



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

**Caracterización antimicrobiana del extracto
metanólico de estróbilos de pino (*Pinus Moctezumae*)**

TESIS

Que para obtener el título de:

LICENCIATURA EN INGENIERÍA QUÍMICA

Presenta:

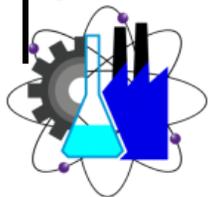
ALONDRA MICHELLE DIAZ XICOTENCATL

Directora de Tesis:

DRA. GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA

Cuernavaca, Morelos

ENERO, 2024



Facultad de Ciencias
Químicas e Ingeniería

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a dios por darme la oportunidad de realizar este gran paso tan importante en compañía de mis familiares y amigos.

Le doy gracias a mi directora de tesis, la doctora Genoveva Bustos Rivera Bahena , por haberme aceptado como su tesista de licenciatura , por todo el apoyo brindado, paciencia, la confianza en mí , por todas sus aportaciones y toda su comprensión para poder concluir todo este proyecto.

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y Facultad de Ciencias Químicas e ingeniería , por ser mi segunda casa de estudios.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio que me acompañaron en este camino y que me compartieron de sus conocimientos además de motivarme y apoyarme incondicionalmente.

Agradezco al laboratorio del Doctor Rubén y a sus chicos por aceptarme en su laboratorio y apoyarme en todo momento además de brindarme una linda amistad.

Quiero agradecer a todos mis sinodales por el tiempo invertido en este proyecto, gracias por su buena disposición y compartirme de sus conocimientos.

Agradezco al Dr. Miguel Àngel director del Centro de Ciencias Genómicas UNAM por haberme aceptado en una pequeña estancia y hacer uso de sus laboratorios para poder concluir la última parte de este proyecto.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo principalmente a dios por darme salud para lograr llegar al final de este proyecto. Por concederme fuerzas, perseverancia, resiliencia y paciencia para superar los momentos de dificultad, Por ayudarme a nunca perder la esperanza en que mis esfuerzos serían recompensados, y darme confianza a mi mima para superar los nuevos retos.

A mi madre, María Rufina

Quiero dedicarle este proyecto a mi hermosa madre que siempre estuvo 23 años de mi vida apoyándome, y motivándome incondicionalmente, por quererme mucho y conducirme siempre por el camino del bien. Por ser mi ejemplo de vida ,por su gran fe en mí , por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica como en la vida cotidiana , por todo su amor de madre y nunca dejarme cada vez que la necesite.

A mi padre, Jorge

Quiero agradecer a mi padre por el apoyo económico y por haberme dado una carrera para mi futuro, gracias por que nunca me faltó nada en estos años de estudio.

A mis hermanas

Tania y Yazmin por estar al pendiente de mi todo el tiempo , gracias infinitas por todo su apoyo emocional y económico , por escucharme, por creer en mí y estar en los momentos más difíciles de nuestras vidas , gracias por ayudarme cuando más se los pedí , por darme alegría al final de un largo y pesado día, gracias, la verdad no tengo como pagárselos , las quiero muchas hermanas, son mi todo.

A mis tíos

Tía Xóchitl y tío José Gracias por apoyarme a mí y a mis hermanas incondicionalmente, por cuidarnos, por aconsejarnos , gracias por haberme dado soporte al principio de este proyecto y por estar al pendiente de nosotras.

Y por supuesto también le dedico este trabajo a mi asesora la Dra. Genoveva Bustos Rivera Bahena, gracias de nuevo Dra. Geno por todo su apoyo incondicional, sus enseñanzas, su experiencia, la confianza que me brindo y su paciencia infinita, gracias por todo.

INDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	2
DEDICATORIA	3
ABREVIATURAS	11
Fórmulas de compuestos:	12
Definiciones:	12
RESUMEN.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
<i>Escherichia coli</i>	17
<i>Salmonella typhi</i>	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	19
<i>Streptococcus Pyogenes</i>	20
Medicina tradicional para el tratamiento de infecciones	21
Otras especies con potencial uso terapeutico en enfermedades infecciosas.	22
Familia Pinaceae.....	22
Genero Pinus	23
Coníferas en morelos	26
<i>PINUS MOCTEZUMAE</i>	31
Las coníferas en el tratamiento terapeutico antimicrobiano	34
Estructuras de compuestos fitoquímicos presentes en diferentes spp. de coníferas	39
Componentes fitoquímicos de las coníferas	41
JUSTIFICACIÓN.....	43
HIPOTESIS	44
OBJETIVO	45
Objetivo general.....	45
Objetivos específicos.....	45
METODOLOGÍA.....	45
Obtención del material vegetal (estróbilos femeninos <i>Pinus moctezumae</i>)	45
Obtención de extracto metanólico de estróbilos femeninos (<i>Pinus moctezumae</i>).....	45
La obtención del extracto metanólico de los estróbilos.	46
Análisis de los componentes de los extractos mediante cromatografía en capa fina.	47
Obtención de fracciones del extracto metanólico mediante cromatografía en columna.	47
Prueba de antibiograma.....	49

Preparación del medio	49
Suspensiones bacterianas en caldo nutritivo.....	50
Antibiogramas	50
Curva de crecimiento	52
Preparación de una solución isotónica a base de cloruro de sodio	53
RESULTADOS	55
Resultados de extracción por maceración en ultrasonido:.....	55
Rendimiento:.....	56
Resultados de fracciones de columna cromatográfica de extracto por macerado	56
LUZ UV	56
LUZ UV	58
LUZ UV	60
LUZ UV	62
LUZ UV	63
LUZ UV	73
Resultados de extracción total metanólico por maceración	76
Resultados de los Antibiogramas de las fracciones 1 a la 10 recolectadas	79
Resultados de las curvas de crecimiento.	110
CONCLUSIONES	114
ANEXOS	115
Procedimiento Soxhlet.....	115
Procedimiento de concentrado.....	115
Agua Tridestilada estéril.....	115
Esterilización de celdas para espectrofotómetro	116
Estandarización de la concentración bacteriana	116
BIBLIOGRAFIA	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Distribución de especies del género Pinus [49].....	28
Figura 2 Imagen representativa de Pinus moctezumae en Morelos, localizado en la zona norte de Morelos.....	30
Figura 3 a) Árbol adulto de Pinus moctezumae (Cuernavaca, Morelos). b) Estróbilos femeninos, abierto (izquierda) y cerrado (derecha) de Pinus moctezumae. c) Semillas de Pinus moctezumae con ala articulada.....	32
Figura 4 Estructura de estróbilos de Pinus m.....	33
Figura 5 Estróbilo masculino de Pinus m.....	33
Figura 6 Estróbilos femeninos de Pinus moctezumae.....	34
Figura 7 Taxiresinol.....	40
Figura 8 Lariciresinol.....	39
Figura 9 Pinoresinol.....	40
Figura 10 Resveratrol.....	39
Figura 11 Taxifolin.....	40
Figura 12 Tran- pinosylvin.....	40
Figura 13 Thurjone.....	40
Figura 14 Camphene 3 - carene.....	40
Figura 15 alpha-terminene.....	40
Figura 16 trans- Piceatannol.....	40
Figura 17 Cis- stilbenes.....	40
Figura 18 Trans- piceid.....	40
Figura 19 Imagen del macerado metanólico de estróbilos de Pino moctezumae.....	46
Figura 20. Columna de separación.....	48
Figura 21 Estándares del método de McFarland.....	52
Figura 22 Ilustración del orden de la microplaca.....	54
Figura 23 Imágenes representativas de TLC sobre la comparación de extracto por soxhlet vs. maceración de estróbilos de Pinus.....	55
Figura 24 Imagen representativa de TLC de la fracción 1 – 6.....	56
Figura 25 Imagen representativa de TLC de la fracción 7 – 13.....	58
Figura 26 Imagen representativa de TLC de la fracción 14 – 19 (se juntan todas).....	60
Figura 27 Imagen representativa de TLC de la fracción 20 – 25.....	61
Figura 28 Imagen representativa de TLC de la fracción 26 – 32 (aislar la 30).....	62
Figura 29 Imagen representativa de TLC de la fracción 33 – 38.....	63

Figura 30 Imagen representativa de TLC de la fracción 39 – 43 (Se juntaron todas por el color amarillo característico)	64
Figura 31 Imagen representativa de TLC de la fracción 44 – 48	65
Figura 32 Imagen representativa de TLC de la fracción 49 – 54 (53 y 54 juntar)	66
Figura 33 Imagen representativa de TLC de la fracción 55-61 (no hay compuestos)	67
Figura 34 Imagen representativa de TLC de la fracción 62 – 68 (no hay compuestos) ...	68
Figura 35 Imagen representativa de TLC de la fracción 69 – 75 (ninguna)	69
Figura 36 Imagen representativa de TLC de la fracción 76 – 82 (no hay compuestos) ...	70
Figura 37 Imagen representativa de TLC de la fracción 83 – 89 (ninguna)	71
Figura 38 Imagen representativa de TLC de la fracción 97 – 101 (no hay compuesto) ...	72
Figura 39 Imagen representativa de TLC de la fracción 102 – 105	73
Figura 40 Interpretación de la regla general de los diámetros del halo de inhibición en los antibiogramas	75
Figura 41 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total sobre la bacteria <i>S. aureus</i>	76
Figura 42 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total sobre la bacteria <i>E. coli</i>	77
Figura 43 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total sobre la bacteria <i>S. pyogenes</i>	78
Figura 44 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total sobre la bacteria <i>S. typhi</i>	79
Figura 45 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico recolectadas en fracción de 1 a la 10 sobre la bacteria <i>S. pyogenes</i>	80
Figura 46 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico recolectadas en fracción de 1 a la 10 sobre la bacteria <i>E. coli</i>	81
Figura 47 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico recolectadas en fracción de 1 a la 10 sobre la bacteria <i>S. aureus</i>	82
Figura 48 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico recolectadas en fracción de 1 a la 10 sobre la bacteria <i>S. pyogenes</i>	83
Figura 49 Diagrama de antibiogramas por cada fracción	84
Figura 50 Diagrama de antibiogramas por cada fracción	85
Figura 51 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total recolectadas en la fracción de 1	86

Figura 52 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanolico total recolectadas en la fracción de 2.....	87
Figura 53 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanolico total recolectadas en la fracción de 3.....	88
Figura 54 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanolico total recolectadas en la fracción de 4.....	89
Figura 55 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanolico total recolectadas en la fracción de 5.....	90
Figura 56 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanolico total recolectadas en la fracción de 6.....	91
Figura 57 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanolico total recolectadas en la fracción de 7.....	92
Figura 58Imagenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanolico total recolectadas en la fracción de 8.....	93
Figura 59 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanolico total recolectadas en la fracción de 9.....	94
Figura 60 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanolico total recolectadas en la fracción de 10.....	95
Figura 61. Curva de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> con extracto metanólico total de 10,000 ppm - 0.001 ppm.....	110
Figura 62. Curva de crecimiento de la cepa <i>S. aureus</i> con extracto metanólico total de 10,000 ppm -0.001 ppm.....	111
Figura 63. Curva de crecimiento de la cepa <i>S. Pyogenes</i> con extracto metanólico total de 10,000 ppm -0.001 ppm.....	112
Figura 64. Curva de crecimiento de la cepa <i>S. typhi</i> con extracto metanólico total de 10,000 ppm -0.001 ppm.....	113

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Especies del género Pinus [48].	27
Tabla 2 Clasificación taxonómica de Pinus moctezumae	34
Tabla 3 Constituyentes fitoquímicos presentes en las coníferas (Pinus).	35
Tabla 4 Resultado posterior a la concentración de las fracciones elegidas	48
Tabla 5 Cantidad de BaCl ₂ y H ₂ SO ₄ para el control de la concentración de las bacterias	51
Tabla 6 Resultados de TLC fracción 1-6	56
Tabla 7 Resultados de TLC fracción 7-13	58
Tabla 8 Resultados de TLC fracción 14-19	60
Tabla 9 Resultados de TLC fracción 20-25	61
Tabla 10. Resultados de TLC fracción 26-32	62
Tabla 11 Resultados de TLC fracción 33-38.	63
Tabla 12 Resultados de TLC fracción 39-43	64
Tabla 13 Resultados de TLC fracción 44-48	65
Tabla 14 Resultados de TLC fracción 49-54	66
Tabla 15 Resultados de TLC fracción 55-61.	67
Tabla 16 Resultados de TLC fracción 62-68.	68
Tabla 17 Resultados de TLC fracción 69-75.	69
Tabla 18 Resultados de TLC fracción 76-82	70
Tabla 19 Resultados de TLC fracción 83 - 89.	71
Tabla 20 Resultados de TLC fracción 97-101.	72
Tabla 21 Resultados de TLC fracción 102-105.	73
Tabla 22 Resultados de las agrupaciones de cada fracción del extracto de estróbilos de Pinus moctezumae	74
Tabla 23 Medición del halo de inhibición de <i>S.typhi</i> (fracción 1).	96
Tabla 24 Medición del halo de inhibición de <i>E. coli</i> (fracción 1).	96
Tabla 25 Medición del halo de inhibición de <i>S. pyogenes</i> (fracción 1).	96
Tabla 26 Medición del halo de inhibición de <i>S. aureus</i> (fracción 1)	97
Tabla 27 Medición del halo de inhibición de <i>S. typhi</i> (fracción 2).	97
Tabla 28 Medición del halo de inhibición de <i>E. coli</i> (fracción 2).	97
Tabla 29 Medición del halo de inhibición de <i>S. pyogenes</i> (fracción 2).	98
Tabla 30 Medición del halo de inhibición de <i>S. aureus</i> (fracción 2)	98
Tabla 31 Medición del halo de inhibición de <i>S. typhi</i> (fracción 3).	98

Tabla 32 Medición del halo de inhibición de <i>E. coli</i> (fracción 3).....	99
Tabla 33 Medición del halo de inhibición de <i>S. pyogenes</i> (fracción 3).....	99
Tabla 34 Medición del halo de inhibición de <i>S. aureus</i> (fracción 3)	99
Tabla 35 Medición del halo de inhibición de <i>S. typhi</i> (fracción 4).....	100
Tabla 36 Medición del halo de inhibición de <i>E. coli</i> (fracción 4).....	100
Tabla 37 Medición del halo de inhibición de <i>S.pyogenes</i> (fracción 4).....	100
Tabla 38 Medición del halo de inhibición de <i>S. aureus</i> (fracción 4)	101
Tabla 39 Medición del halo de inhibición de <i>S. typhi</i> (fracción 5).....	101
Tabla 40 Medición del halo de inhibición de <i>E. coli</i> (fracción 5).....	101
Tabla 41 Medición del halo de inhibición de <i>S. pyogenes</i> (fracción 5).....	102
Tabla 42 Medición del halo de inhibición de <i>S. aureus</i> (fracción 5)	102
Tabla 43 Medición del halo de inhibición de <i>S. typhi</i> (fracción 6).....	102
Tabla 44 Medición del halo de inhibición de <i>E. coli</i> (fracción 6).....	103
Tabla 45 Medición del halo de inhibición de <i>S. pyogenes</i> (fracción 6).....	103
Tabla 46 Medición del halo de inhibición de <i>S. aureus</i> (fracción 6)	103
Tabla 47 Medición del halo de inhibición de <i>S. typhi</i> (fracción 7).....	104
Tabla 48 Medición del halo de inhibición de <i>E. coli</i> (fracción 7).....	104
Tabla 49 Medición del halo de inhibición de <i>S. pyogenes</i> (fracción 7).....	104
Tabla 50 Medición del halo de inhibición de <i>S. aureus</i> (fracción 7)	105
Tabla 51 Medición del halo de inhibición de <i>S. typhi</i> (fracción 8).....	105
Tabla 52 Medición del halo de inhibición de <i>E. coli</i> (fracción 8).....	105
Tabla 53 Medición del halo de inhibición de <i>S.pyogenes</i> (fracción 8).....	106
Tabla 54 Medición del halo de inhibición de <i>S. aureus</i> (fracción 8)	106
Tabla 55 Medición del halo de inhibición de <i>S. typhi</i> (fracción 9).....	106
Tabla 56 Medición del halo de inhibición de <i>E.coli</i> (fracción 9).....	107
Tabla 57 Medición del halo de inhibición de <i>S.pyogenes</i> (fracción 9).....	107
Tabla 58 Medición del halo de inhibición de <i>S. aureus</i> (fracción 9)	107
Tabla 59 Medición del halo de inhibición de <i>S. typhi</i> (fracción 10).....	108
Tabla 60 Medición del halo de inhibición de <i>E.coli</i> (fracción 10).....	108
Tabla 61 Medición del halo de inhibición de <i>S. pyogenes</i> (fracción 10).....	108
Tabla 62 Medición del halo de inhibición de <i>S. aureus</i> (fracción 10)	109

ABREVIATURAS

°C : Grados Celsius

µg: Microgramo

µl: Microlitro

cm: Centímetro

atm: Atmosfera

g: Gramos

mm: Milímetro

ml: Mililitro

mg: Miligramo

ppm: Partes por Millón

rpm: Revoluciones por minuto

UV: Ultravioleta

Vol: Volumen

UAEM: Universidad Autónoma del Estado de Morelos

CC: Carbono- Carbono

Met: Metanol

Ac: Acetato de etilo

hrs: Horas

msnm: Metros sobre el nivel del mar.

Fórmulas de compuestos:

CH_2Cl_2 : Diclorometano

BaCl_2 : Cloruro de Bario

H_2SO_4 : Ácido Sulfúrico

$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$: Acetato de Etilo

CH_3OH : Metanol

H_2O : Agua Destilada

NaCl : Cloruro de Sodio

Definiciones:

Antibiótico: Agente biológico o químico que inhibe el crecimiento de los microorganismos

Cepa: Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento

Colonia: Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente.

Concentración Inhibitoria mínima (CIM): Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación

Disco de sensibilidad: Discos impregnados con algún antimicrobiano usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión.

Escala de Mc. Farland: Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5.

Esterilización: Proceso validado que permite la eliminación de toda forma de vida microbiana incluyendo endosporas bacterianas. Puede conseguirse por medio de métodos químicos, físicos o gaseosos.

Incubación: Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación

Vortex: Agitador para tubos

Inóculo: Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y multiplicación

Medio de Cultivo: Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana in vitro.

Resistente : Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad in vitro. Las cepas bacterianas incluidas en esta categoría no son inhibidas por las concentraciones séricas del antibiótico normalmente alcanzadas con las dosis habituales del mismo, poseen comúnmente mecanismos específicos de resistencia bacteriana o la eficacia clínica del antibiótico frente a la bacteria no ha sido comprobada.

Sensible : Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad in vitro. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones.

RESUMEN

Las plantas medicinales se han utilizado durante mucho tiempo como fuente de remedios tradicionales en casi todas las culturas [1]. Los productos naturales son una valiosa fuente de componentes químicos en medicina y farmacología. La naturaleza proporciona un suministro interminable de nuevos fitoquímicos, a los que se hace referencia como productos naturales (PN), y el desarrollo de fármacos de productos naturales es una tarea difícil para desarrollar nuevas pistas [2]. La medicina tradicional (MT) es valiosa porque utiliza productos naturales; por ejemplo, Ayurveda, Kampo, la medicina tradicional china (MTC), la medicina tradicional coreana (TKM) y Unani utilizan productos naturales y se ha practicado durante miles de años, convirtiéndose en un sistema de médico bien regulado [3].

El aumento de la resistencia bacteriana en años recientes ha causado una gran preocupación ya que la eficacia de los antibióticos utilizados de forma habitual para tratar infecciones de tipo bacteriana ha disminuido significativamente [4], lo cual es una señal de alarma, debido a que la velocidad a la que se desarrollan nuevos medicamentos es más lenta que el aumento de la generación de resistencia bacteriana ante los antibióticos existentes[5].

Este trabajo se enfocó en la caracterización antimicrobiana del extracto de estróbilos de Pino (*Pinus* sp.) de la especie ***moctezumae***, una especie de conífera con propiedades antibióticas y antioxidantes. Para la caracterización, se obtuvo por extracción mediante Soxhlet y maceración sobre el disolvente de metanol. Se obtuvo mediante el procedimiento de separación del extracto metanólico con ayuda de la cromatografía en columna separando por fracciones cada componente, Para este proyecto también se realizaron pruebas mediante ensayos de difusión en disco para comparar el efecto antibiótico del extracto metanólico y las fracciones extraídas utilizando un antibiótico de referencia y demostrar el poder antibiótico de los componentes naturales.

Las bacterias con mayor efecto antimicrobiano fue la *E. coli* , *S. aureus* y *S.typhi*.

INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son agentes químicos o sustancias naturales que inhiben o eliminan el crecimiento de microorganismos, principalmente bacterias, y tienen un papel crucial en el tratamiento de infecciones bacterianas en seres humanos y animales. Desde su descubrimiento en la primera mitad del siglo XX, los antibióticos han revolucionado la medicina y han contribuido significativamente a la reducción de la mortalidad causada por enfermedades infecciosas causadas por bacterias[6].

Es un hecho que una serie de enfermedades infecciosas han sido tratadas con medicinas a base de hierbas a lo largo de la historia de la humanidad. Debido a la incomparable disponibilidad de diversidad química, los extractos de plantas, ya sea como productos naturales estandarizados o como compuestos puros, han abierto perspectivas ilimitadas para nuevos fármacos. Es una necesidad urgente y continua que se descubran nuevos compuestos antimicrobianos que tengan nuevos mecanismos de acción y estructuras químicas diversas para enfermedades infecciosas nuevas y reemergentes [7].

