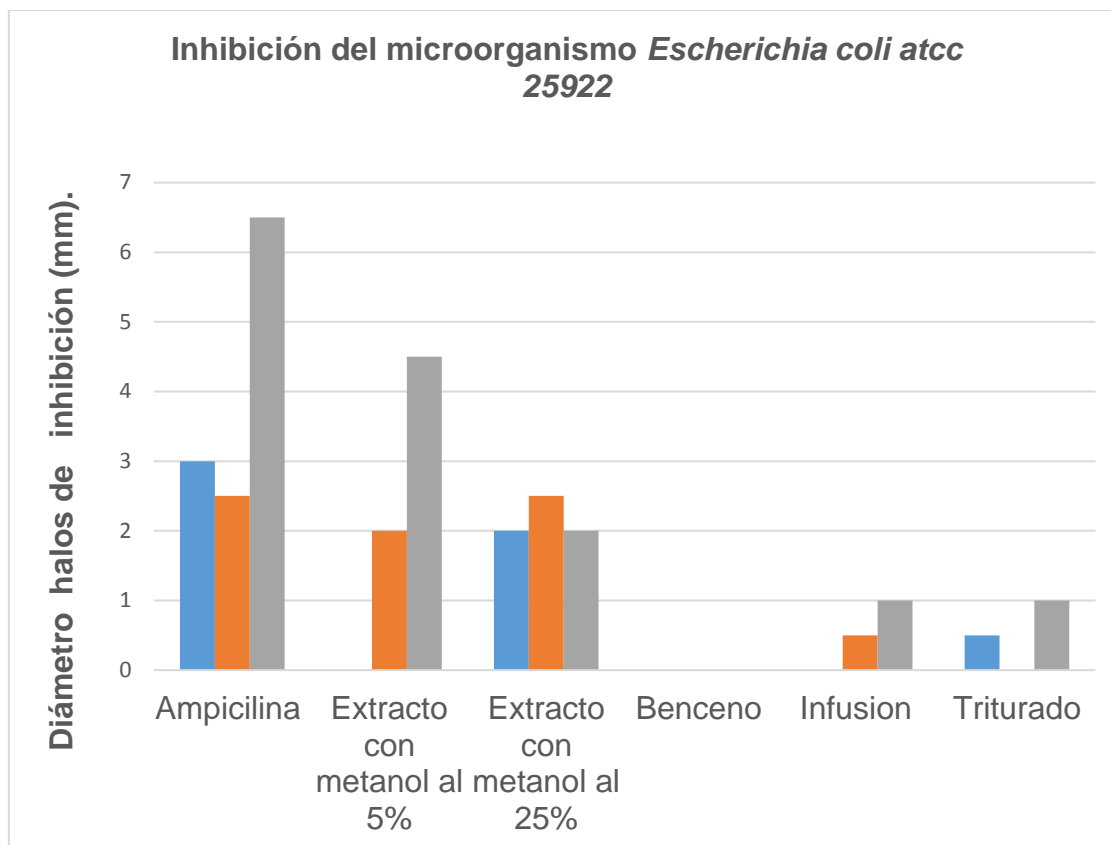
Gráfica 4. Diámetro de halos de inhibición contra las concentraciones del extracto con etanol, infusión, triturado y control positivo y negativo para *E.coli* ATCC 25922.

En la gráfica 4 se puede observar que el extracto con mayor inhibición es la del etanol al 5% de concentración comparada con la del extracto etanol al 25% de concentración y la del extracto de infusión, así como la del triturado. También se puede notar que la ampicilina y el etanol no tuvieron efecto inhibitorio.



Gráfica 5. Diámetro de halos de inhibición contra las concentraciones del extracto con metanol. Infusión, triturado y control positivo y negativo para *E.coli* ATCC 25922.

En la gráfica 5 se observa que el extracto con mayor eficiencia inhibitoria después de la ampicilina es el de 25% de concentración y la de 5% de concentración tiene menor efecto inhibitorio, al igual que el extracto triturado y el de la infusión. El metanol no tiene efecto inhibitorio.



Gráfica 6. Diámetro de halos de inhibición contra las concentraciones del extracto con benceno, infusión, triturado y control positivo y negativo para *E. coli* ATCC 25922.

En la gráfica 5 se puede observar que ambas concentraciones (5, 25%) del extracto con benceno después de la ampicilina presentan buen efecto inhibitorio. El benceno no tiene efecto inhibitorio.

Los extractos de la infusión y triturado su diámetro de halos de inhibición son menores al del extracto con benceno.

DISCUSIÓN

La presente investigación permitió determinar que la CMI en el extracto de *Tournefortia hirsutissima* L. sobre *Escherichia coli* ATCC 11229 fue de 25% en etanol.

Montero-Recalde y col. Analizaron en 2019, que la CMI del aceite esencial de eucalipto se presentó a partir del 30% sobre *Escherichia coli* ATCC 11229, mientras que Yáñez y Cuadro (2012) obtuvieron CMI menores frente a bacterias Gram positivas en comparación a Gram negativas, lo cual se debe a las características constitutivas de la pared celular, además de la concentración de los inóculos trabajados en las investigaciones. Comparado con los resultados obtenidos en este trabajo donde la CMI fue de 25%. [32] [33]

CONCLUSIONES

Como objetivo principal para este trabajo se planteó conocer el efecto antimicrobiano que tiene el extracto de *Turneforita hirsutissima* L. ante diferentes cepas bacterianas.

Las cepas manipuladas fueron *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cándida albicans*, *Escherichia coli* ATCC 11229 y 25922.

Se concluye que la planta de tlachicchinole (*Turneforita hirsutissima* L). No presenta actividad antimicrobiana en las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cándida albicans* en los tres solventes (Etanol, Metanol y Benceno) y en las dos concentraciones (5% y 25%) Debido a que estas bacterias presentan una fuerte resistencia para antibióticos convencionales.

Mientras que para las *Escherichia coli* ATCC 11229 presenta mayor actividad inhibitoria en el extracto con etanol en la concentración del 25%. Y para *Escherichia coli* ATCC 25922 el extracto que presentó mayor actividad inhibitoria fue el extracto con benceno en las dos concentraciones (5% y 25%).

El residuo de solventes en el extracto afecta, ya que se comprobó que los solventes no presentan inhibición en ninguna de los ensayos realizados.

Los extractos obtenidos de la infusión y la trituración no mostraron resultados favorecedores ya que la planta recolectada no se encontraba en su etapa de maduración.

La maceración con solventes es un buen proceso de extracción ya que los solventes logran una sinergia con la materia orgánica. Siendo el solvente el que nos ayudara a obtener todos los componentes activos que se encuentran en la planta.

PERSPECTIVAS

Se recomienda utilizar el extracto de la planta a diferentes concentraciones para verificar cual es la concentración máxima inhibitoria.

Se pretende que realicen experimentos en diferentes cepas de microorganismos diferentes a las utilizadas en este trabajo.

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que en las cepas de *Escherichia coli* se obtuvo mayor inhibición por lo que se recomienda realizar estudios *In vivo* con otras cepas de *Escherichia coli* diferentes a las utilizadas en el presente trabajo con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria.

Se recomienda utilizar esta planta en su mejor punto de maduración en el periodo (septiembre- octubre). Y realizar ensayos de efecto cicatrizante.

GLOSARIO

Eritema: El eritema es un "enrojecimiento" de la piel debido a procesos inflamatorios o inmunológicos, que normalmente son el resultado de la acumulación de células del sistema inmunitario. Puede haber muchas causas de eritema: exposición al calor, picaduras de insectos, infecciones, alergias, la radiación no ionizante (luz solar, rayos UV) y la radiación ionizante (rayos X, radiación nuclear).

Edema: Presencia de un exceso de líquido en algún órgano o tejido del cuerpo que, en ocasiones, puede ofrecer el aspecto de una hinchazón blanda.

"un edema pulmonar; las embarazadas suelen padecer edemas en los tobillos y en las piernas"

Prurito: 1) Deseo constante, y a veces excesivo, de hacer una cosa de la forma más completa o perfecta posible.

"tiene un gran prurito profesional y nunca deja las cosas a medias; el prurito de querer hablar bien desemboca en ocasiones en pedantería"

2) Picor que se siente en una parte del cuerpo o en todo él y que provoca la necesidad o el deseo de rascarse; es un síntoma de ciertas enfermedades de la piel y de algunas de tipo general. "prurito anal; prurito vaginal"-

Fómite: es cualquier objeto carente de vida o sustancia que es capaz de transportar organismos infecciosos tales como bacterias, virus, hongos o parásitos desde un individuo a otro. Células de la piel, pelo, vestiduras, y sábanas son fuentes comunes de contaminación en los hospitales.

ANEXO 1

Preparación de medio LB (Luria Bertani) líquido

Composición	G/L
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de Sodio (NaCl)	10

Preparación

Disolver 25 g/L en agua destilada esterilizar con cuidado en autoclave (15 min, a 121°C). Este medio de cultivo líquido sirve para el crecimiento de *Escherichia coli*.

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE MEDIO LB SOLIDO

Composición	G/L
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio (NaCl)	10
Agar-Agar	6

Preparación

Disolver 31 g/L en agua destilada esterilizar con cuidado en autoclave (15 min, a 121°C). Este medio de cultivo solido sirve como Medio de enriquecimiento, especialmente para *Escherichia coli* a partir de diversas muestras.