La OMS ha declarado que la resistencia a los antimicrobianos es una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad, el uso indebido y excesivo de los antimicrobianos es el principal factor que determina la aparición de patógenos farmacorresistentes.

La aparición y propagación de patógenos farmacorresistentes que han adquirido nuevos mecanismos de resistencia, lo que conduce a la resistencia a los antimicrobianos, siguen comprometiendo nuestra capacidad para tratar infecciones comunes. Es especialmente alarmante la rápida propagación mundial de bacterias multirresistentes y panresistentes (denominadas también “superbacterias”) que provocan infecciones que no pueden tratarse con los medicamentos antimicrobianos al uso, como los antibióticos.

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno que aparece de forma natural con el tiempo, generalmente por modificaciones genéticas. Los organismos resistentes a los antimicrobianos están presentes en las personas, los animales, los alimentos, las plantas y el medio ambiente (agua, suelo y aire). Pueden propagarse de una persona a otra o entre las personas y los animales, en particular a partir de alimentos de origen animal. Entre los principales factores de la resistencia a los antimicrobianos se encuentran los siguientes: el uso indebido y excesivo de antimicrobianos; la falta de acceso a agua limpia, saneamiento

e higiene , tanto para las personas como para los animales; la adopción de medidas deficientes de prevención y control de las enfermedades y las infecciones en los centros de atención de salud y las explotaciones agrícolas; el acceso deficiente a medicamentos, vacunas y medios de diagnóstico asequibles y de calidad; la falta de sensibilización y conocimientos; y el incumplimiento de la legislación [8].

Es importante saber que dependiendo de la composición química del fármaco también de la acción y el espectro de estos fármacos es como se clasifica los antimicrobianos:

- Virus = antiviral
- Bacterias = antibacterianos
- Hongos = antifúngicos
- Antiparásitos = antiparásitos

Podemos tener que un fármaco podría ser sólo contra bacterias, virus, hongos y contra parásitos en algunos casos. [9].

Algunos medicamentos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos dependiendo de la concentración de medicamentos, presencia de otros medicamentos y especies bacterianas.

En términos de espectro de actividad: Podemos tener antimicrobianos que tienen un espectro muy amplio que se puede utilizar para muchas especies de bacterias que podrían estar presentes en una infección o un espectro muy estrecho que están dirigidos a grupos más pequeños

- Amplia
- Angosta

Hoy en día , las enfermedades infecciosas se han convertido a nivel mundial en una de las principales causas de muerte, por lo que su estudio se ha convertido en una preocupación mundial [10]. La aparición de resistencia a múltiples fármacos en los patógenos está amenazando la eficacia clínica de muchos antibióticos existentes [11].

Por otra parte, es importante resaltar que la resistencia a antibióticos es una de las mayores amenazas hoy en día para la salud pública, seguridad alimentaria y desarrollo de los países de acuerdo con la (OMS), también podría estar relacionada con la contaminación atmosférica y, en específico, con las llamadas partículas PM2.5. Posteriormente la investigación de estos científicos establece que las partículas PM2.5 pueden llevar no sólo compuestos tóxicos, sino también bacterias resistentes a los antibióticos. ¿Por qué? Porque

si en un lugar hay un problema de defecación al aire libre, por ejemplo, y el excremento se seca y revolotea en el aire, dichas partículas pueden cargarse con las bacterias que contiene aquél y ser respiradas por las personas, además de bacterias, las partículas PM2.5 pueden contener el ácido desoxirribonucleico (ADN) de éstas [12].

Ahora bien, si las bacterias mueren, entonces su ADN permanece ahí, y una vez que las partículas PM2.5 entran en el organismo de una persona a través de las vías respiratorias y el tracto gastrointestinal, puede haber una transferencia lateral de ADN de alguna bacteria resistente a los antibióticos, quizá ni siquiera pertenecientemente relacionada con las que ese individuo tiene, y generar esa misma resistencia en otras bacterias [13].

La resistencia de las bacterias a los antibióticos cuesta mucho dinero, porque implica incapacidad laboral, gastos médicos, estancias hospitalarias más largas, etcétera.

Las cepas que se utilizaron en este estudio fueron las siguientes:

Escherichia coli

Es la flora facultativa no patógena predominante del intestino humano, sin embargo, algunas cepas de *E. coli* han desarrollado la capacidad de causar enfermedades del sistema gastrointestinal, urinario o nervioso central incluso en los huéspedes humanos más robustos.

Por lo general, la bacteria ***Escherichia coli*** (*E. coli*) vive en los intestinos de las personas y de los animales sanos. La mayoría de las variedades de ***Escherichia coli*** son inofensivas o causan diarrea breve. Sin embargo, algunas cepas, como la ***Escherichia coli*** O157:H7, pueden causar cólicos abdominales intensos, diarrea con sangre y vómitos [14].

Puedes estar expuesto a la ***Escherichia coli*** proveniente de agua o de alimentos contaminados, sobre todo de los vegetales crudos y de la carne de res molida poco cocida. Los adultos sanos suelen recuperarse de la infección por *E. coli* O157:H7 en el plazo de una semana. Los niños pequeños y los adultos mayores presentan un mayor riesgo de desarrollar un tipo de insuficiencia renal que pone en riesgo la vida.

Los signos y síntomas de la infección por *E. coli* O157:H7 suelen aparecer tres o cuatro días después de la exposición a la bacteria. Pero puedes enfermarte al día siguiente de

haber estado expuesto, o más de una semana después. Los signos y síntomas [15] incluyen los siguientes:

- Diarrea, que puede ser variar entre leve y líquida y grave con sangre
- Calambres estomacales, dolor o sensibilidad en el estómago
- Fiebre , náuseas y vómitos en algunas personas.

Principal tratamiento:

Azitromicina, Ciprofloxacino, Bismuto, Levofloxacino , Metronidazol, Ofloxacina, Electrolitos orales.

Salmonella typhi

La infección por salmonela (salmonelosis) es una enfermedad bacteriana común que afecta el tubo intestinal. La bacteria de la salmonela generalmente vive en los intestinos de animales y humanos y se expulsa mediante las heces (materia fecal). La forma más frecuente de infección en los humanos es a través de agua o alimentos contaminados [16].

La infección por salmonela suele ser producto de la ingesta de carne, carne de aves, huevos o productos a base de huevo crudos o poco cocidos, o de leche no pasteurizada. El período de incubación (el tiempo entre la exposición y la enfermedad) puede ser de 6 horas a 6 días. Con frecuencia, las personas que tienen infección por salmonela creen que tienen gripe estomacal. [17].

Entre los posibles signos y síntomas de la infección por salmonela se incluyen los siguientes:

- Diarrea
- Cólicos estomacales (abdominales)
- Fiebre
- Náuseas
- Vómitos
- Escalofríos
- Dolor de cabeza
- Sangre en las heces

Los signos y síntomas de la infección por salmonela generalmente duran de unos pocos días a una semana. La diarrea puede durar hasta 10 días, pero es posible que pasen varios meses antes de que los intestinos vuelvan a la deposición de heces habitual.

Algunas variedades de la bacteria salmonela provocan fiebre tifoidea, una enfermedad que puede ser mortal y que es más común en los países en desarrollo [18].

Principal tratamiento:

Ampicilina, Amoxicilina, Trimetoprim, Ciprofloxacina, Cefixima, Cloranfenicol.

Staphylococcus aureus

Las infecciones se producen a causa de la bacteria estafilococo. Este tipo de gérmenes suelen encontrarse en la piel o en la nariz de muchas personas sanas. La mayoría de las veces, estas bacterias no provocan problemas o causan infección es cutáneas relativamente menores [19].

Sin embargo, las infecciones por estafilococo pueden volverse mortales si las bacterias invaden el organismo e ingresan en el torrente sanguíneo, las articulaciones, los huesos, los pulmones o el corazón. Cada vez más personas sanas desarrollan infecciones por estafilococo que pueden poner en riesgo la vida [20].

En el tratamiento, por lo general, se usan antibióticos y se limpia la zona infectada. Sin embargo, algunas infecciones por estafilococo ya no responden o se vuelven resistentes a los antibióticos comunes.

Las bacterias estafilocócicas pueden enfermarte y causar una infección. También pueden enfermarte las toxinas que produce la bacteria [21] .

Las bacterias estafilocócicas sobreviven:

- Al secado
- A las temperaturas extremas
- Al ácido estomacal

Principal tratamiento :

Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Metronidazol.

Streptococcus Pyogenes

Es una bacteria de las cuales existen unos 80 serotipos diferentes. Entre las enfermedades más frecuentes que causa se encuentran la angina y las infecciones de la piel. Se presentan principalmente en niños de entre 4 y 10 años, durante la primavera y el otoño. Puede afectar también a las personas adultas. Otras enfermedades que puede producir son la escarlatina, erisipela (infección de la piel), otitis media y fiebre puerperal [22].

Los síntomas más frecuentes de la angina son: fiebre, dolor de garganta o al tragar, y agrandamiento de ganglios del cuello. En el caso de las infecciones superficiales de la piel, se puede presentar: fiebre, dolor localizado en una zona, enrojecimiento y si progresa ampollas pequeñas y algunas costras [23].

Tratamiento principal:

Amoxicilina, Cefalosporina , Clindamicina.

Por lo tanto, el desarrollo de investigación en el potencial antibiótico que pueden tener los extractos de componentes naturales aumenta y abre el panorama para tener más opciones que la vía sintética de antibióticos efectivos y que permitan desarrollar métodos efectivos para la obtención de extractos que sirvan como modelo para generar antibióticos en un futuro cercano. La obtención de los extractos de componentes vegetales es un camino que debe mejorarse y afinarse, debido a todas las implicaciones de tiempo y gasto que se tienen con estos [24].

Medicina tradicional para el tratamiento de infecciones

En la actualidad existe preocupación por el abuso de antibióticos sintéticos, ya que las bacterias pueden volverse resistentes a ellos. En este sentido, los productos de origen natural con efecto antibiótico ayudan a combatir infecciones sin generar resistencia.

En algunos casos de resfriado o gripe no suelen prescribirse antibióticos en forma de fármaco. En cambio, se sugiere el uso de antibióticos de origen natural como complemento de otros tratamientos médicos.

Por esta razón, los “antibióticos naturales” siguen siendo auxiliares terapéuticos. Ante cualquier infección, lo mejor es consultar a un especialista y seguir sus indicaciones [25]

Ajo [*Allium sativum*]

Este alimento tan común en nuestros platos es considerado por muchos como uno de los “antibióticos naturales” por excelencia. El sulfuro de alilo que contiene es capaz de matar bacterias, hongos y virus. Lo mejor es que lo hace sin afectar al microbiota intestinal.

Cebolla [*Allium cepa*]

Otra de las estrellas de la cocina también podría combatir infecciones por bacterias. En específico, es eficaz para controlar aquellas que afectan a las vías respiratorias y a la piel.

Equinácea [*Echinacea purpurea*]

Es una planta con actividad farmacológica contra bacterias, hongos y virus. Además, algunas variedades podrían estimular el sistema inmunológico, por lo que reforzarían las defensas contra las infecciones.

Propóleo [*Própolis*]

Se trata de una sustancia producida por las abejas. Funciona como “cemento” natural para estos animalitos, pero también ayuda a evitar infecciones en la colmena. Por eso, los humanos aprovechamos sus cualidades antibacterianas, antivirales, antifúngicas y antiprotazoarias.

Miel [*Apis mellifera*]

Gracias a sus propiedades antisépticas, expectorantes, vigorizantes y cicatrizantes, se considera un producto con efecto antibiótico. Además, suele utilizarse tópicamente para curar heridas en la piel.

Romero [*Salvia rosmarinus*]

Es una de las plantas más utilizadas entre los “antibióticos naturales” para infecciones. Como infusión, puede combatir gérmenes que afectan las vías respiratorias y los intestinos.

Otras especies con potencial uso terapéutico en enfermedades infecciosas.

Las plantas coníferas, como las plantas pertenecientes a los géneros *Taxus*, *Cupressus*, *Picea*, *Pinus*, *Cedrus* y *Araucaria*, se encuentran en todo el mundo y han mostrado varias actividades beneficiosas contra enfermedades, destacando la importancia de las coníferas en el desarrollo de fármacos [27]. Las coníferas son leñosas, tienen hojas uninervadas en forma de aguja y constan de conos unisexuales masculinos y femeninos con escamas de brácteas [28]. Comprenden ocho familias (*Pinaceae*, *Araucariaceae*, *Cupressaceae*, *Podocarpaceae*, *Cephalotaxaceae*, *Taxaceae*, *Phyllocladaceae*, *Sciadopityaceae*), 70 géneros y 630 especies [29]. Varios géneros incluyen una gran cantidad de especies, como *Pinus* (110), *Podocarpus* (105), *Juniperus* (55), *Abies* (50), *Picea* (35), *Dacrydium* (21), *Taxodium* (29) *Pseudotsuga* (22), *Agathis* (22), *Araucaria* (19) y *Taxus* (19), mientras que hay algunos géneros que contienen un número menor de especies, como *Larix* (10), *Cedrus* (4), *Torreya* (6) y *Cryptomeria* (1) [30]. Se pueden encontrar en abundancia en bosques tropicales de tierras bajas y submontaños.

Familia Pinaceae

Los pinos pertenecen al grupo de las coníferas, que representan cerca de 60 % de las 900 especies de gimnospermas [31], y en el caso de los pinos, se estima la existencia de 111 especies en todo el planeta [32].

Las pináceas son coníferas que poseen canales de resina en la madera y las hojas. Sus hojas son lineales o en forma de acículas. Son especies monoicas (tiene separadas las flores de cada sexo, pero en un mismo pie). Los conos son complejos, dispuestos en espiral

y aplanados. Las brácteas están libres de la escama, y tienen dos óvulos invertidos, y semillas con un ala larga terminal [33]

Es un grupo de plantas que se consideran los pulmones de las ciudades por la gran cantidad de oxígeno que producen, tienen una gran importancia económica porque se usan para construir casas, papel, fuente de resinas, barnices, encolantes, artesanía, tienen estróbilos, hojas en forma de aguja [34].

El pino es la principal conífera de clima templado y frío en México, se distribuye en 24 estados de la república, de los cuales sobresalen dos en la región Centro Norte del país, uno en la Occidente, uno más en el sur y dos en la Golfo Centro, Están representadas por 4 familias: **Pinaceae** (4 géneros y 61 especies), **Cupressaceae** (4 géneros y 29 especies), **Podocarpaceae** (1 género y 3 especies) y **Taxaceae** (1 especie). De las 94 especies de coníferas mexicanas, 43 son endémicas del país, de éstas 18 tienen un rango de distribución limitado a 3 o menos estados [35].

Las especies de pino son originarias del hemisferio Norte, y en el continente americano se localizan desde los 66°00'00"N, en el norte de Canadá, hasta los 12°00'00"N hacia el sur de Nicaragua [36]. En las sierras Madre Oriental y Occidental de México se asienta la mayor diversidad del género ***Pinus* (Pinaceae)** en el mundo, con alrededor de 400 taxones.

Genero *Pinus*

México es considerado un centro secundario de diversidad del género *Pinus*. Un análisis de la literatura más reciente indica que los pinos migraron hacia el actual territorio mexicano desde el hemisferio norte a través de corredores naturales e impulsados por los cambios climáticos del pasado. Los pinos mexicanos son uno de los recursos naturales más valiosos por su uso tradicional y comercial, por su importancia cultural y por los servicios ambientales que ofrecen. A pesar de ello la continua disminución de la cobertura de los bosques de pino y pino-encino, por causa de las actividades humanas y por los incendios forestales, es alarmante. Al menos 20 taxa de pinos mexicanos están en alguna categoría de riesgo y dos de ellos: ***Pinus maximartinezii*** y ***P. muricata*** se encuentran en peligro de extinción. Los programas nacionales e internacionales para el uso sostenible y la conservación del género *Pinus* en México aún no son eficientes y suficientes[37].

Pinus es un género de plantas vasculares (generalmente árboles y raramente arbustos), comúnmente llamadas pinos [38] pertenecientes al grupo de las coníferas y, dentro de este, a la familia de las Pinaceae, que presentan una ramificación frecuentemente verticilada y más o menos regular [39].

Comprenden ocho familias (***Pinaceae***, ***Araucariaceae***, ***Cupressaceae***, ***Podocarpaceae***, ***Cephalotaxaceae***, ***Taxaceae***, ***Phyllocladaceae***, ***Sciadopityaceae***), 70 géneros y 630 especies [40]. Varios géneros incluyen una gran cantidad de especies, como *Pinus* (110),

La riqueza aproximada de especies de pinos a nivel mundial es de 111 especies . En México y América Central se localizan alrededor de 46 especies de pinos, con diversas variedades y formas. México es un centro secundario de diversidad de *Pinus* al contar con cerca de 42% de las especies y un alto porcentaje de endemismos (>55%) concentrados en islas biogeográficas. Tal es el caso de los pinos piñoneros, que habitan en pequeñas sierras de las zonas áridas y semiáridas del norte de México, y de los pinos alpinos como *P hartwegii* y *P culminicola*. Así como de los que han evolucionado en áreas tropicales: *P caribea* y *P oocarpa* [41].

Estas son algunas de las especies del género *Pinus*: *P. cembroides* ,subsp. *lagunae* , *P. devoniana* ,*P. douglasiana* , *P. engelmannii* , *P. durangensis*, *P. leiophylla* *P. herrerae* var. *chihuabuana* , *P. jaliscana*, *P.oocarpa* , *P/leiophylla*, *P. teocote* var. *leiophylla*, *P maximartinezii*, *P. strobiformis*, *P. moctezumae*, *P. teocote*, *P. pinceana*, *P.greggi*, *P.remota*, *P. nelsonii*, *P. patula*,*P.arizonica*, etc.

En botánica un cono o estróbilo es una estructura basada en un eje terminal, alrededor del cual se despliegan hojas reproductivas con una disposición generalmente helicoidal. En este sentido más amplio cono es sinónimo de estróbilo, término que suele preferirse en las publicaciones científicas.

Cono (**conus**) es el nombre que en latín se empleaba para designar lo que en español se llama piña. Muchos prefieren restringir el uso del término a este significado original o, al menos, al grupo biológico de las coníferas (división *Pinophyta*), aunque sea incluyendo también a las estructuras masculinas.

Los conos femeninos están formados por escamas gruesas e inicialmente apretadas, llamadas *brácteas tectrices* (portadoras), sobre cada una de las cuales se encuentran una

o varias brácteas seminíferas. Éstas se interpretan como megasporofilos (hojas portadoras de megasporas) y después de la polinización y la subsecuente fecundación, deben transformarse en semillas[42].

Los conos femeninos se llaman piñas en los pinos y otras pináceas (fam. ***Pinaceae***), pero pueden tener otros nombres y aspecto en coníferas distintas; así se llaman *gálbulas* y *arcéstidas* respectivamente en los cipreses y los enebros, miembros de la familia cupresáceas (*Cupressaceae*).

Los conos masculinos son siempre mucho más pequeños que los femeninos, y se agrupan alrededor del final de las ramas en cuyo extremo crecen los renuevos del año. En ellos sólo hay una clase de escamas, las *brácteas poliníferas* (portadoras del polen). Su posición favorece la dispersión del polen, que en las coníferas es transportado por el viento (anemofilia)[43].

Se tienen antecedentes que señalan que las coníferas a donde es perteneciente el estróbilo estudiado contienen metabolitos secundarios que pueden combatir a especies patógenas para el ser humano, causantes de infecciones y enfermedades.

Contienen metabolitos secundarios que activan el mecanismo de defensa de la planta [44]. Los tres grupos fitoquímicos principales, a saber. Los terpenoides (ácidos resínicos y terpenos), alcaloides (piperidinas) y polifenoles (ácidos fenólicos, flavonoides, proantocianidinas, lignanos, acetofenonas y estilbenos) [45]. Es muy importante comprender el camino evolutivo de las Gimnospermas, donde las coníferas representan el núcleo.

CONIFERAS EN MORELOS

En la actualidad algunas de las características más importantes que habitan en la zona norte de Morelos es su vegetación, ya que en el norte se localiza el Parque Nacional El Tepozteco, el Parque Nacional Lagunas de Zempoala y el área de protección de flora y fauna silvestres Corredor Biológico Chichinautzin, que une a los dos parques, también se puede encontrar el bosque de la UAEM (Cuernavaca) en donde encontramos principalmente la especie de *Pinus moctezumae* [46].

Se distribuyen bosques de clima templado representados por asociaciones de pino, pino-encino y bosque mesófilo de montaña [47].

Tabla 1 Especies del género Pinus [48].