ANEXO 3

PREPARACIÓN DE MEDIO MC CONKEY

Composición	G/L
Peptona	17
Pluiripeptona	3
Lactasa	10
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5
Agar	13.5
Rojo neutro	0.003
Cristal violeta	0.001

Preparación

Suspender 50 g del polvo por un litro de agua destilada. Mezclara uniformemente hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min. Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram-negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*.

ANEXO 4

PREPARACIÓN AGAR PAPA DEXTROSA (PDA)

Composición	G/L
Infusión de patata	4
Glucosa	20
Agar	15

Preparación

Disolver 39 g del medio en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lb de presión) durante 15 minutos. Se usa para el crecimiento de hongos y levadura.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantas de tlachichinole (<i>Tournefortia hirsutissima</i> L). Nayeli Manzano, 2011.	8
Figura 2. Rotavapor (Anónimo, 2014).	12
Figura 3. Partes del rotavapor (Anónimo, 2013).	13
Figura 4. Modelo del etanol (Anónima, 2015).	15
Figura 5. Estructura del metanol (Anónima, 2015).	17
Figura 6. Estructura del benceno (Anónima, 2015).	18
Figura 7. Antibiograma difusión en Agar (Anónimo, 2014).	31
Figura 8. Rotavapor hahn shin hs-3001 (Anónimo, 2015).	33
Figura 9. Campana de flujo laminar CFLV-101 (Anónimo, 2015).	36
Figura 10. Distribución de discos.	38
Figura 11. Estufa de cultivo modelo. FE13AD.	39
Figura 12. Medición de halos de inhibición con calibrador vernier.	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones para la destilación de cada solvente.	33
Tabla 2. Cantidades iniciales y finales de la destilación.	34
Tabla 3. Medios en que se resuspendieron los extractos y sus cantidades.	34
Tabla 4. Cantidad para las distintas concentraciones.	34
Tabla 5. Microorganismos, medios de cultivo, control positivo y control negativo. ...	37
Tabla 6. Tamaño halos de inhibición (mm), promedio, desviación estándar de extracto vegetal de <i>Turnefortia hirsutissima</i> L. (Extracto con etanol, metanol y benceno) para <i>Staphylococcus aureus</i>	40
Tabla 7. Tamaño halos de inhibición (mm), promedio, desviación estándar de extracto vegetal de <i>Turnefortia hirsutissima</i> L. (Extracto con etanol, metanol y benceno) para <i>Pseudomona aureoginosa</i>	42
Tabla 8. Tamaño halos de inhibición (mm), promedio, desviación estándar de extracto vegetal de <i>Turnefortia hirsutissima</i> L. (Extracto con etanol, metanol y benceno) para <i>Candida albicans</i>	43
Tabla 9. Tamaño halos de inhibición (mm), promedio, desviación estándar de extracto vegetal de <i>Turnefortia hirsutissima</i> L. (Extracto con etanol, metanol y benceno) para <i>E. coli</i> ATTCC 11229.	44
Tabla 10. Tamaño halos de inhibición (mm), promedio, desviación estándar de extracto vegetal de <i>Turnefortia hirsutissima</i> L. (Extracto con etanol, metanol y benceno) para <i>E. coli</i> ATTCC 25922.	48

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Diámetro de halos de inhibición contra las concentraciones del extracto con etanol y control positivo y negativo.....	45
Gráfica 2. Diámetro de halos de inhibición contra las concentraciones del extracto con metanol y control positivo y negativo.	46
Gráfica 3. Diámetro de halos de inhibición contra las concentraciones del extracto con benceno y control positivo y negativo.	47
Gráfica 4. Diámetro de halos de inhibición contra las concentraciones del extracto con etanol y control positivo y negativo para <i>E.coli</i> ATTCC 25922.	49
Gráfica 5. Diámetro de halos de inhibición contra las concentraciones del extracto con metanol y control positivo y negativo para <i>E.coli</i> ATTCC 25922.....	50
Gráfica 6. Diámetro de halos de inhibición contra las concentraciones del extracto con benceno y control positivo y negativo para <i>E. coli</i> ATTCC 25922.	51

REFERENCIAS

- [1] S. Estrada, «Determinación de la actividad antibacteriana In vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*).», Riobamba, Ecuador., 2010.
- [2] «ACTIVIDAD BIOLÓGICA».
- [3] N. Mier y E. Leyva , «Usos medicinales del tlachichinole (*Tournefortia hirsutissima* L.),» *Tlahui - Medic*, 2011.
- [4] N. Manzano Mier, «Conocimiento sobre el hábitat del tlachichinole aportado por el Sr. Galdino Villalba Cortes,» *Tlahui - Medic*, vol. 23, 11 octubre 2011.
- [5] A. Chaves, « Extractos vegetales con efecto fungicida, insecticida o nematocida.,» 2008. [En línea]. Available: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00146.pdf> . [Último acceso: 17 04 2015].
- [6] A. Lizcano y j. Vergara, «Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanolicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopoliodes y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatóge,» 2006.
- [7] C. Catania y s. Avangnina, «La maceración,» 2007. [En línea]. Available: http://inta.gob.ar/documentos/curso-de-degustacion-de-vinos/at_multi_download/file?name=21.+La+maceraci%C3%B3n.pdf. [Último acceso: 02 02 2015].
- [8] «Revisión bibliográfica.
http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/lopez_a_e/capitulo1.pdf. Consultada 03/02/15,» [En línea]. Available: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/lopez_a_e/capitulo1.pdf.. [Último acceso: 03 02 2015].
- [9] «Destilación.,» [En línea]. Available: http://ocw.unizar.es/ocw/ciencias-experimentales/tecnicas-basicas-de-laboratorio-quimico/teoria/Destilacion_teoría.pdf.. [Último acceso: 18 02 2015].
- [10] Buchi, «Manual de instrucciones rotavapo R3».
- [11] G. M, «Los disolventes orgánicos y su exposición ocupacional,» Pachuca, Hidalgo, 2007.
- [12] P. u. j. Consultada, «Ficha de datos de seguridad etanol,» [En línea]. Available: <http://portales.puj.edu.co/doc-quimica/fds-labqca-dianahermith/Etanol.pdf>. [Último acceso: 08 04 2015].

- [13] A. Calwell, «ciencia y cultura,» [En línea]. Available: http://www.ehowenespanol.com/mata-alcohol-bacterias-como_10670/.
- [14] V. Llinas, «Intoxicación por alcohol metílico.,» Medellín, Colombia, 2005.
- [15] « Riesgo químico – accidentes graves BENCENO.,» Murcia, 2007.
- [16] R. J. M. J. B. Wilkinson, «Limpieza, higiene y control microbiológico en la fabricación.,» de *Cosmetología de Harry*, Madrid, Dias de Santos, 1990, p. 984.
- [17] E. Ramírez y L. Segisfredo, «Empleo del dimetilsulfoxido (D.M.S.O.) en psiquiatria.,» 2000.
- [18] R. Vignoli y V. Seija, «Principales grupos de antibióticos.,» 2010. [En línea]. Available: (webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:fyKT0714TKwJ:www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA34.pdf+&cd=4&hl=es&ct=clnk&gl=mx).. [Último acceso: 10 02 15].
- [19] N. Mendoza, «Actualidades farmacológicas “Penicilina “,» Mexico, 2007.
- [20] B. Trujillo y A. J. Micología medica básica, 4ª ed., Mexico: McGraw Hill, 2012, p. 583.
- [21] Rocnarf., « Dicloxacilina. Laboratorios farmacéuticos que cuidan su salud.,» [En línea]. Available: <http://www.rocnarf.com/sitio/productos/dicloxacilina.php>. [Último acceso: 08 03 2015].
- [22] A. Muñoz, o. h. Pucci y G. N. Pucci, «Cepas multirresistentes de agua de mar en comodoro Rivadavia, Argentina,» *Higiene y sanidad ambiental*, vol. 14, nº 4, 2014.
- [23] «Microorganismos,» [En línea]. Available: <http://www.bionova.org.es/biocast/documentos/tema20.pdf>. [Último acceso: 30 04 2015].
- [24] «Técnicas de eliminación y de conservación de microorganismos,» [En línea]. Available: <http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema%2003.-%20Eliminacion%20y%20conservacion.pdf>. [Último acceso: 18 02 2015].
- [25] «Staphylococcus aureus.,» [En línea]. Available: <http://www.bvsops.org.uy/pdf/aureus.pdf>.. [Último acceso: 25 03 2015].
- [26] G. Soberón, « Pseudomona aeruginosa,» Mexico, 2007.
- [27] J. Casas, «Cándida albicans,» Guadalajara, Jalisco., 2008.
- [28] L. R. Castañón, «Unidad de Micología,» Mexico, 2011.
- [29] M. Peñaranda y M. Sierra, Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de partes aéreas de las especies bursera siminba y bursera graveolens contra algunos microorganismos patógenos, Bogotá , Colombia: Bogotá D.C, 2003, pp. 50-68.

- [30] M. Negroni, Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica, 2 a ed., Buenos Aires: Médica panamericana, 2009, p. 656.
- [31] F. Alvarez, «Farmacoepidemiología. Estudios de Utilizacion de Medicamentos,» *Seguim Farmacoter*, vol. 2, nº 3, pp. 129-136, 2004.