	I	II	III	IV	V	VI
4		P. cembroides var. bicolor P. flexilis var. reflexa P.strobiformis P. teocote	P. hartwegii P.moctezumae P.pseudostrobus + var. Apulcensis P.strobiformis P.teocote P.moctezumae P.pseudostrobus P. teocote P. strobiformis	P.ayacahuite +var. Veitchii P.culminicola P.flexilis var. Reflexa P.hartwegii	P.ayacahuite P.hartwegii P.moctezumae P.pseudostrobus +var.apulcensis P.teocote	P.ayacahuite P.hartwegii P.moctezumae P.pseudostrobus +all varieties
3	P.contorta Var. murrayana P.coulteri P.jeffreyi P.lambertiana P.monophylla P.quadrifolia P. radiata var. binata	P.arizonica + var.cooperi P.cembroides P.devoniana P.engelmennii P.leiophylla Var.chihuahuana P. leiophylla Var. Leiophylla P. leiophylla P.oocarpa P.teocote	P. cembroides Subsp. Lagunae P.devoniana P.douglasiana P.durangensis P.herreriae P.jaliscana P.leiophylla var. chihuahuana P.leiophylla Var. leiophylla P.maximartinezii P.maximinoi P.oocarpa P.praetermissa P.pseudostrobus +var.apulcensis P.rzedowskii P.teocote	P.arizonica Var.stormiae P.cembroides +subsp. orizabensis P.devoniana P.engelmannii P.greggii P.leiophylla Var. leiophylla P.montezumae P.nelsonii P.patula +variety P.pinceana P.pseudostrobus P.remota P.teocote	P.cembroides P.devoniana P.douglasiana P.herreriae P.lawsonii P.leiophylla var.leiophylla P.maximinoi P.moctezumae +var.gordoniana P.oocarpa+ var. P.patula+ var. P.pringlei P.pseudostrobus +var.apulcensis P.strobus var. Chiapensis P.tecunumanii P.teocote	P.devoniana P.tecunumanii P.maximinoi P.moctezumae P.oocarpa P.pseudostrobus +all varieties P.strobus var. chiapensis
2	P.attenuata				P.devoniana P.maximinoi	P.devoniana P.maximinoi
1	P.muricata					P.caribaea var. hondurensis
	I	II	II	IV	V	VI

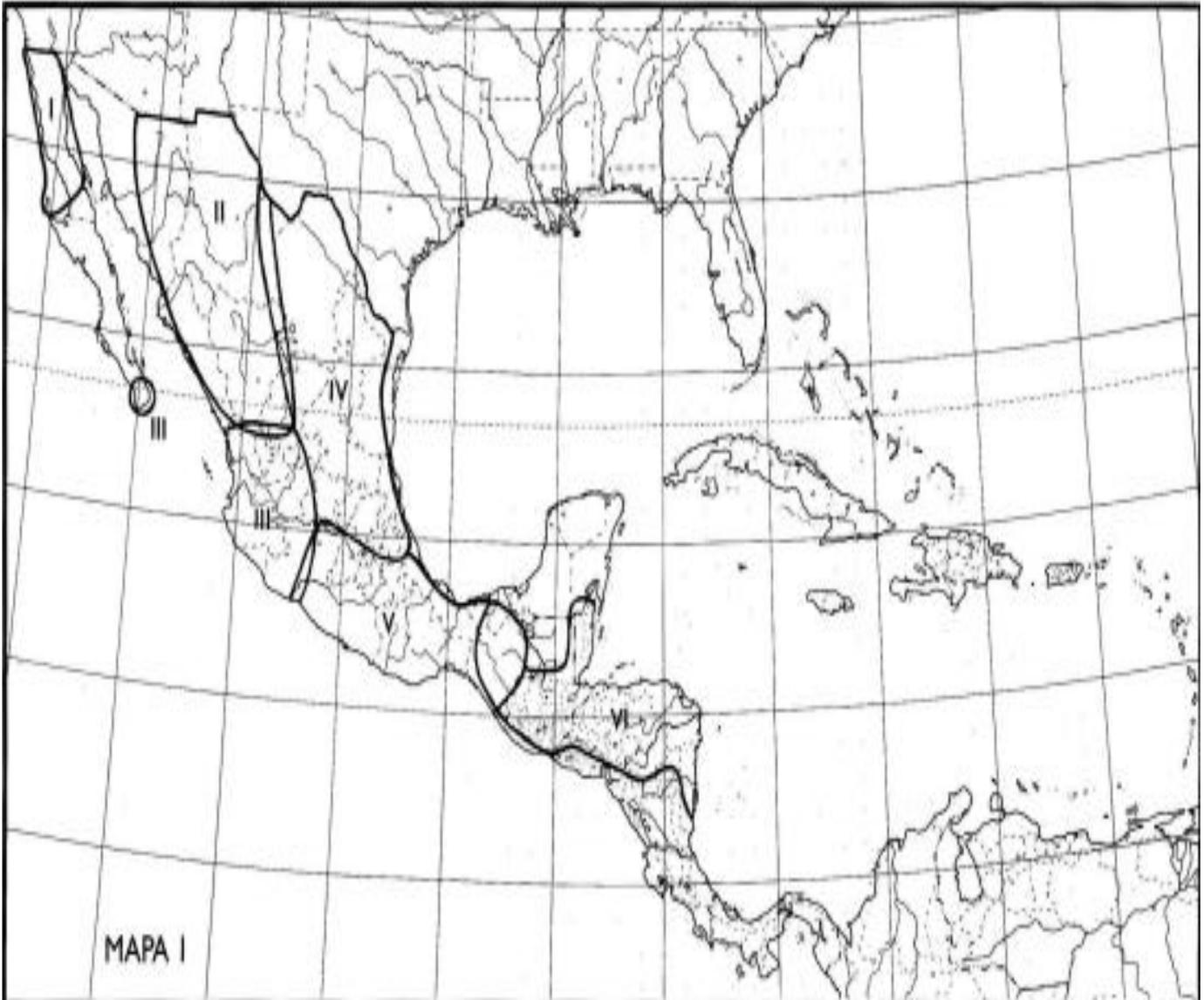


Figura 1 Distribución de especies del género *Pinus* [49].

En este mapa de México se puede observar la distribución de las especies del género ***Pinus*** que habitan actualmente y cómo es que están divididas las zonas de acuerdo con relación en la tabla 1. De acuerdo con la figura 1, se indica que en este mapa de México es el mayor estado con más abundancia en ***Pinus moctezumae*** y ***Pinus ayacahuite*** .

Estas son las principales especies que habitan en la región V ubicado en el mapa (figura 1), donde se puede ver que es donde se encuentra el estado de Morelos:

***P.cembroides*, *P.devoniana*, *P.douglasiana*, *P.herrerae*, *P.lawsonii*, *P.leiophylla*, var.*leiophylla*, *P.maximinoi*, *P.moctezumae*, +var.*gordoniana*, *P.oocarpa*+ var., *P.ayacahuite*, *P.hartwegii*, *P.moctezumae*, *P.pseudostrobus*, +var.*apulcensis*, *P.teocote*.**

El bosque de pino se distribuye en altitudes comprendidas entre los 1,500 y 4,000 msnm, principalmente en los municipios de Huitzilac, Tepoztlán, Tlalnepantla, Totolapan y Tetela del Volcán, sobre una topografía de cerros y laderas, y en sustratos rocosos de origen volcánico, sobre suelos profundos o delgados, de color oscuro. Entre los 2 000 y 3 500 msnm (metros sobre el nivel del mar), las especies de pino que llegan a formar masas forestales más o menos puras son ***Pinus montezumae*** ("ocote"), *P. Ayacahuite* var. *veitchii* ("ayacahuite"), *P. pseudostrobus* ("ocote jarano") *P. michoacana* ("pino") y *P. michoacana* var. *cornuta* ("pino"). Altitudes mayores, entre los 3 500 y 4 000 metros, ***Pinus hartwegii*** es la única especie de pino que forma masas puras, o bien puede presentarse asociada con ***Alnus firmifolia*** ("aile") en terrenos con menores altitudes. Abajo de los 2 500 metros de altitud, las especies de pino que forman bosques puros o mezclados con especies de encino son ***leiophylla*** ("ocote chino"), ***teocote*** ("ocote colorado") y ***oocarpa***. Esta comunidad forestal ocupa aproximadamente 8 068 ha (hectáreas), constituidas por bosques de pinos cerrados o abiertos [50].

Por sus características climáticas y edáficas, son objeto de procesos de cambio de uso de suelo, de la sobreexplotación de recursos bioenergéticos (leña) y del establecimiento de asentamientos humanos irregulares [51].



*Figura 2 Imagen representativa de **Pinus moctezumae** en Morelos, localizado en la zona norte de Morelos.*

Las características de estas especies son principalmente desde un árbol mediano-grande, que puede medir hasta 30 m, y con un tronco de al menos 75 cm de diámetro. Presenta una corteza gris oscura, áspera y rugosa, con placas separadas por surcos profundos y crestas, las ramas jóvenes de esta conífera son robustas, de 8 a 12 mm aproximadamente, gruesas y muy ásperas, sus hojas se encuentran generalmente en fascículos de 5, a veces de 4 o 6. Sus hojas jóvenes son más brillantes y de color verde más claro, miden de 15 a 45 cm de largo, y de 1 a 1.5 mm de grosor. Y la característica más importante es que los conos de estos pinos se abren cuando maduran, tienen forma ovoide-cónica, de unos 18 a 30 cm de largo y de 4.5 a 8 cm de grosor. El ala de las semillas puede medir de 2 a 2.5 cm [52] .

Los conos femeninos tardan entre 1,5 y 3 años (dependiendo de la especie) en madurar tras la polinización, y la fecundación se retrasa un año. En su madurez, los conos femeninos

miden entre 3 y 60 cm de largo. Cada cono tiene numerosas escamas dispuestas en espiral, con dos semillas en cada escama fértil; las escamas de la base y la punta del cono son pequeñas y estériles, sin semillas [53].

Las semillas son en su mayoría pequeñas y aladas, y son anemófilas (dispersadas por el viento), pero algunas son más grandes y sólo tienen un ala vestigial, y son dispersadas por pájaros. Los conos femeninos son leñosos y a veces están armados para proteger las semillas en desarrollo de los buscadores. En la madurez, los conos suelen abrirse para liberar las semillas. En algunas de las especies dispersadas por aves, por ejemplo pino blanco,[54] las semillas sólo son liberadas por el ave al romper los conos. En otros, las semillas se almacenan en conos cerrados durante muchos años hasta que una señal ambiental provoca que los conos se abran, liberando las semillas. Esto se denomina serotinia. La forma más común de serotinia es la piriscencia, en la que una resina mantiene los conos cerrados hasta que un incendio forestal los derrite, por ejemplo, en *P. rigida* [55].

PINUS MOCTEZUMAE

Es una especie con una amplia distribución discontinua, reportada en 17 estados del norte, centro y sur de México, México: en Nuevo León, suroeste de Tamaulipas, Nayarit, sur de Zacatecas, Jalisco, Michoacán, México, D.F. , Querétaro, Hidalgo, Morelos, Tlaxcala, Puebla, centro de Veracruz, Guerrero, Oaxaca y Chiapas llegando hasta las partes altas de Guatemala, con mayor presencia en el centro, a lo largo del Eje Neovolcánico Transversal; hacia el norte se distribuye sobre la Sierra Madre Oriental [56]. El rango altitudinal de la especie es de 1150 a 3500 m s.n.m. [57]. En las partes bajas se asocia con *Quercus* sp. mientras que en las zonas altas coexiste con otras especies de coníferas, aunque también se observa en rodales puros. Las zonas donde se distribuye la especie mantienen una precipitación anual que varía entre los 800 y 1400 mm [58]. La temperatura media es de 22 °C en el mes más cálido y -5 °C en el mes más frío [59].

Otros nombres que puede tener esta especie de pino son: *P. moctezuma* var. *lindleyi* J.C. Loudon; *P. moctezumae* var. *mezambrana* Carvajal, ***Pinus moctezumae*** A. B. Lambert var. *Moctezumae*. Así mismo es reconocido bajo los siguientes nombres locales: Ocote, Ocote

blanco, Pino de Montezuma, *Pinus montezumae* Lamb. es conocido también como chalmaite blanco (Veracruz) y pino real (Oaxaca).

Comienza a producir semilla a los 14 años de edad [60]. La diferenciación de los primordios ocurre en abril; en primavera del año siguiente ocurre la floración y polinización, en un periodo de receptividad de 24 a 48 h, de manera sincrónica con la liberación del polen entre los meses de febrero y abril; los conos alcanzan la madurez fisiológica en el invierno, época adecuada para la recolecta de conos, a mitad del mes de diciembre y a mitad del mes de enero [61].

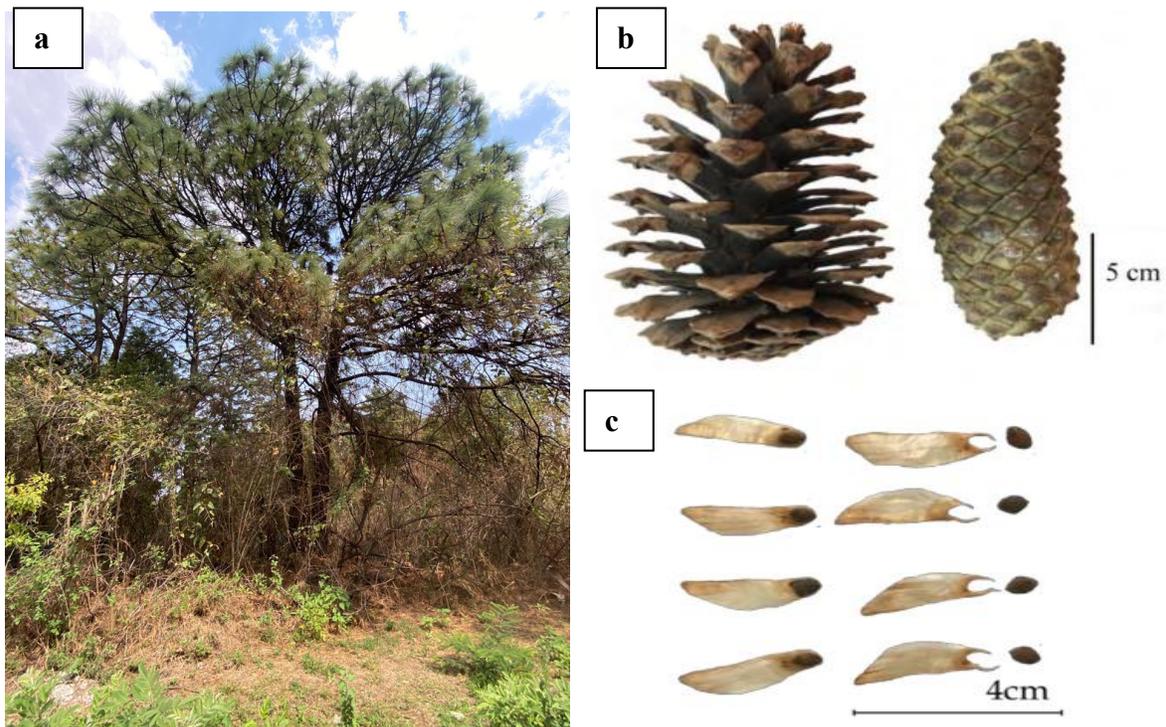


Figura 3 a) Árbol adulto de *Pinus montezumae* (Cuernavaca, Morelos). b) Estróbilos femeninos, abierto (izquierda) y cerrado (derecha) de *Pinus montezumae*. c) Semillas de *Pinus montezumae* con ala articulada

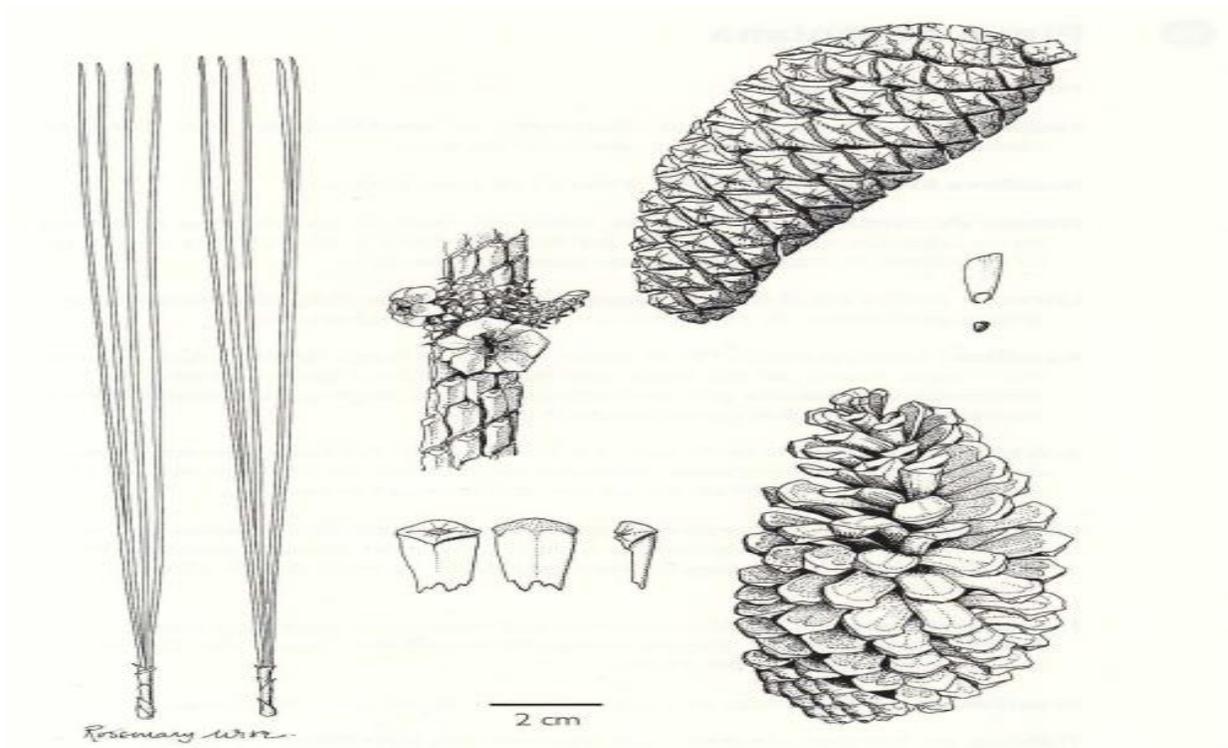


Figura 4 Estructura de estróbilos de *Pinus m.*



Figura 5 Estróbilo masculino de *Pinus moctezumae*.

Tabla 2 Clasificación taxonómica de *Pinus moctezumae*

Especimen de <i>Pinus Moctezumae</i>	Especie	Pinus Moctezumae
 <p data-bbox="139 1003 570 1066">Figura 6 Estróbilos femeninos de <i>Pinus moctezumae</i></p>	Reino	Platae
	División	Pinophyta
	Clase	Pinopsida
	Subclase	Pinidae
	Orden	Pinales
	Familia	Pinaceae
	Género	Pinus
	Distribución	Se puede encontrar en las zonas boscosas de las montañas de México, Guatemala y zonas norte de El Salvador. Las ciudades de Ocotlán en Jalisco, Ocotlan de Morelos, Oaxaca, Ocotal en Nicaragua y el Ocotal en Costa Rica derivan sus nombres de esta palabra.

Las coníferas en el tratamiento terapéutico antimicrobiano

La investigación basada en plantas ha recibido más atención en los últimos años y la literatura respalda el posible uso de plantas medicinales en procesos convencionales [62].

En las coníferas se han demostrado que existen compuestos que actúan como antimicrobianos, ya que tienen potencial para degradar las paredes celulares microbianas, alterar la membrana citoplasmática y las proteínas de la membrana, la lisis celular, la coagulación del citoplasma y el agotamiento de la fuerza motriz de protones son todos ejemplos de su acción inhibidora [63].

Además, se ha demostrado la actividad antioxidante debido a que tienen un alto contenido de compuestos polifenólicos, principalmente procianidinas, estilbenos, taninos y ácidos fenólicos [64]. La actividad antioxidante de los extractos de coníferas ha sido confirmada y ensayos de poder reductor desde tiempos prehistóricos, las plantas coníferas se han

utilizado como fuente medicinal, En la tabla número 3 se describen los principales compuestos que se han reportado en las coníferas

El efecto antiinflamatorio de los fitoquímicos extraídos y reportados de las coníferas, es uno de los principales efectos registrados tanto en modelos in vivo como in vitro [65].

Tabla 3 Constituyentes fitoquímicos presentes en las coníferas (*Pinus*).

Subclases	Ejemplos principales de cada clase	Especies de Coníferas	Referencias
Monoterpenos	β -mirceno, α -pineno, limoneno, α -terpineno, tujona, canfeno, β -pineno, tujole, Δ -3-careno, felandreno	<i>Pinus roxburghii</i> , <i>P. pinea</i> , <i>P. wallichiana</i> , <i>P. pinaster</i> , <i>P. sylvestris</i> , <i>P. gerardiana</i> , <i>P. nigra</i> , <i>P. radiata</i> , <i>Thuja occidentalis</i> , <i>Abies alba</i> , <i>Picea abies</i> , <i>Metasequoia glyptostroboides</i>	[99, 100].
Sesquiterpenos	Laurenobiolida, farneseno, inulicina, vernodalina, 3 H-benzofuaran-2-ona, 4-metil-3-metoxi-3 H-benzofuaran-2-ona, 4,9(α)-dihidroxinardosin-6-en, delta-cadineno, alfa-humuleno, beta-cedreno, transcariofileno, cubenol	<i>P. mariana</i> , <i>Juniperus foetidissima</i> , <i>A. alba</i> , <i>P. abies</i> , <i>M. glyptostroboides</i> , <i>J. phoenicea</i> , <i>P. roxburghii</i>	[101,102].
Diterpenos	Paclitaxel, 10-desacetilbacatina III, tasumatrol B, taxodal, ácido sandaracopimárico, taxodiona, xantoperol, andrografólido, giberelina A8, ácido 7 α -hidroxisandaracopimárico, giberelina A12, aldehído de giberelina A12, giberelina A15, ácido 14 α -hidroxiisopimárico, 12-hidroxi ácido	<i>Taxus brevifolia</i> , <i>T. baccata</i> , <i>T. globosa</i> , <i>T. distichum</i> , <i>P. mariana</i> , <i>J. taxifolia</i> , <i>M. glyptostroboides</i> , <i>A. holophylla</i> , <i>J. excelsa</i> , <i>J. communis</i> , <i>J. excelsa</i> , <i>J. communis</i>	[103,104].

	deshidroabiético, giberelina A19, giberelina A9, carnosol, latirol, ácido <i>E</i> -comunico, ácido 15-hidroxi-8(17),13(<i>E</i>)-labdadieno-19-carboxílico, holofilina A, holofilina D, sugiol, ferruginol		
Compuestos de nitrógeno			
Alcaloides	Vellosimina, 1,6-deshidropinidina, cis-pinidina, 1,6-deshidropinidinona, epipinidinona, cis-pinidinol, trans-pinidina, eufococina, α-pipecolina 1, (-)-pinidina	<i>P. mariana</i> , <i>P. abies</i> , <i>P. sabiniana</i> , <i>P. torreyana</i> ,	[105,106].
lignanós	Lariciresinol, taxiresinol, 3'-demetilsolariciresinol, 9'-hidroxiisopropileto, isolariciresinol, desoxipodofilotoxina, (-)-secoisolariciresinol, 3, 3'-demetilsolariciresinol, isotaxiresinol 2, α-conidendrina, (+)-pinoresinol, (-)-matairesinol, arctiina, dibencilbutirolactol, (-)-wikstromol, (-)-traxilagenina, (-)-arctigenina, traxilasida, 4'-demetiltraxilagenina, [(2 <i>R</i> , 3 <i>R</i>)-2-(4''-hidroxi-3'-metoxibencil)-3-(4'-hidroxi-3',5'dimetoxibencil)-butirolactona]	<i>T. baccata</i> , <i>J. taxifolia</i> , <i>J. sabina</i> , <i>J. virginiana</i> , <i>P. virginiana</i> , <i>roxburghii</i> , <i>Cedrus deodara</i> , <i>T. nucifera</i>	[107,108].
Polifenoles: flavonoides			
Flavonoles	Taxifolina, cededarina	<i>C. deodara</i> , <i>L. simbraca</i> , <i>P. roxburghii</i> , <i>P. mariana</i> , <i>P. abies</i> , <i>A. pindrow</i> , <i>A. excelsa</i> ; <i>P. pinea</i> , <i>P. halepensis</i> , <i>P.</i>	[109,110].

		<i>pinaster</i> , <i>P.</i> <i>gerardiana</i>	
Flavonas	Pilosanol B, luteolina, apigenina, apigenina 6-Cb-glucopiranosido	<i>P. mariana</i> , <i>A. excelsa</i> , <i>P. abies</i> , <i>P. sylvestris</i> , <i>P. menziesii</i> , <i>P. menziesii</i> , <i>J. communis</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>L. deciduas</i>	[111,112].
Biflavonas	Bilobetina, cupressuflavona II-7- O -metil-robustaflavona	<i>T. wallichiana</i> , <i>C. macrocarpa</i> , <i>A. angustifolia</i>	[113,114].
Flavonoles	Quercetina, dihidroquercetina, rutina, kaempferol, dihidrokaempferol	<i>J. communis</i> , <i>J. oxycedrus</i> , <i>P. gerardiana</i> , <i>P. roxburghii</i> , <i>P. wallichiana</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>P. abies</i> , <i>L. deciduas</i> , <i>P. sylvestris</i> , <i>P. menziesii</i> , <i>M. glyptostroboides</i> , <i>J. excelsa</i> , <i>P. mariana</i> , <i>J. foetidissima</i>	[115,116].
Flavan-3-oles	Monómeros: (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-3-galato, (+)-catequina, senidina A, (-)-epigallocatequina,	<i>P. pinaster</i> , <i>P. pinea</i> , <i>P. halepensis</i> , <i>P. roxburghii</i> , <i>P. wallichiana</i> , <i>P. gerardiana</i> , <i>J. foetidissima</i> , <i>A. angustifolia</i> , <i>P. abies</i> , <i>L. deciduas</i> , <i>P. sylvestris</i> , <i>J. communis</i> , <i>P. menziesii</i> , <i>J. oxycedrus</i> , <i>M. glyptostroboides</i> , <i>J. excelsa</i>	[117,118].
	Polímeros: procianidina B1, B2, procianidina A2,	<i>P. halepensis</i> , <i>P. pinea</i> , <i>P. pinaster</i>	[119].
Ácidos fenólicos			

ácidos benzoicos	ácido p-hidroxibenzoico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido gálico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido protocatequico, ácido elágico	<i>P. abies</i> , <i>deciduas</i> , <i>sylvestris</i> , <i>menziesii</i> , <i>kesiya</i> , <i>communis</i> , <i>excelsa</i> , <i>roxburghii</i> , <i>wallichiana</i> , <i>gerardiana</i> , <i>deciduas</i> , <i>communis</i>	L. P. P. P. J. A. P. P. P. L. J.	[120,121].
ácido hidroxicinámico	Ácido cafeico, ácido t-cinámico, ácido p-cumárico, ácido vainílico, ácido ferúlico, ácido salicílico, ácido sinápico, ácido siríngico, ácido clorogénico, ácido 5-cafeoilquínico, ácido cafeico 4-O - glucósido	<i>P. abies</i> , <i>deciduas</i> , <i>sylvestris</i> , <i>baccata</i> , <i>mariana</i> , <i>pinaster</i> , <i>kesiya</i> , <i>deciduas</i> , <i>communis</i> , <i>menziesii</i> , <i>glyptostroboides</i>	L. P. T. P. P. P. L. J. P. M.	[122,123].
estilbenos	trans-resveratrol, resveratrol, trans-pinosilvina, cis-estilbenos, pinosilvina, dihidromonometilo, trans-estilbenos, trans-piceatannol, trans-piceido, trans-isorhapontina, trans-isorhapontigenina, fenantrenos, astringina, trans-astringina	<i>P. mariana</i> , <i>abies</i> , <i>communis</i> , <i>pinaster</i> , <i>sylvestris</i> , <i>stobes</i> , <i>roxburghii</i> , <i>wallichiana</i> , <i>gerardiana</i> , <i>merkusii</i>	P. J. P. P. P. P. P. P.	[124,125].

Estructuras de compuestos fitoquímicos presentes en diferentes spp. de coníferas

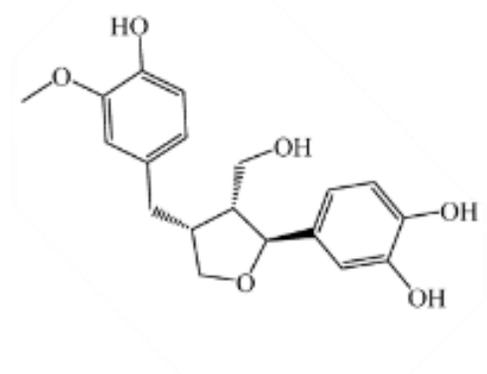


Figura 7 Taxiresinol

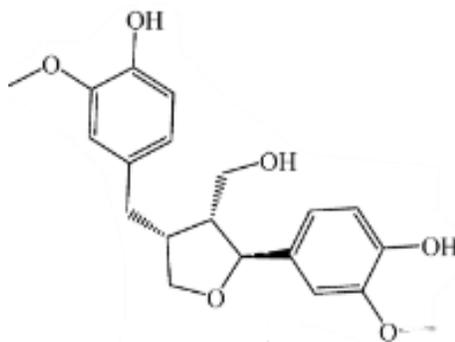


Figura 8 Lariciresinol

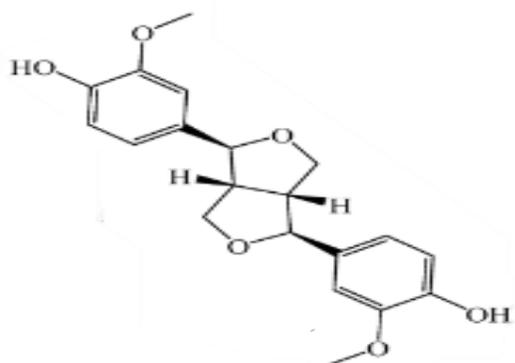


Figura 9 Pinoresinol

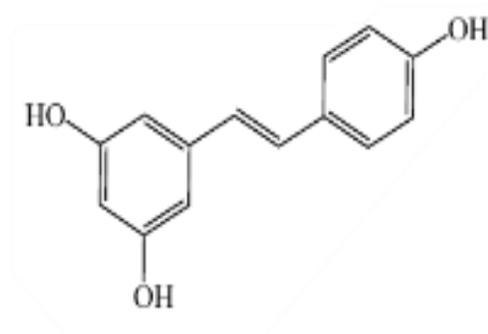


Figura 10 Resveratrol

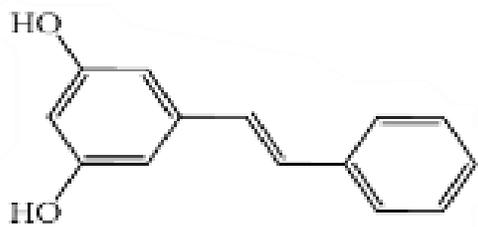


Figura 12 Tran- pinosylvin

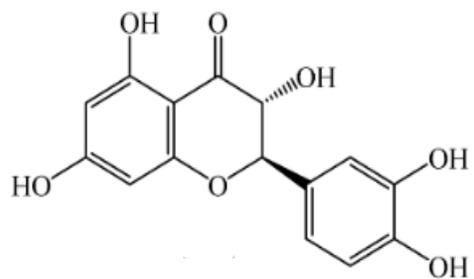


Figura 11 Taxifolin

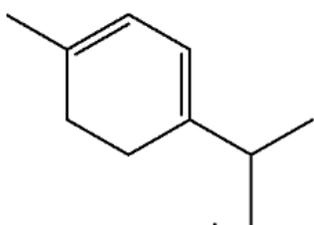


Figura 15 alpha-terminene

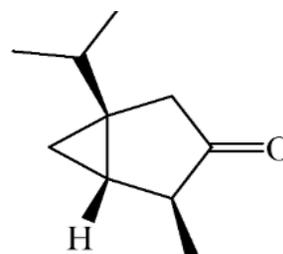


Figura 13 Thurjone

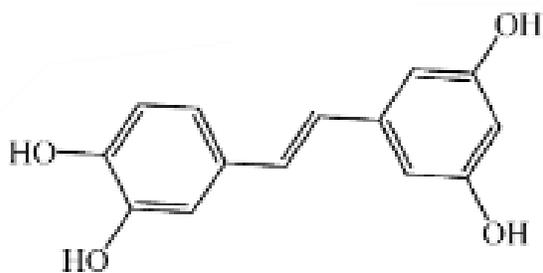


Figura 16 trans- Piceatannol

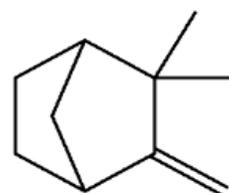


Figura 14 Camphene 3 - carene

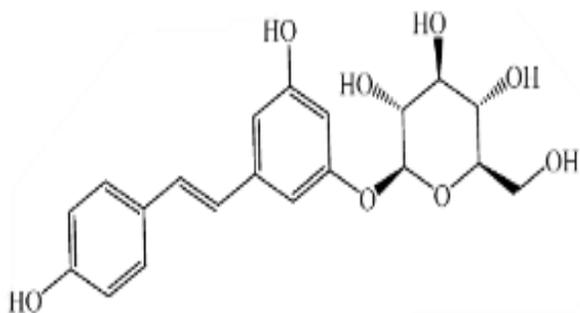


Figura 18 Trans- piceid

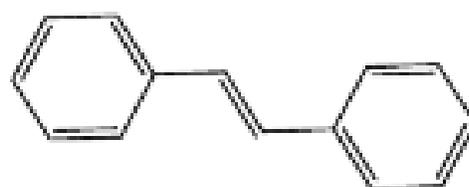


Figura 17 Cis- stilbenes

Componentes fitoquímicos de las coníferas

Terpenos

La tabla 3 representa los mono, sesqui y diterpenos más comunes presentes en las coníferas. En particular, los monoterpenos han sido ampliamente estudiados, especialmente por sus propiedades antivirales. Además, informaron sobre sus actividades biológicas, incluidos los efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, antioxidantes y neuroprotectores [66]. Sin embargo, el diterpeno de taxol derivado de *Taxus* spp. tienen potencial contra la malaria y el cáncer [67]. Los sesquiterpenos tienen propiedades antisépticas, antimicrobianas y desinfectantes [68] demostraron que la actividad antioxidante de los terpenos puede prevalecer sobre el estrés oxidativo agravado por estímulos internos y externos [69].

Alcaloides

Hay varias clases de alcaloides que se clasifican según el sistema de anillos heterocíclicos y el precursor biosintético que son de gran interés. Los alcaloides comprenden quinolizidinas, indoles, tropanos, pirrolidinas, pirrolizidinas, imidazoles, piperidinas y purinas de isoquinolina [70]. Existen numerosos estudios sobre la actividad biológica y los usos medicinales de los alcaloides [71]. Además, se ha demostrado que los alcaloides tienen actividades antitumorales, antihiper glucémicas y antibacterianas [72].

Polifenoles

Los polifenoles son de gran relevancia y realizan una variedad de funciones, desde constituyentes esqueléticos en varios tejidos hasta pigmentación en muchos órganos de plantas [73]. Actúan como antioxidantes naturales, pudiendo inhibir la peroxidación lipídica, la carcinogénesis, la actividad antimicrobiana, la acción constrictora capilar directa, las fitohormonas y también tienen la capacidad de estabilizar el ácido ascórbico [74]. Los flavonoides (isoflavonas, flavonoles, flavanonoles, flavonas, taninos, flavanonas, antocianidinas), estilbenos (resveratrol), ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinámico), lignanos, se pueden encontrar en las plantas [75]. Los polifenoles, especialmente los flavonoides, como la rutina, la quercetina, la apigenina y la epicatequina, se encuentran ampliamente en las coníferas. Los géneros *Araucaria*, *Pinus*, *Cedrus*, etc. son conocidos por sus propiedades antimicrobianas, anticancerígenas, antidiabéticas, neuroprotectoras [76]. y antiinflamatorias y pueden usarse en el tratamiento de

enfermedades neurodegenerativas, además de ser útiles para reducir la toxicidad de $\alpha\beta$ y disfunción neuronal [77].

Flavonoides

Los flavonoides son el grupo fenol más abundante en la naturaleza y están presentes en una amplia gama de coníferas [78]. Los flavonoides tienen una estructura central de tres anillos, pero las diferentes subclases varían debido a la estructura de anillo heterocíclico (anillo C) ubicada centralmente, que conecta los dos anillos de benceno [79]. Hasta la fecha, en varios estudios se han registrado más de 6.000 flavonoides en plantas. Los flavonoides son agliconas en su estructura básica, pero la mayoría de ellos son glucósidos en las plantas [80]. Las subclases de flavonoides que se encuentran en las hojas, cortezas y semillas de las coníferas se representan en la tabla 3.

Lignanos

Los lignanos son dímeros de fenilpropanoides formados por dos unidades de alcohol coniferílico o sinapílico unidas en las colas [81]. Isolariciresinol, taxiresinol, lariciresinol, pinoresinol y sus glucósidos son ejemplos de tales compuestos. Existe un interés creciente en los lignanos, especialmente debido a su capacidad quimioterapéutica [82]. Los compuestos de lignina más comúnmente presentes en coníferas spp. se muestran en (tabla 3).

Estilbenos

Los estilbenos son producidos por varias especies de coníferas, incluidas *Pinus sylvestris* y *Picea abies*. Brevemente, los estilbenos son compuestos fenólicos con un puente heterólogo que conecta dos anillos aromáticos [83]. Se han aislado muchos otros compuestos, como la transpinosilvina, el cisestilbeno, el resveratrol y el piceatannol, de las cortezas de especies de coníferas (tabla 3). Para los estilbenos, se han informado excelentes efectos antimicrobianos [84].

Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos que pueden encontrarse en una amplia gama de plantas. Los taninos son pigmentos coloreados, astringentes y se caracterizan por un sabor amargo [85]. Los extractos de corteza de conífera ricos en taninos tienen propiedades antimicrobianas y un alto potencial para prevenir la oxidación de los lípidos en el modelo de liposomas [86]. Como resultado, los taninos se pueden dividir en cuatro clases principales

según sus características estructurales: galotaninos, taninos complejos, elagitaninos y taninos condensados [87]. Los taninos condensados (CT), también conocidos como proantocianidinas, prevalecen en la corteza de los árboles *P. abies* y *P. sylvestris* [88]. Los taninos condensados se consideran polímeros u oligómeros de unidades de flavanol conectadas por enlaces CC (carbono- carbono) que son resistentes a la hidrólisis [89]. Las procianidinas (PC) y las prodelfinidinas (PD) son los AP más populares. La catequina y otras unidades de epicatequina forman las PC. Las unidades de epigalocatequina constituyen las PD [90].

Los taninos exhiben actividad antioxidante a través de diversas vías, incluida la eliminación de radicales libres, la quelación de metales de transición y la inhibición de enzimas prooxidativas [91], además de tener la capacidad de unirse y formar complejos con proteínas y otros compuestos, y ser responsables de su actividad biológica. [92]. Los taninos también actúan como agentes antimicrobianos, inhibiendo las enzimas microbianas extracelulares, privando de sustratos de crecimiento microbiano y ejerciendo una acción directa sobre el metabolismo microbiano, como la desnaturalización de las proteínas de la membrana celular [93]. En la industria alimentaria, podrían utilizarse como recubrimientos funcionales, adhesivos, conservantes y compuestos aromatizantes [94].

JUSTIFICACIÓN

México es un centro de diversificación del género *Pinus* y en su territorio se encuentra el mayor número de sus taxones, a menudo son el componente principal de la vegetación, son el hábitat y fuente de alimento para la fauna silvestre, y de ellos se obtiene madera, leña, pulpa, resinas, semillas comestibles y otros productos no maderables [95].

Las coníferas han sido reconocidas desde hace mucho tiempo por su potencial terapéutico en diferentes trastornos, principalmente las coníferas se han estudiado a profundidad en el continente asiático, destacando la importancia en el desarrollo de fármacos, se han registrado varias actividades beneficiosas contra enfermedades, los datos obtenidos de estudios experimentales y clínicos realizados hasta la fecha subrayan claramente que dichos compuestos ejercen efectos antimicrobianos y antioxidantes prometedores, pudiendo inhibir bacterias como lo es *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* [96]

Por lo tanto, se ha intentado resaltar la importancia de los extractos derivados de coníferas para fines farmacológicos, con el apoyo de datos experimentales in vitro .

Los extractos de árboles de coníferas están atrayendo un mayor interés entre las comunidades científicas debido a sus posibles aplicaciones en alimentación, medicina y cosmética. Entre las especies de coníferas, recientemente se han identificado varios extractos como una fuente importante de bioactivos con potencial antimicrobiano [97]

Actualmente, la resistencia a los antimicrobianos plantea un problema relevante sobre la eficacia de los tratamientos que se utilizan actualmente contra las infecciones causadas por los microorganismos como las bacterias, provocando su permanencia en el organismo e incrementando el riesgo de contagio a otras personas. Esta resistencia a los antimicrobianos, aunque es un fenómeno natural, aumenta los tiempos de estancias hospitalarias, costos médicos y la mortalidad. Es por ello, que la identificación de nuevos fármacos antimicrobianos es una medida urgente, ya que es necesario contar con nuevas sustancias activas con efecto bactericida sobre las cepas bacterias con resistencias a los antibióticos. Esta situación ha sido declarada por la OMS como una de las 10 principales amenazas de salud pública a las que se enfrenta la humanidad en la actualidad y en su futuro próximo.

Por esta razón, la identificación de nuevos compuestos fitoquímicos y su obtención a partir de nuevas fuentes biológicas, presenta una excelente alternativa para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resistentes a los fármacos antibióticos actuales. ***Pinus moctezumae*** es una especie endémica del estado de Morelos cuyo estudio es para la extracción e identificación de nuevos compuestos bioactivos contra el crecimiento microbiano, no se ha descrito con detalle, ya que el principal uso de esta especie de conífera se basa en los procesos de reforestación, así como en actividades ornamentales utilizando los estróbilos, y considerándose como un desecho al final de su uso.

HIPOTESIS

La caracterización fitoquímica del extracto metanólico de estróbilos de pino morelense (***Pinus moctezumae***) tiene efecto sobre la sensibilidad de crecimiento de las bacterias de estudio.

OBJETIVO

Objetivo general

Caracterizar la actividad antibiótica del extracto metanólico de estróbilos de pino (***Pinus moctezumae***) mediante ensayo de difusión en placa.

Objetivos específicos

- Obtención del extracto de acuerdo con la polaridad de los estróbilos de pino.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto obtenido por el método de difusión en placa.

METODOLOGÍA

Obtención del material vegetal (estróbilos femeninos *Pinus moctezumae*)

Se recolectaron estróbilos de pino dentro de las instalaciones de la UAEM en el mes de marzo 2023, y en el mes de junio de 2023 identificando la especie de pino ***Pinus moctezumae***, así mismo recolectándose desde el suelo de forma al azar y aleatoria.

Los estróbilos de pino se limpiaron y se almacenaron en un lugar seco, favoreciendo la pérdida gradual de humedad y evitando el crecimiento de hongos.

Obtención de extracto metanólico de estróbilos femeninos (*Pinus moctezumae*)

Los estróbilos recolectados limpios a temperatura ambiente se secaron en estufa (Felisa) a 110°C por una hora. Al término de este tiempo, se separaron cuidadosamente las brácteas de los estróbilos y se trituraron hasta obtener un polvo fino. Finalmente se tamizaron (tamizador mediano de metal), eliminando las partículas de mayor tamaño y almacenando el polvo en un frasco limpio temperatura ambiente.

La obtención del extracto metanólico de los estróbilos se realizó por maceración (figura 19), colocando 50 gramos del polvo de estróbilo en un volumen final de metanol de 150 ml. Una vez incorporado el disolvente, se agitó manualmente hasta generar una mezcla homogénea, manteniéndose así durante 24 horas. Al término de este tiempo se separó el disolvente mediante filtración y el extracto se resuspendió con metanol y mediante sonicación (BRANSON 1800) se realizó una segunda extracción en un baño de agua a 30°C durante 1 hora.

Se eliminó el disolvente del extracto obtenido en un rotavapor con baño maría a una temperatura de 81°C y 100 rpm (rotaevaporador BUCHI). Finalmente, al eliminar el metanol de los extractos realizados se determinó el peso final del extracto y se resuspendió en metanol a una concentración de 100,000 ppm.

También se llevo a cabo el procedimiento de Soxhlet para pruebas en extracto y posteriormente llevando los pasos del procedimiento de concentrado. **Ver anexo 1.**

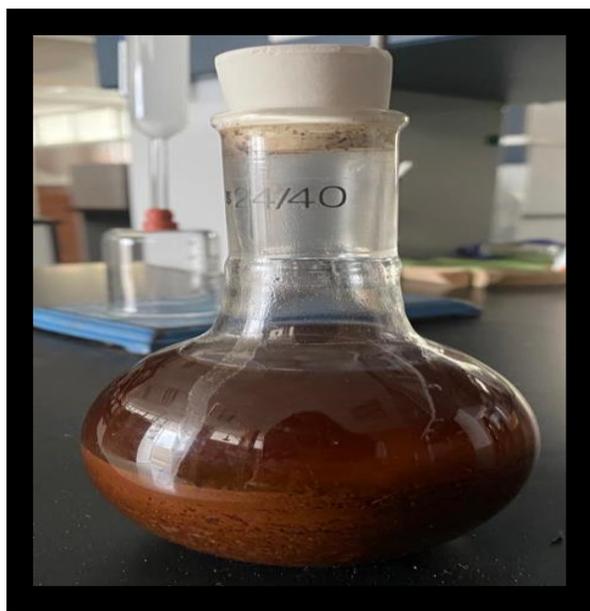


Figura 19 Imagen del macerado metanólico de estróbilos de Pino moctezumae

Análisis de los componentes de los extractos mediante cromatografía en capa fina.

Se cortaron pequeñas placas de cromatografía en capa fina de sílica gel (60-230) marca Merck base aluminio (TLC Sílica gel 60 F254). La fase móvil para la separación de la muestra por TLC fue con diclorometano (MEYER) y se reveló mediante luz UV de onda corta utilizando una lámpara de luz UV (UVP Upland, CA 91786 U.S.A.)

Obtención de fracciones del extracto metanólico mediante cromatografía en columna.

Para el análisis de los compuestos obtenidos en el extracto metanólico por maceración, se realizó la separación de los compuestos presentes en el extracto mediante cromatografía en columna, para ello, se utilizó una columna de vidrio de 40 cm de largo por 2 cm de diámetro y 35g de gel de sílica mesh 60-230 (Merck) empacándose con diclorometano (MEYER)

La columna separó los compuestos, utilizando los siguientes sistemas con el siguiente orden: diclorometano 100% , acetato 80 : 20 metanol , y lavando la columna con metanol al 100%. Se añadió el disolvente aumentando de acuerdo la polaridad necesaria hasta obtener las fracciones en tubos de ensayo previamente numerados y etiquetados. Al término de la elución de las fracciones, se añadió metanol para correr los componentes faltantes y obtenerse en fracciones de igual manera.

Las fracciones se evaluaron por cromatografía TLC, se agruparon y se eliminó el disolvente con un Rotavapor BUCHI R-205, para finalmente agruparse en matraces Erlenmeyer de 50ml con tapa.

Cabe mencionar que se obtuvieron 10 secciones de fracciones en donde 4 fracciones fueron de diclorometano, 3 fracciones de acetato-metanol y 3 fracciones de metanol, aproximadamente cada una de estas fracciones tomo un volumen de 50 ml.



Figura 20. Columna de separación con extracto metanólico de estróbilo de Pinus moctezume.

Se recolectaron las fracciones de acuerdo con los resultados de las placas TLC.

Tabla 4 Resultado posterior a la concentración de las fracciones elegidas

Fracción agrupada	Color	Código
1	Verde limón	CUDA1
2-4	Verde/Transparente	CUDA2
5-6	Verde/Transparente	CUDA3
7-10	Verde/Transparente	CUDA4
11-13	Incoloro	CUDA5
24-28	Amarillo pálido	CUDA6

Una vez agrupadas las fracciones y rota evaporadas se llevan para las pruebas del procedimiento de antibiograma.

Prueba de antibiograma

Todos los antibiogramas se realizaron con el método de difusión basado en el trabajo de Bauer , Kirby [98].

Preparación del medio

De acuerdo con la estandarización de la National Commite for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) El medio que se estuvo trabajando es para la realización del antibiograma y se preparó con el Agar Mueller-Hinton(MCD LAB 450gr), debido a que es el recomendado ya que crecen bien la mayor parte de las bacterias patógenas. La relación de empleo para la preparación del agar es de 38 g por cada litro de agua destilada, por lo que ocupamos 11.4 gr en 300 ml de agua destilada para que salgan una cantidad de placas considerables, aproximadamente se obtienen de 14 a 17 placas en total.

Se adquiere un recipiente de acuerdo con la cantidad y tamaño que se desea obtener , en una parrilla (IKA C-MAG HS 4) se calienta los 300 ml de agua destilada a una temperatura baja y se añade los 11.4 gr de medio Muller-Hinton(MCD LAB 450gr), con ayuda de un agitador empezar a revolver todo hasta hacerse una mezcla totalmente homogénea

Posteriormente se lleva el medio y el material a utilizar al proceso de esterilización en el Autoclave(marca Felisa modelo:FE-399 serie:1702095) a 121°C con una presión de 15 psi durante 20 minutos.

Una vez salido el material de la autoclave se deja enfriar alrededor de 30 min , después se procede a limpiar, desinfectar la campana antes y después de su uso , en seguida se opta por plaquear en cajas Petri ya previamente esterilizadas, los medios en las placas no deben de tener un grosor mayor a 4 mm por lo que se optó por medir con una pipeta de vidrio 10 ml (previamente ya esterilizada) del medio Mueller-Hinton el cual corresponde a 4 mm de grosor del agar. El plaqueo se realizó en campana acompañado de mecheros para evitar contaminaciones. Una vez realizado el plaqueo se guardan las placas con medio Mueller-Hinton en una incubadora durante 24 horas. Una vez pasando el determinado tiempo se apartan de la incubadora y se introducen al refrigerador, aproximadamente salen de 14 a 17 placas con esta preparación.

Suspensiones bacterianas en caldo nutritivo

Para la inoculación de las suspensiones bacterianas se empleó caldo nutritivo(MCD LAB 500 gr) del cual se deben pesar 8 gramos y disolver en 1 L de agua destilada para su preparación (cada vez que se realizaron antibiogramas se preparan a 220 ml de caldo nutritivo) Se vertieron aproximadamente 30 ml de caldo nutritivo en 5 matraces de 125 ml con tapa rosca, el resto del caldo nutritivo se depositó en otro matraz para realizar diluciones que se explicarán más adelante. Posteriormente los matraces que contenían caldo nutritivo se esterilizaron junto al material para realizar el plaqueo y el medio Mueller-Hinton(MCD LAB 450gr). Las cepas empleadas fueron las siguientes.

- *Escherichia coli*
- *Salmonella typhi*
- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*

Las inoculaciones se realizan en campana, rascando las cepas con asa de inoculación, depositando las bacterias en los caldos nutritivos con ayuda del asa y removiendo. Posteriormente se dejan en un agitador orbital durante 24 horas para su uso. La campana se desinfecta antes y después de su uso.

Antibiogramas

Como antibiótico de referencia se utilizó ciprofloxacino. 1 mg de ciprofloxacino se disolvió en 10 ml de agua destilada esterilizada para su uso. Para poder tener un mejor control sobre la concentración de bacterias que habrá en las placas se optó por utilizar el método de McFarland así que se realizó una serie de tubos que mostraban un gradiente de turbidez las cuales contenían cloruro de bario (1.175%) y ácido sulfúrico (1%) en tubos de 10 ml de acuerdo con la tabla 5. Dicho gradiente nos ayudará a tener una comparativa para tener un control sobre la cantidad de bacterias que habrá en las placas de los antibiogramas. El número de bacterias que se determinó que estén en las placas fue de 1.5×10^8 bacterias.

Tabla 5 Cantidad de BaCl₂ y H₂SO₄ para el control de la concentración de las bacterias

Nº de Tubo	BaCl ₂ (1%) ml	H ₂ SO ₄ (1.175%) ml	Volumen Total ml	Nº de bacterias.
0.5	0.05	9.95	10	1.5x10 ⁸
1	0.1	9.9	10	3x10 ⁸
2	0.2	9.8	10	6x10 ⁸
3	0.3	9.7	10	9x10 ⁸
4	0.4	9.6	10	12x10 ⁸
5	0.5	9.5	10	15x10 ⁸
6	0.6	9.4	10	18x10 ⁸
7	0.7	9.3	10	21x10 ⁸
8	0.8	9.2	10	24x10 ⁸
9	0.9	9.1	10	27x10 ⁸
10	1.0	9.0	10	30x10 ⁸

A partir de este punto se trabajó en campana para evitar totalmente la contaminación. Los discos, tubos de ensaye, pinzas de disección, cajas Petri de vidrio de 9 cm vacías, tubos eppendorf, hisopos y las puntas para micropipeta que se mencionarán a continuación fueron previamente esterilizados en autoclave a 121 °C con una presión de 15 psi durante 20 minutos. Las suspensiones bacterianas que previamente se dejaron inoculadas (las cuales presentaban turbidez debido a las bacterias suspendidas) se compararon con la turbidez del gradiente realizado. Si las bacterias tenían una turbidez mayor se les realizaron diluciones hasta alcanzar una turbidez similar al del tubo 0.5. Así pues, por ejemplo, si una cepa tenía una turbidez similar al del tubo 5 tendría 15x10⁸ bacterias por mililitro de solución por lo que se depositará 1 ml de la suspensión en un tubo esterilizado y se añadirán 9 ml de caldo nutritivo para poder tener una concentración 10 veces menor, 1.5x10⁸ (la cual es la cantidad requerida). Este procedimiento se realizó con las 4 suspensiones bacterianas y todo el material empleado se esterilizó en autoclave a 121°C con una presión de 15 psi durante 20 minutos. Antes de empezar a realizar los antibiogramas se realizó el estriado de las placas con ayuda de los hisopos con las suspensiones bacterianas ya diluidas. La técnica empleada para la inoculación por placa fue esparcir de un lado hacia otro hasta llegar a la mitad del área de la circunferencia de la placa, se giró 90° y se volvió a esparcir

de un lado hacia otro hasta llegar a la mitad del área, se repitió el procedimiento dos veces más. Una vez hecho el estriado se rotulo cada caja para evitar confusión.

Para la técnica de difusión se realizaron discos los cuales fueron elaborados con papel filtro con un tamaño de 6 mm de diámetro previamente esterilizados. Se depositaron en cantidades de 1 ml, el antibiótico, los blancos y los extractos en diferentes tubos eppendorf. Cada antibiograma contenía 5 discos, los cuales se repartieron de la siguiente manera: uno para el antibiótico; uno para el blanco; tres para los extractos. Con ayuda de unas pinzas de disección los discos se sumergían dentro de los tubos eppendorf y (si es necesario) se dejaban escurrir en cajas Petri vacías estériles. Una vez impregnados y sumergidos correctamente se colocaban dentro de las cajas Petri y se identificaban.

Posteriormente se dejan de 18 a 24 hrs en una incubadora a 35 °C.

Curva de crecimiento

Estandarización de concentración bacteriana

Para estandarizar la cantidad de células en cada pozo de una placa multipozos, es necesario utilizar los estándares de McFarland, los cuales establecen una cantidad de células para una absorbancia específica en un cultivo de bacterias en medio líquido.

El propósito es establecer una metodología más específica que nos permita hacer un análisis más detallado de la forma en que se comportan las bacterias de estudio en presencia de extractos y solventes, en diferentes concentraciones, así como obtener resultados que nos permitan concluir respecto a la eficiencia del efecto tóxico del extracto a base de metanol.

Estándares de McFarland		Óptimo				
McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4	
1.0% Cloruro de bario (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	
1.0% Ácido sulfúrico (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	
Densidad celular aproximada (1X10 ⁸ CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0	
% Transmitancia*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5	
Absorbancia*	0.08 to 0.1	0.257	0.451	0.582	0.669	

Figura 21 Estándares del método de McFarland

Se utilizo agua tridestilada para realizar estos procedimientos así mismo estandarizando cada celda para el espectrofotómetro y posteriormente estandarizando también la concentración bacteriana

Luego una vez obtenido lo deseado y aislando el pellet, se añadió la cantidad de caldo nutritivo necesaria para el llenado de la placa multipozos. **Ver anexo 2.**

Preparación de una solución isotónica a base de cloruro de sodio

Para preparar una solución isotónica de cloruro de sodio (NaCl) con agua destilada, debes seguir los siguientes pasos:

Materiales necesarios

1. Cloruro de sodio (NaCl) de alta pureza
2. Agua destilada.
3. Balanza analítica
4. Matraz o recipiente adecuado para la cantidad de solución que deseas preparar
5. Espátula o cuchara de laboratorio
6. Agitador magnético (opcional)
7. Pipetas (opcional).

Posteriormente se inicia a realizar el procedimiento de la preparación de una solución isotónica a base de cloruro de sodio, para así poder sacar nuestras correctas curvas de crecimiento y realizarlas buen estado. **Ver anexo 3.**

Experimentos usando el estándar de McFarland

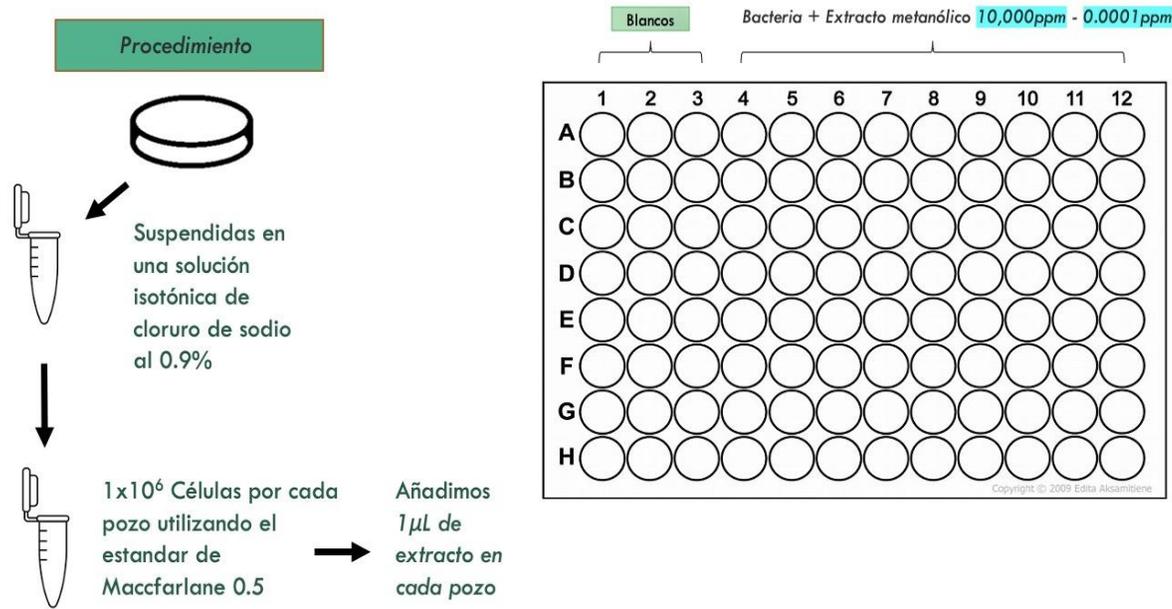


Figura 22 Ilustración del orden de la microplaca

El dato del extracto metanólico se llevó a prueba de 10,000 ppm a 0.0001 para poder verificar el comportamiento de la bacteria según cada concentración.

Cabe destacar que se utilizó al principio del procedimiento la solución isotónica ya que variaba demasiado la absorción con el caldo nutritivo es por eso por lo que se procedió a estandarizar el pellet de bacterias con este método.

RESULTADOS

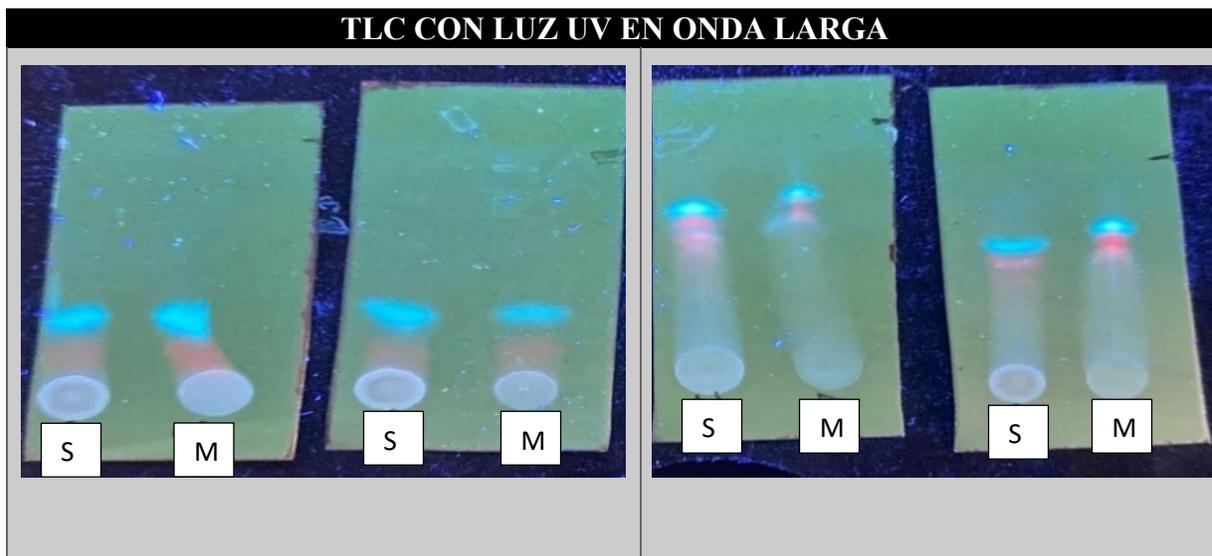


Figura 23 Imágenes representativas de TLC sobre la comparación de extracto por soxhlet vs. maceración de estróbilos de *Pinus*

S= Muestra del extracto por Soxhlet

M= Muestra del extracto por Macerado

La comparación del procedimiento del extracto de *Pinus moctezumae* dio como resultado el mismo número de compuestos, distancia y bandas, por lo que se procedió a utilizar extracción por maceración debido al ahorro de disolvente y mayor rendimiento.

Resultados de la metodología para matraz procedimiento en macerado por ultrasonido:

Se pesaron 50 gramos de estróbilo molido y al final del método descrito anteriormente se obtuvieron 2.27765 gramos de producto de extracto natural de estróbilo, lo que da un rendimiento total del 4.5% de rendimiento de extracción por este método.

Resultados de extracción por maceración en ultrasonido:

Se pesaron 50 gramos de estróbilo molido y al final del método descrito anteriormente se obtuvieron 4.75015 gramos de producto de extracto natural de estróbilo, lo que da un rendimiento total del 9.5% de rendimiento de extracción por este método.

Resultados de extracción de macerado por ultrasonido (gran escala):

Se pesaron 181.0600 gramos de estróbilo molido y al final del método descrito anteriormente se obtuvieron 17.281 gramos de producto de extracto natural de estróbilo, lo que da un rendimiento total del 9.5% de rendimiento de extracción por este método.

Se pesaron 50 gramos de estróbilo molido y al final del método descrito anteriormente se obtuvieron 4.75015 gramos de producto de extracto natural de estróbilo, lo que da un rendimiento total del 9.5% de rendimiento de extracción por este método.

Rendimiento:**Resultados de fracciones de columna cromatográfica de extracto por macerado**

Se obtuvieron tantas fracciones de.... Por ello, se realizó un análisis por TLC de las fracciones:

El extracto obtenido de los estróbilos *moctezumae* estudiados se analizaron por cromatografía en capa fina, obteniendo los siguientes cromatogramas :

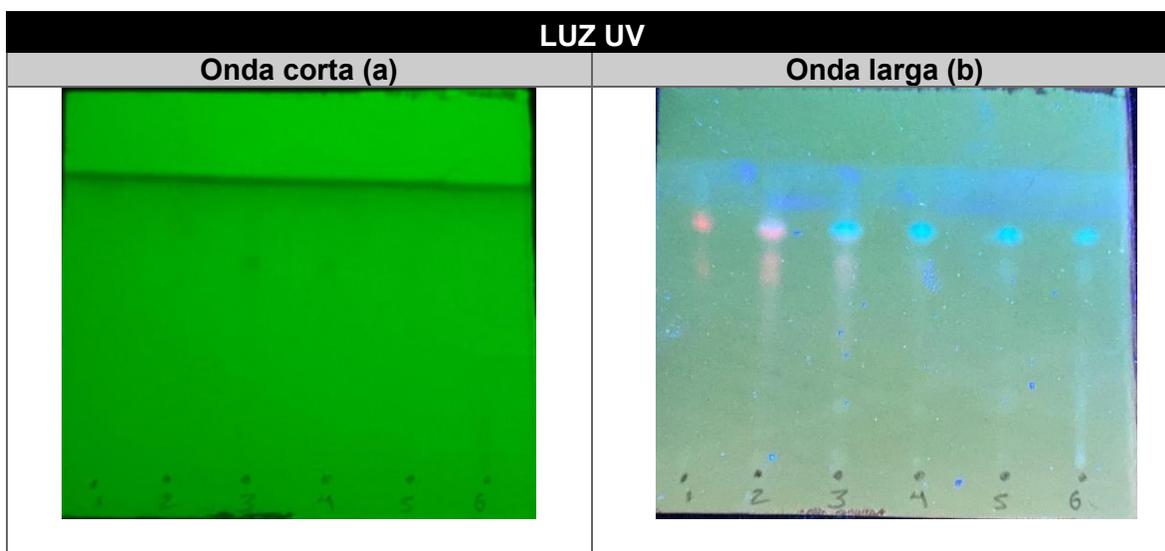


Figura 24 Imagen representativa de TLC de la fracción 1 – 6

Cálculo del factor de retardo = $R_f = (\text{No. fracción} / \text{distancia del disolvente})$

Tabla 6 Resultados de TLC fracción 1-6

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
1a	3.6	2.5	0.694
1b	3.6	2.8	0.777
2a	3.6	2.5	0.694
2b	3.6	2.8	0.777
3a	3.6	2.5	0.694
3b	3.6	2.8	0.777
4a	3.6	2.5	0.694
4b	3.6	2.8	0.777
5a	3.6	2.5	0.694
5b	3.6	2.8	0.777
6a	3.6	2.5	0.694
6b	3.6	2.8	0.777

Cálculo del factor de retardo ($R_f = (\text{No. fracción} / \text{distancia del disolvente})$)

Se midió el factor de retardo de acuerdo al número de compuestos en placa TLC que se encontró en cada banda.

- Fracción 1

$$Rf1a = \frac{2.5}{3.6} = 0.694$$

$$Rf1b = \frac{2.8}{3.6} = 0.777$$

- Fracción 2

$$Rf2a = \frac{2.5}{3.6} = 0.694$$

$$Rf2b = \frac{2.8}{3.6} = 0.777$$

- Fracción 3

$$Rf3a = \frac{2.5}{3.6} = 0.694$$

$$Rf3b = \frac{2.8}{3.6} = 0.777$$

- Fracción 4

$$Rf4a = \frac{2.5}{3.6} = 0.694$$

$$Rf4b = \frac{2.8}{3.6} = 0.777$$

- Fracción 5

$$Rf5a = \frac{2.5}{3.6} = 0.694$$

$$Rf5b = \frac{2.8}{3.6} = 0.777$$

- Fracción 6

$$Rf6a = \frac{2.5}{3.6} = 0.694$$

$$Rf6b = \frac{2.8}{3.6} = 0.777$$

*Observando los cromatogramas (figura 24) en la TLC de onda larga podemos ver mejor los resultados ya que de la fracción 1 a la 6 los compuestos se separaron muy bien, existen varios compuestos en cada banda de fracción y se interpreta que es el mismo compuesto debido a lo linealmente distanciado que se cada compuesto de otro.

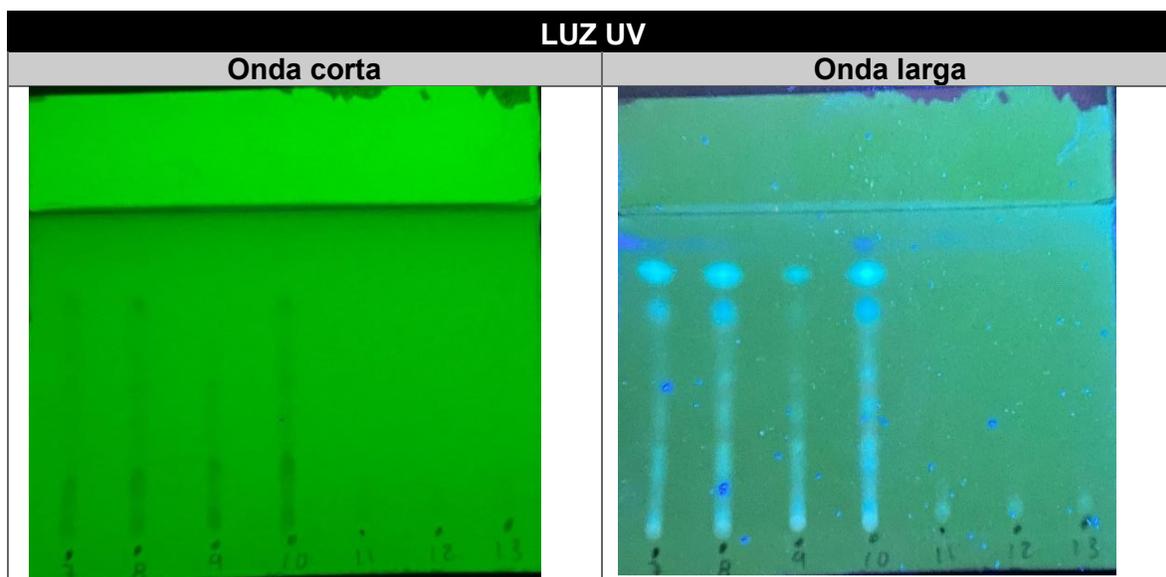


Figura 25 Imagen representativa de TLC de la fracción 7 – 13

Tabla 7 Resultados de TLC fracción 7-13

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
7a	3.9	0.3	0.077
7b	3.9	1	0.256
7c	3.9	1.4	0.356
7d	3.9	1.6	0.41
7e	3.9	2.4	0.615
7f	3.9	2.9	0.743
8a	3.9	0.3	0.077
8b	3.9	1	0.256
8c	3.9	1.4	0.356
8d	3.9	1.6	0.410
8e	3.9	2.4	0.615
8f	3.9	2.9	0.743
9a	3.9	0.3	0.077
9b	3.9	1	0.256
9c	3.9	1.4	0.356
9d	3.9	1.6	0.410
9e	3.9	2.4	0.615
9f	3.9	2.9	0.743
10a	3.9	0.3	0.077
10b	3.9	0.8	0.205
10c	3.9	1	0.256

10d	3.9	1.4	0.356
10e	3.9	1.6	0.410
10f	3.9	2.4	0.615
10g	3.9	2.6	0.743
11a	3.9	0.5	0.128
12a	3.9	0.5	0.128
13a	3.9	0.5	0.128

Cálculo del factor de retardo

- Fracción 7

$$Rf7a = \frac{0.3}{3.9} = 0.077 \quad Rf7b = \frac{1}{3.9} = 0.256 \quad Rf7c = \frac{1.4}{3.9} = 0.356$$

$$Rf7d = \frac{1.6}{3.9} = 0.41 \quad Rf7e = \frac{2.4}{3.9} = 0.615 \quad Rf7f = \frac{2.9}{3.9} = 0.743$$

- Fracción 8

$$Rf8a = \frac{0.3}{3.9} = 0.076 \quad Rf8b = \frac{1}{3.9} = 0.256$$

$$Rf8c = \frac{1.4}{3.9} = 0.076 \quad Rf8d = \frac{1.6}{3.9} = 0.076$$

$$Rf8e = \frac{2.4}{3.9} = 0.076 \quad Rf8f = \frac{2.9}{3.9} = 0.076$$

***Y así sucesivamente se realizó en todas las placas TLC de esta sección el resultado del factor de retardo de cada una de las bandas .**

*Observando los cromatogramas (figura 25) en la TLC de onda larga se puede ver mejor los resultados ya que de la fracción 7 a la 10 cada fracción se separó muy bien, existen varios compuestos en esta banda de fracción y se interpreta que sigue siendo el mismo compuesto debido a lo lineal que se encuentra distanciado cada compuesto de otro. Por otro lado, la fracción 11 a la 13 no hay más compuesto.

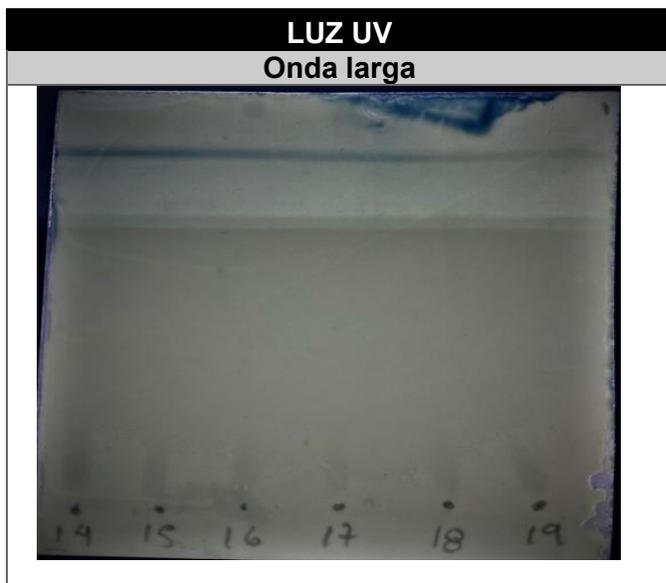


Figura 26 Imagen representativa de TLC de la fracción 14 – 19 (se juntan todas)

Tabla 8 Resultados de TLC fracción 14-19

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
14a	3.4	0.7	0.205
15a	3.4	0.7	0.205
16a	3.4	0.7	0.205
17a	3.4	0.7	0.205
18a	3.4	0.7	0.205
19a	3.4	0.7	0.205

*Observando los cromatogramas (figura 26) en la TLC podemos darnos cuenta de que la fracción 14 a la 19 no hay más compuesto. Hay una parte donde el disolvente ya no arrastra más esa polaridad.

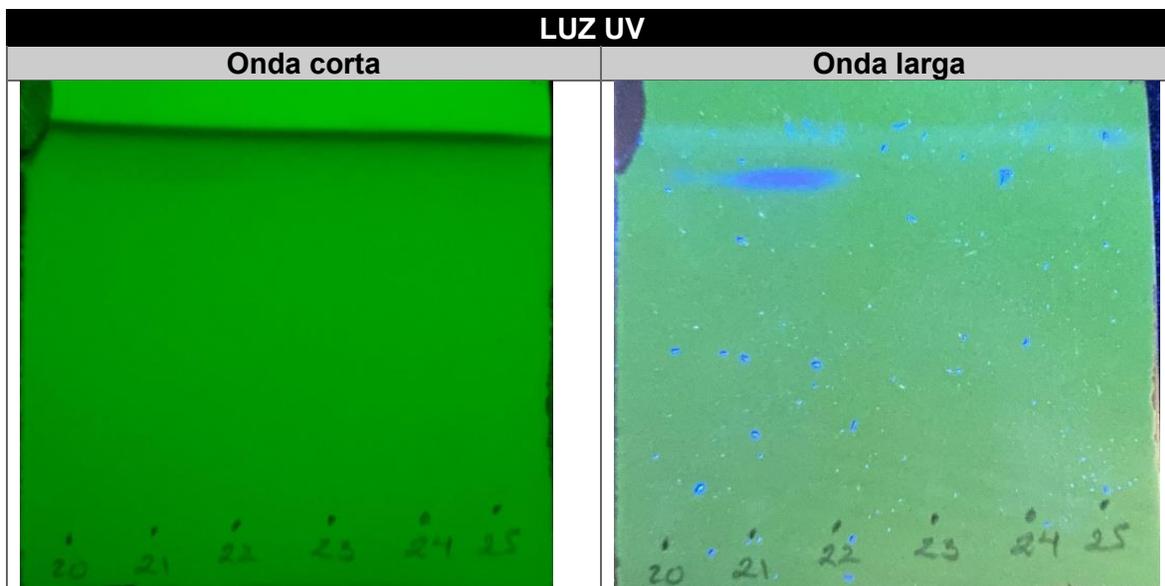


Figura 27 Imagen representativa de TLC de la fracción 20 – 25

Tabla 9 Resultados de TLC fracción 20-25

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
20a	3.5	0	-
21a	3.5	0	-
22a	3.5	0	-
23a	3.5	0	-
24a	3.5	0	-
25a	3.5	0	-

*Observando los cromatogramas (figura 27) en la TLC podemos darnos cuenta de que la fracción 20 a la 25 no hay más compuesto. Hay una parte donde el disolvente ya no arrastra más esa polaridad.

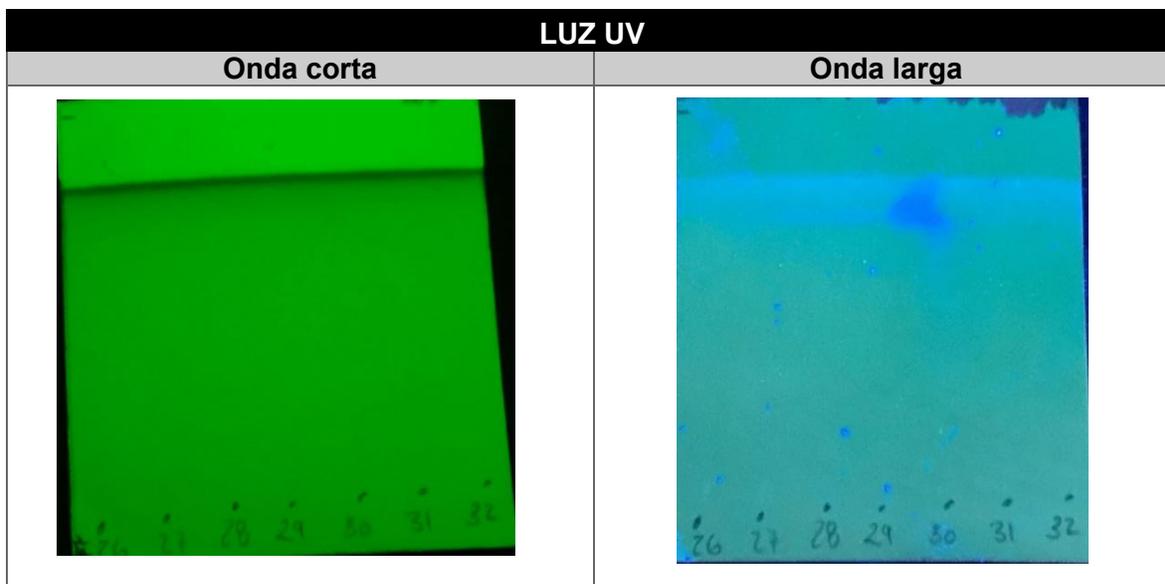


Figura 28 Imagen representativa de TLC de la fracción 26 – 32 (aislar la 30)

Tabla 10. Resultados de TLC fracción 26-32

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
26a	3.4	-	-
27a	3.4	-	-
28a	3.4	-	-
29a	3.4	-	-
30a	3.4	3.1	0.911
31a	3.4	-	-

*Observando los cromatogramas (figura 28) en la TLC podemos darnos cuenta de que la fracción 26 a la 32 no hay más compuesto. Hay una parte donde el disolvente ya no arrastra más esa polaridad.

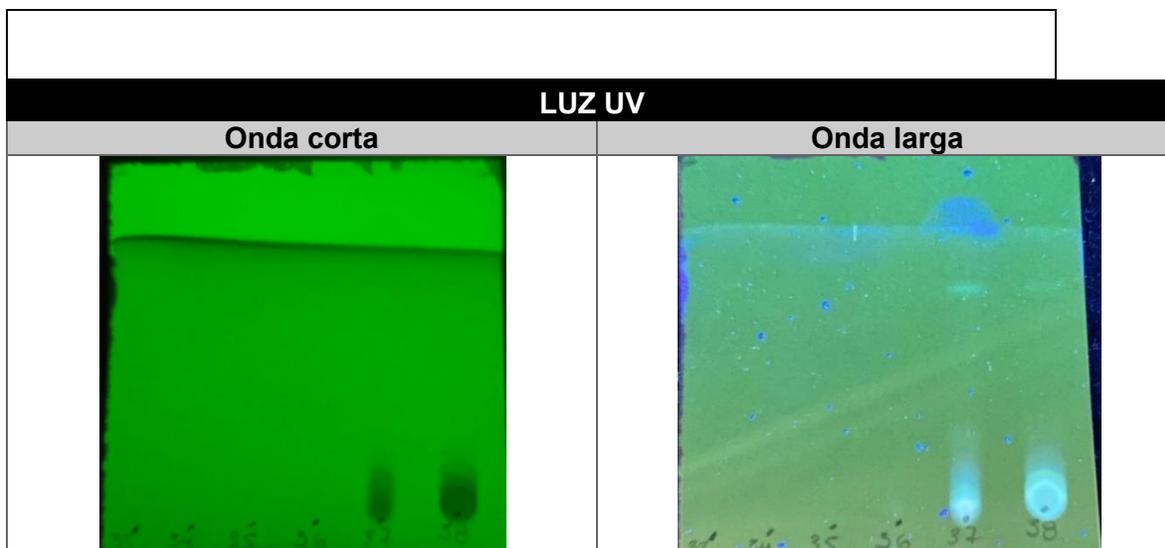


Figura 29 Imagen representativa de TLC de la fracción 33 – 38

Tabla 11 Resultados de TLC fracción 33-38

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
33a	3.4	-	-
34a	3.4	-	-
35a	3.4	-	-
36a	3.4	-	-
37a	3.4	0.4	0.117
37b	3.4	0.6	0.176
38a	3.4	0.4	0.117
39b	3.4	0.6	0.176

Observando los cromatogramas (figura 29) en la TLC de onda larga se puede ver mejor los resultados ya que en la fracción 37 y 38 cada banda se separó ligeramente, se interpreta que existen 2 compuestos en estas dos bandas de fracción, por lo que se procede a juntar estas dos fracciones.

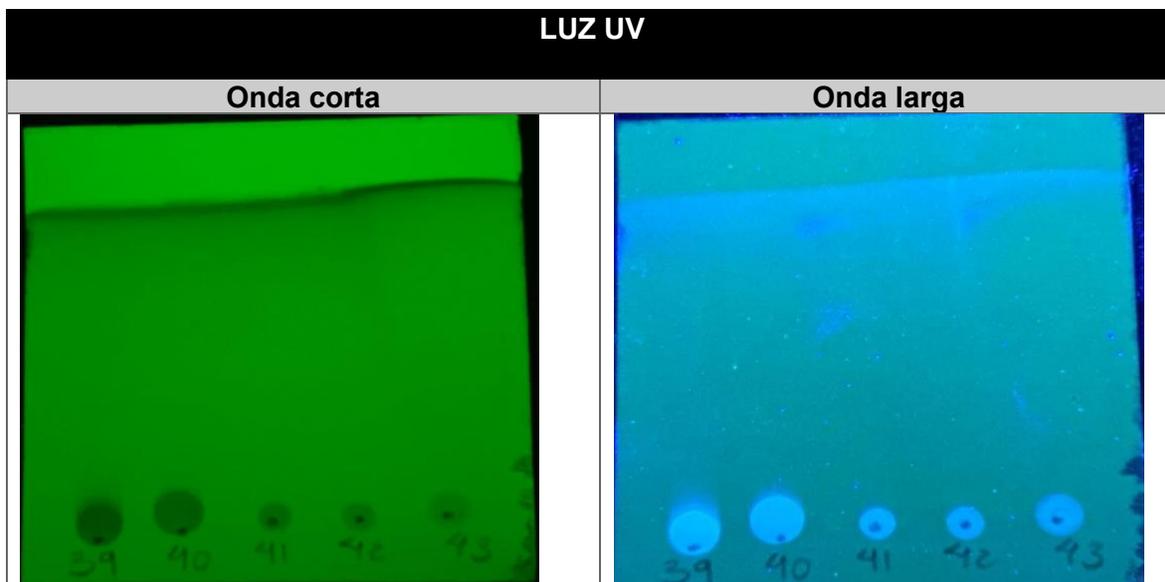


Figura 30 Imagen representativa de TLC de la fracción 39 – 43 (Se juntaron todas por el color amarillo característico)

Tabla 12 Resultados de TLC fracción 39-43

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
39a	3.3	0.3	0.090
39b	3.3	0.4	0.121
40a	3.3	0.4	0.121
41a	3.3	0	-
42a	3.3	0	-
43a	3.3	0	-

Observando los cromatogramas (figura 30) en la TLC de onda larga se puede ver mejor los resultados ya que la fracción 39, se interpreta que existen 2 compuestos separados ligeramente en esta banda de fracción, también se puede ver ligeramente que en la fracción 40 solo hay un compuesto, cabe mencionar que por el color amarillo característico de todas se procedió a juntarlas.

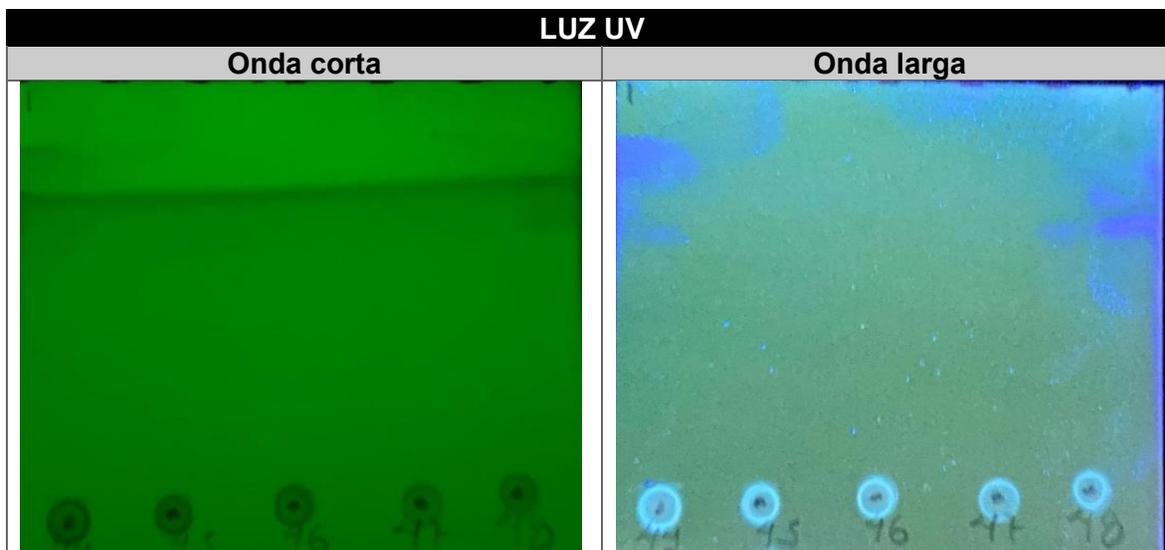


Figura 31 Imagen representativa de TLC de la fracción 44 – 48

Tabla 13 Resultados de TLC fracción 44-48

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
44a	-	0	-
45a	-	0	-
46a	-	0	-
47a	-	0	-
48a	-	0	-

Observando los cromatogramas (figura 31) en las TLC podemos darnos cuenta de que la fracción 44 a la 48 no hay más compuestos. Hay una parte donde el disolvente ya no arrastra más esa polaridad.

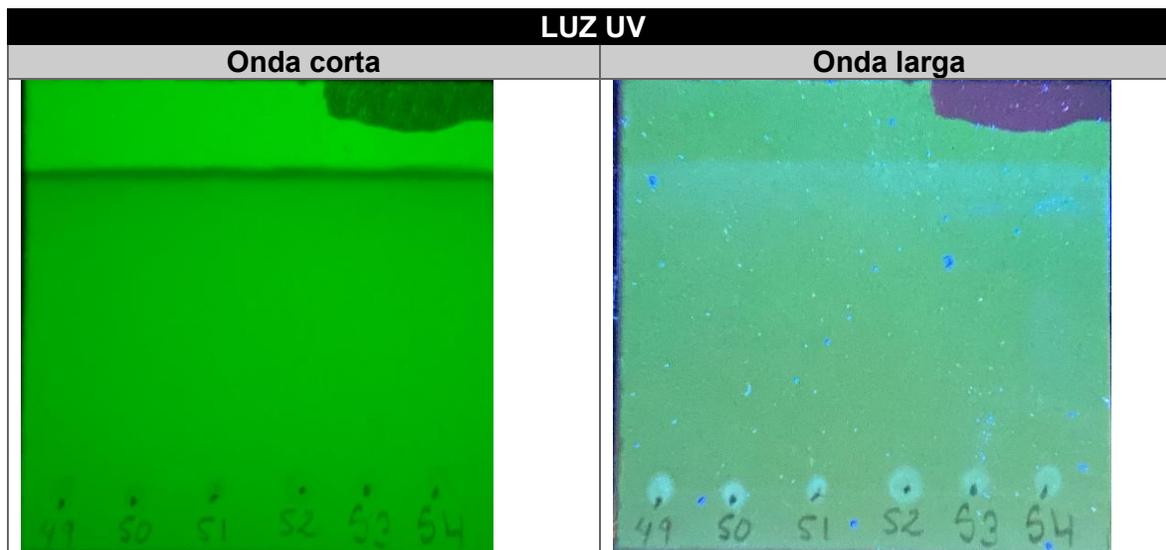


Figura 32 Imagen representativa de TLC de la fracción 49 – 54

Tabla 14 Resultados de TLC fracción 49-54

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
49a	-	0	-
50a	-	0	-
51a	-	0	-
52a	-	0	-
53a	-	0	-
54a	-	0	-

*Observando los cromatogramas (figura 32) en las TLC podemos darnos cuenta de que la fracción 49 a la 54 no hay más compuestos. Hay una parte donde el disolvente ya no arrastra más esa polaridad.

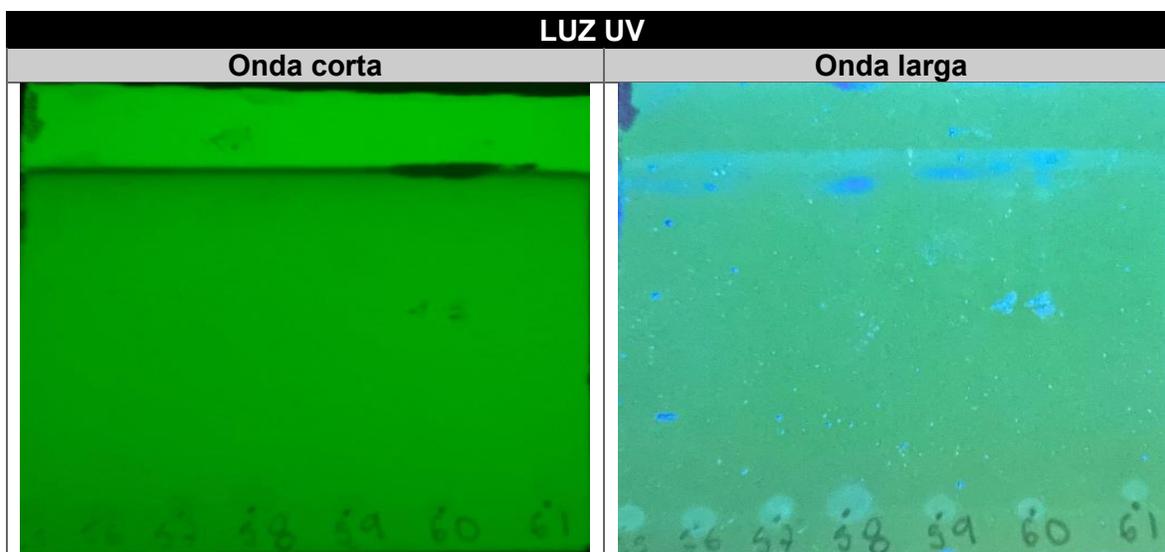


Figura 33 Imagen representativa de TLC de la fracción 55-61 (no hay compuestos)

Tabla 15 Resultados de TLC fracción 55-61

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
55a	-	0	-
56a	-	0	-
57a	-	0	-
58a	-	0	-
59a	-	0	-
60a	-	0	-
61a	-	0	-

*Observando los cromatogramas (figura 33) en las TLC podemos darnos cuenta de que la fracción 55 a la 61 no hay más compuestos. Hay una parte donde el disolvente ya no arrastra más esa polaridad.

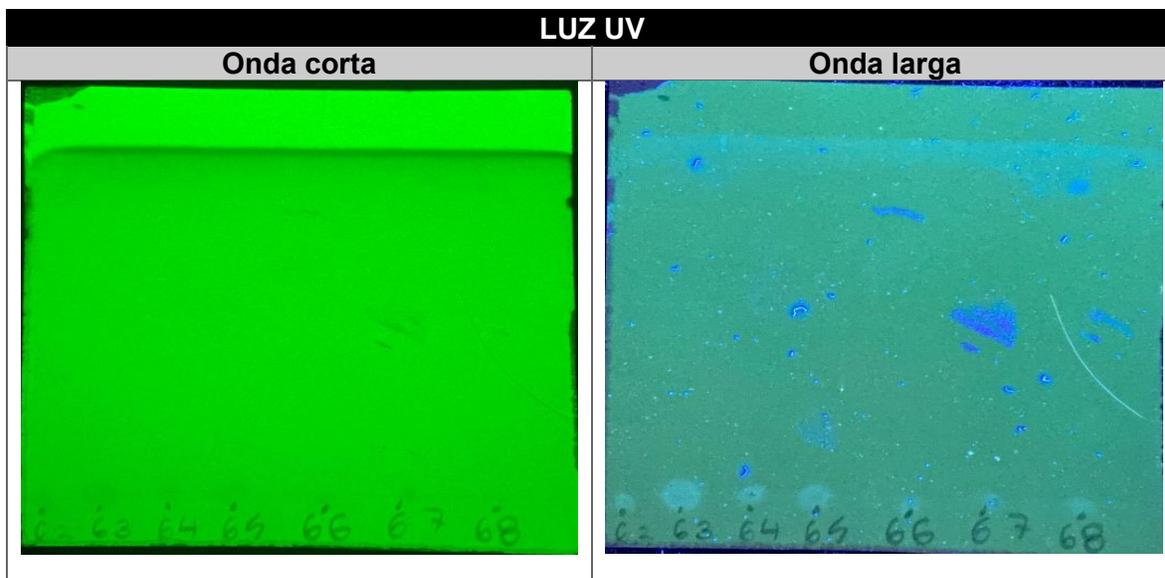


Figura 34 Imagen representativa de TLC de la fracción 62 – 68 (no hay compuestos)

Tabla 16 Resultados de TLC fracción 62-68

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
62a	-	0	-
63a	-	0	-
64a	-	0	-
65a	-	0	-
66a	-	0	-
67a	-	0	-
68a	-	0	-

*Observando los cromatogramas (figura 34) en las TLC podemos darnos cuenta de que la fracción 62 a la 68 no hay más compuestos. Hay una parte donde el disolvente ya no arrastra más esa polaridad.

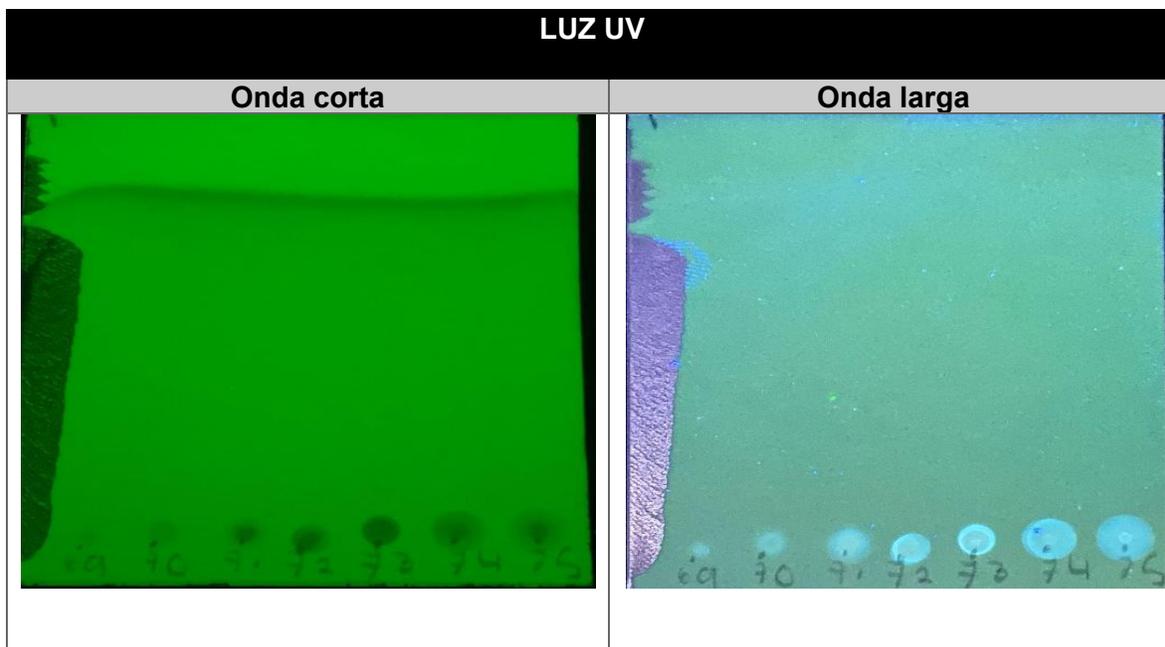


Figura 35 Imagen representativa de TLC de la fracción 69 – 75 (ninguna)

Tabla 17 Resultados de TLC fracción 69-75

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
69a	-	0	-
70a	-	0	-
71a	-	0	-
72a	-	0	-
73a	-	0	-
74a	-	0	-
75a	-	0	-

*Observando los cromatogramas (figura 35) en las TLC podemos darnos cuenta de que la fracción 69 a la 75 no hay más compuestos. Hay una parte donde el disolvente ya no arrastra más esa polaridad.

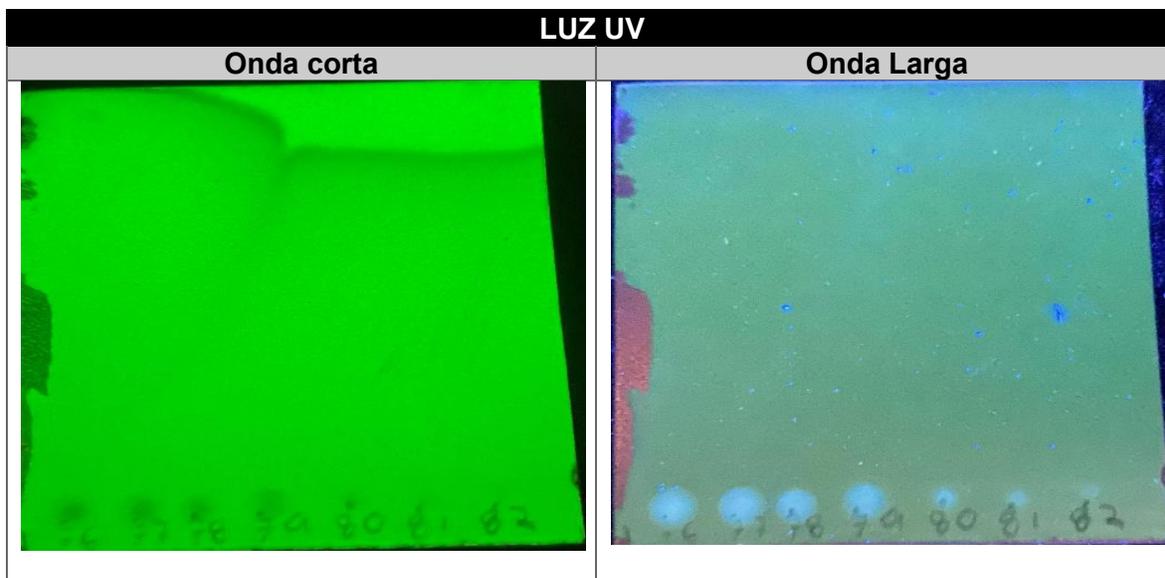


Figura 36 Imagen representativa de TLC de la fracción 76 – 82 (no hay compuestos)

Tabla 18 Resultados de TLC fracción 76-82

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
76a	-	0	-
77a	-	0	-
78a	-	0	-
79a	-	0	-
80a	-	0	-
81a	-	0	-
82a	-	0	-

*Observando los cromatogramas (figura 36) en las TLC podemos darnos cuenta de que la fracción 76 a la 82 no hay más compuestos. Hay una parte donde el disolvente ya no arrastra más esa polaridad.

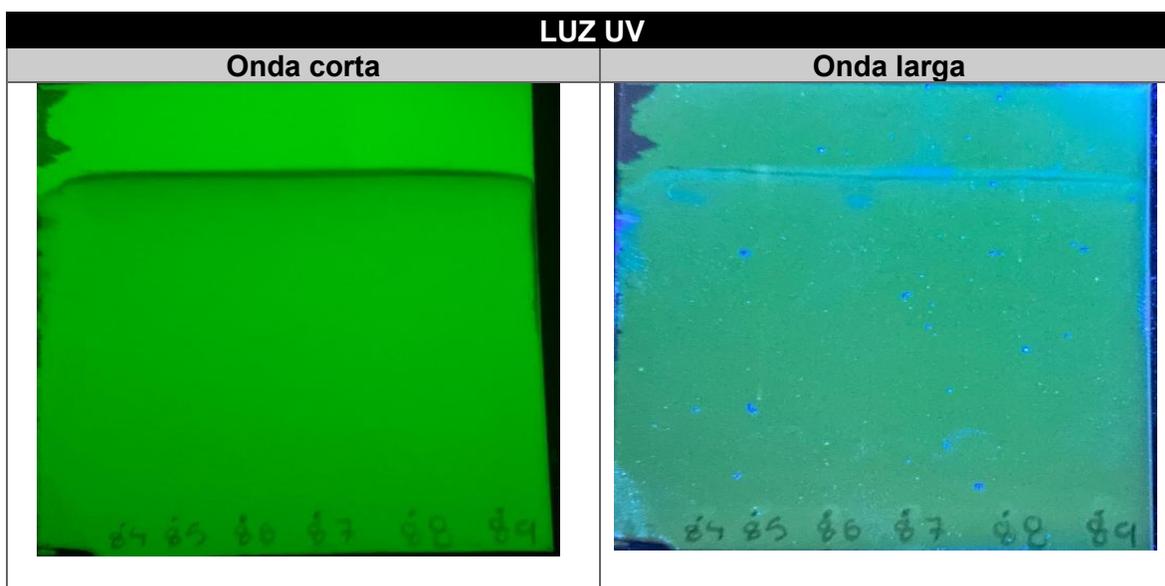


Figura 37 Imagen representativa de TLC de la fracción 83 – 89 (ninguna)

Tabla 19 Resultados de TLC fracción 83 - 89

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
83a	-	0	-
84a	-	0	-
85a	-	0	-
86a	-	0	-
87a	-	0	-
88a	-	0	-
89a	-	0	-

Observando los cromatogramas (figura 37) en las TLC podemos darnos cuenta de que la fracción 83 a la 89 no hay más compuestos. Hay una parte donde el disolvente ya no arrastra más esa polaridad.

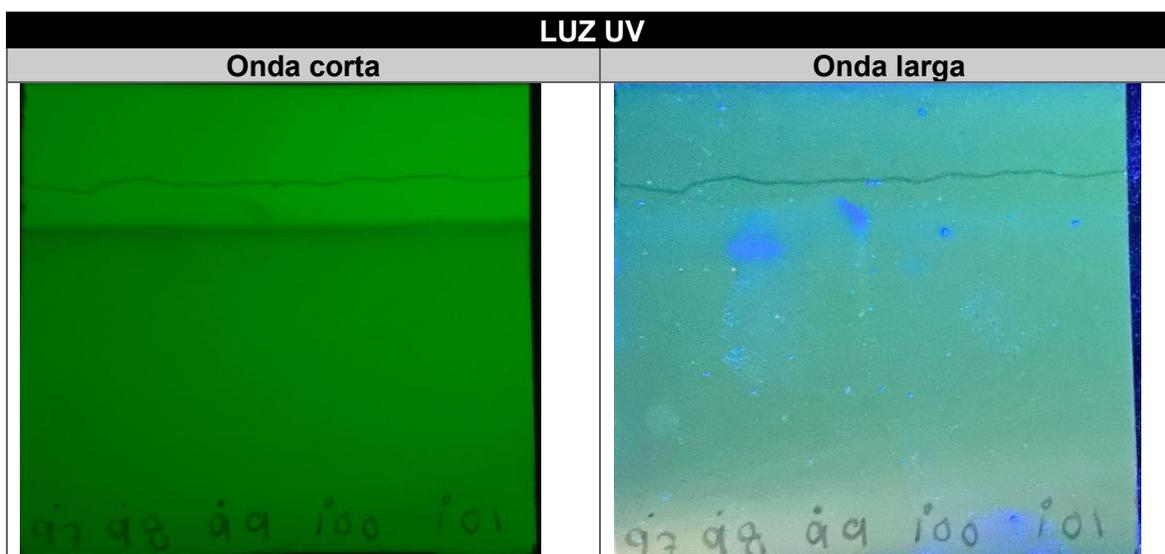


Figura 38 Imagen representativa de TLC de la fracción 97 – 101 (no hay compuesto)

Tabla 20 Resultados de TLC fracción 97-101

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
97a	-	0	-
98a	-	0	-
99a	-	0	-
100a	-	0	-
101a	-	0	-

*Observando los cromatogramas (figura 38) en las TLC podemos darnos cuenta de que la fracción 97 a la 101 no hay más compuestos. Hay una parte donde el disolvente ya no arrastra más esa polaridad.

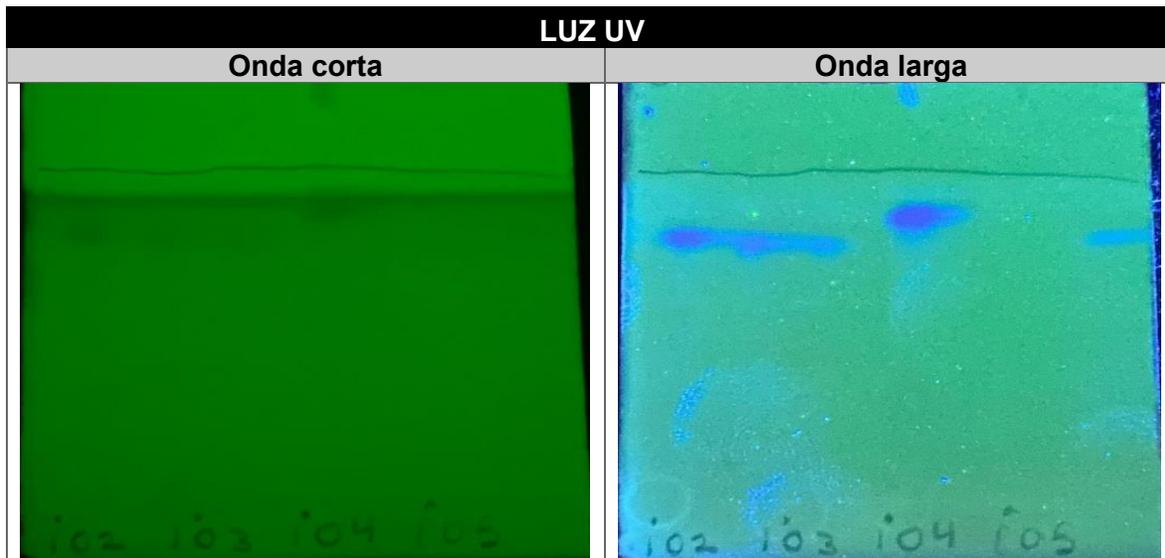


Figura 39 Imagen representativa de TLC de la fracción 102 – 105

Tabla 21 Resultados de TLC fracción 102-105

No. Fracción	Distancia de disolvente (cm)	Distancia de la fracción (cm)	Rf
102a	-	0	-
103a	-	0	-
104a	-	0	-
105a	-	0	-

*Observando los cromatogramas (figura 39) en las TLC podemos darnos cuenta de que la fracción 102 a la 105 no hay más compuestos. Hay una parte donde el disolvente ya no arrastra más esa polaridad.

En total se recolectaron 10 secciones de fracciones de extracto de *Pinus moctezumae* de la columna separación de cromatografía.

Resultado posterior a la concentración de las fracciones elegidas

Tabla 22 Resultados de las agrupaciones de cada fracción del extracto de estróbilos de *Pinus moctezumae*

Fracción agrupada	Color	Código
1-6	Verde	Madrigal1 (M1)
7-10	Amarillo	Madrigal2 (M2)
11-13	Incoloro	Madrigal3 (M3)
14-19	Incoloro	Madrigal4 (M4)
30	Incoloro	Madrigal5 (M5)
37-38	Amarillo pálido	Madrigal6 (M6)
39-43	Amarillo brillante	Madrigal7 (M7)
48-49	Amarillo pálido	Madrigal8 (M8)
70-79	Anaranjado	Madrigal9 (M9)
102-105	Incoloro	Madrigal10 (M10)

Nota: el nombre del código Madrigal9 fue nombre otorgado solo para poder identificar el color y fracción agrupada en su totalidad.

Resultados de los antibiogramas

Para la interpretación de los diámetros del halo de inhibición con las CMI, y estableciendo las correspondientes rectas de regresión, se han fijado unos criterios para clasificar las cepas estudiadas. De esta forma se han fijado tres categorías : (S) sensible , (R) resistentes y (N) susceptibles, por lo que la regla general indica que un diámetro de inhibición de 30 a 35 mm es indicativo de una cepa altamente sensible, mientras que diámetros de zona de inhibición inferiores a 15 mm son los que presentan cepas resistentes.

Términos:

Sensible: Indica que la infección ocasionada por la cepa para que se ha determinado la concentración mínima inhibitoria (CMI) o su correspondiente halo de inhibición puede tratarse de forma adecuada empleando las dosis habituales de antimicrobiano, en función del tipo de infección y de la especie considerada.

Resistente: Se refiere a aquellos microorganismos que no se inhiben por las concentraciones habitualmente alcanzadas en sangre/tejidos del correspondiente antimicrobiano, o a aquellos microorganismos en los que existen mecanismos de resistencias específicos para el agente estudiado en los que no ha habido una adecuada respuesta clínica cuando se ha usado como tratamiento el correspondiente antimicrobiano.

Susceptible: Se refiere cuando no hay nada de inhibición en la cepa y no es para nada sensible.

REGLA GENERAL DE LA CLASIFICACIÓN DE LOS DIÁMETROS DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS ANTIBIOGRAMAS:

- ✓ 35 – 15 mm = Sensible
- ✓ Inferiores a 15 mm = Resistente
- ✓ 0 cm = Susceptible

Ejemplo:

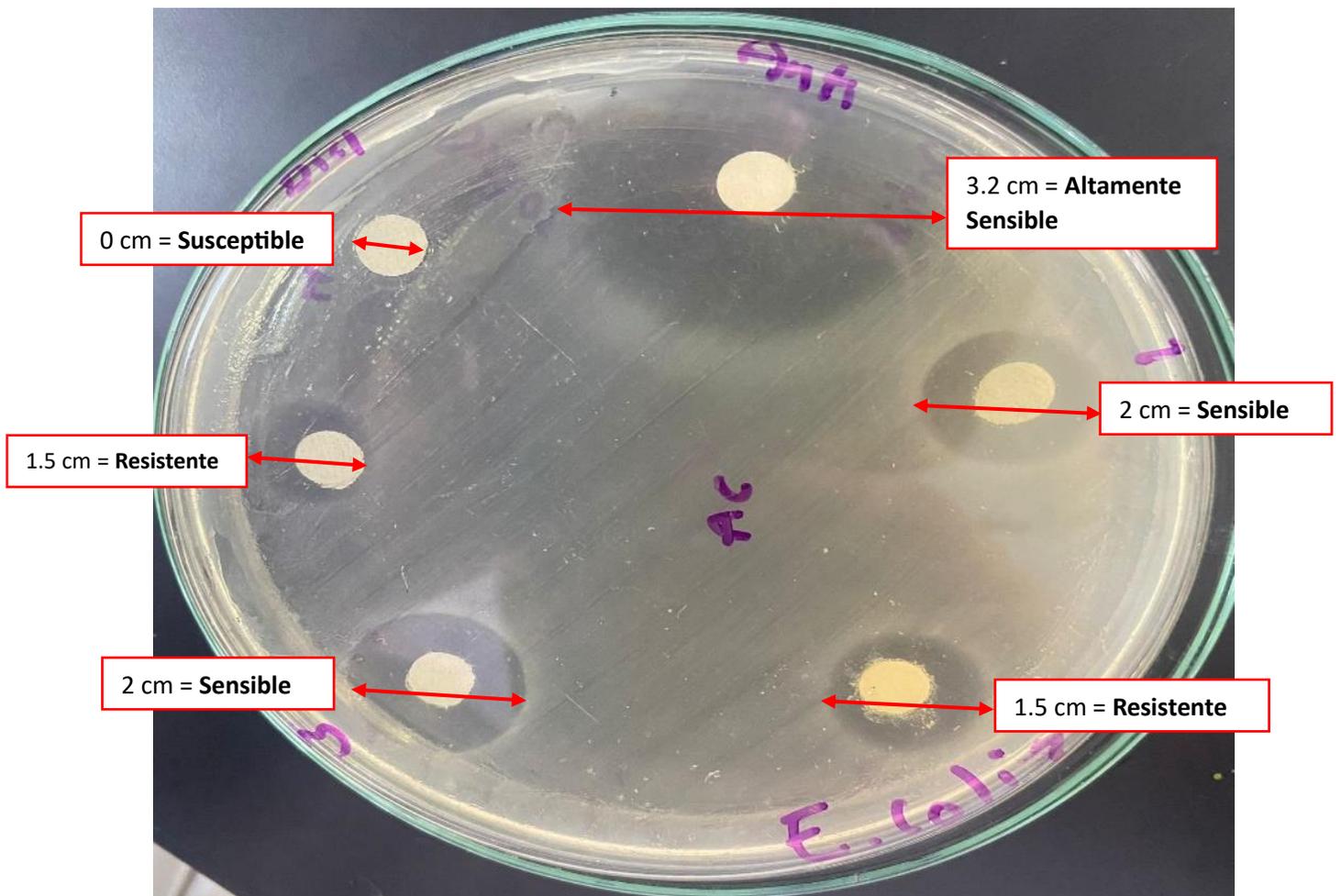


Figura 40 Interpretación de la regla general de los diámetros del halo de inhibición en los antibiogramas

Resultados de extracción total metanólico por maceración

Se realizaron pruebas de cada cepa: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, En donde tenemos nuestro control utilizando el antibiótico levofloxacino a 100 ppm + nuestro blanco (metanol) + nuestras tres muestras de extracto total metanólico de estróbilos femeninos de *Pinus moctezumae*.

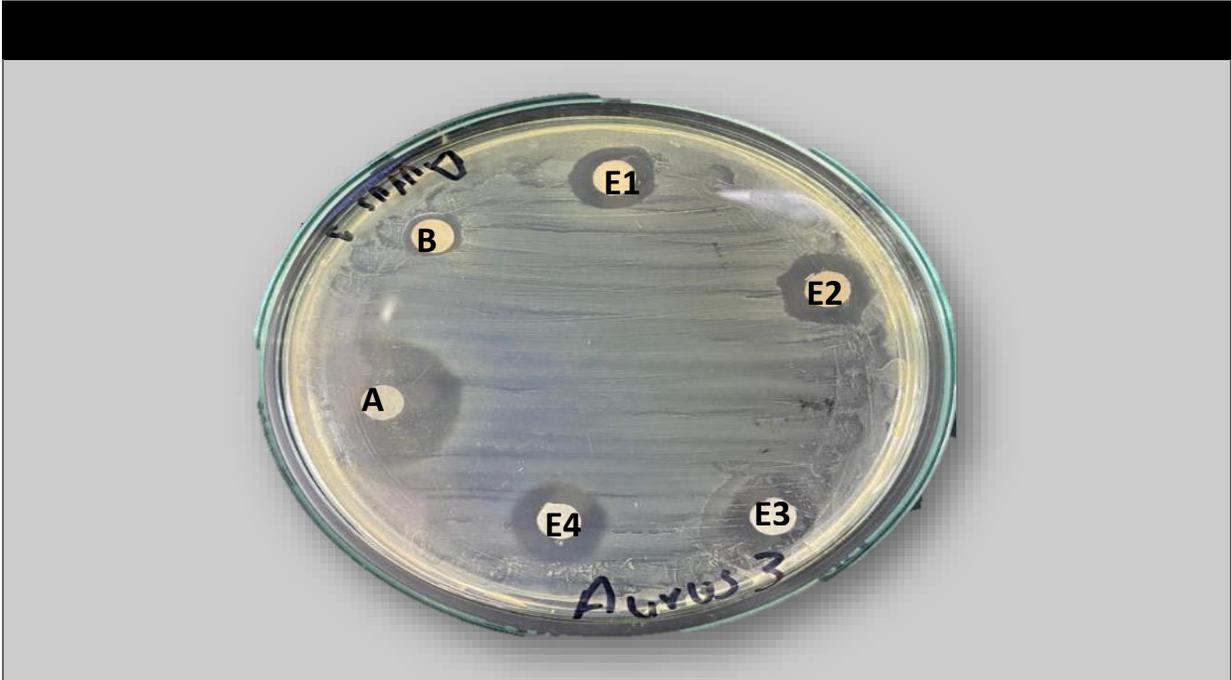


Figura 41 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total sobre la bacteria *S. aureus*

A = Antibiotico ciprofloxacino [1 mg / 10 ml]

B= Blanco (Metanol)

E= E1, E2, E3, E4 = Extracto metanólico total

Podemos observar que la cepa *S. aureus* tiene como resultado que es resistente al extracto metanólico total de estróbilos femeninos de *Pinus moctezumae*.

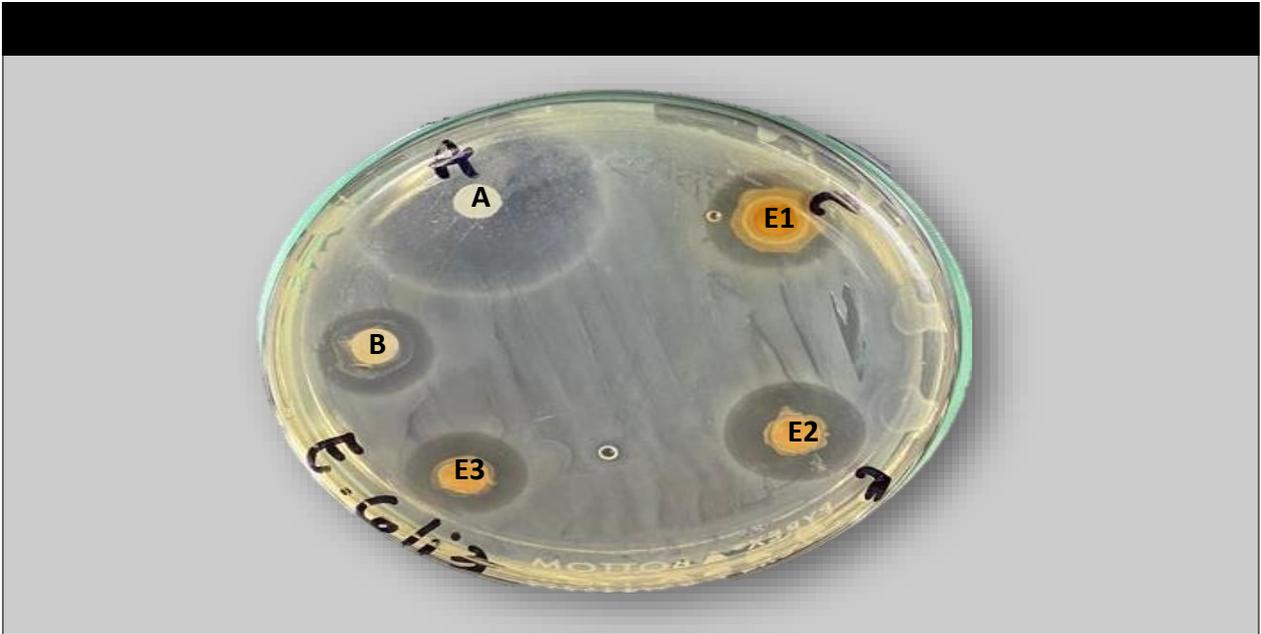


Figura 42 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total sobre la bacteria *E. coli*

A = Antibiotico ciprofloxacino [1 mg / 10 ml]

B= Blanco (Metanol)

E= E1, E2, E3 = Extracto metanolico total

Podemos observar que la cepa *E. coli* tiene como resultado que es sensible al extracto metanólico total de estróbilos femeninos de ***Pinus Moctezumae***.



Figura 43 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total sobre la bacteria *S. pyogenes*.

A = Antibiotico ciprofloxacino [1 mg / 10 ml]

B= Blanco (Metanol)

E= E1, E2, E3 = Extracto metanolico total

En estas cepas podemos observar que la cepa *S. pyogenes* tiene como resultado que es susceptible al extracto metanólico total de estróbilos femeninos de ***Pinus moctezumae***



Figura 44 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total sobre la bacteria *S. typhi*.

A = Antibiotico ciprofloxacino [1 mg / 10 ml]

B= Blanco (Metanol)

E= E1, E2, E3, E4 = Extracto metanólico total

En esta cepa podemos observar que en la figura 44 la cepa *S. typhi* tiene como resultado que es susceptible al extracto metanólico total de estróbilos femeninos de ***Pinus moctezumae***.

Debido a los buenos resultados de las mediciones del halo de inhibición se procedió a seguir realizando más pruebas de antibiogramas ,por lo que se optó por verificar el efecto antimicrobiano por cada compuesto y verificar si cada uno tenía la misma sensibilidad bactericida ya que este extracto total de estróbilos salió con los resultados esperados en cada cepa que estamos trabajando.

Resultados de los Antibiogramas de las fracciones 1 a la 10 recolectadas

Se realizo antibiogramas por cada cepa : ***Salmonella typhi***, ***Escherichia coli***, ***Streptococcus pyogenes***, ***staphylococcus aureus***. En donde tenemos nuestro control

utilizando el antibiótico levofloxacino a 100 ppm + nuestro blanco + una muestra de cada fracción 1- 10 del extracto total de estróbilos femeninos de ***Pinus moctezumae***.

Cepas de *S. typhi*

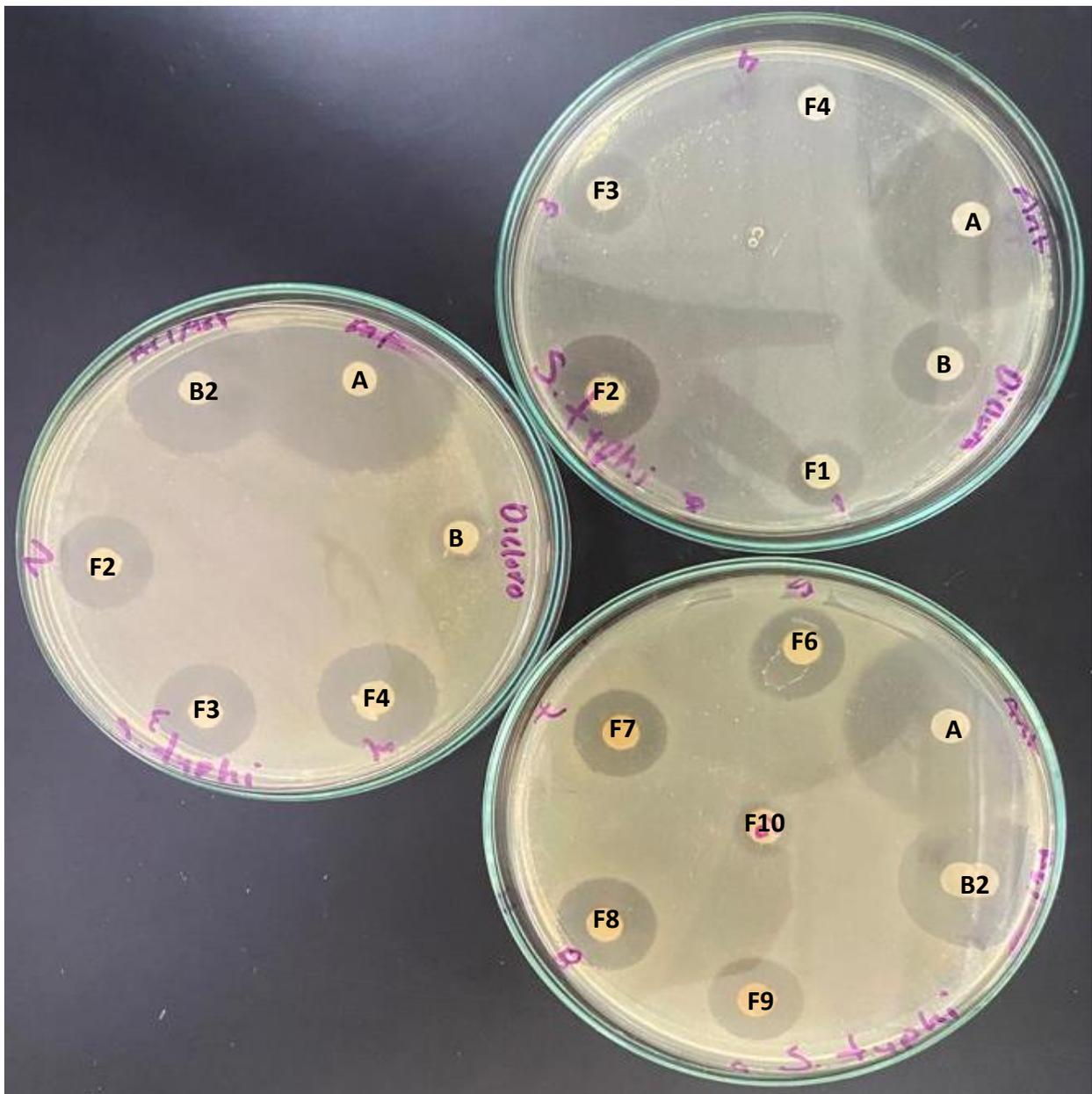


Figura 45 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico recolectadas en fracción de 1 a la 10 sobre la bacteria *S. pyogenes*

Nota: se decidió poner mas de un blanco debido al sistema principal con la cual se corrió la columna y tener un mejor panorama del comportamiento de los resultados de cada sección de fracción.

A = Antibiotico ciprofloxacino [1 mg / 10 ml]

B= Blanco (disolvente dicloro)

B2=Blanco 2 (disolvente Acetato 80 : 20 Metanol)

F= F1, F2,F3,F3,F4,F5,F6,F7,F8,F9,F10 = Fracción

En estas cepas podemos observar que en la figura 45 , la cepa S. Typhi es una bacteria gram negativa y tiene como resultado que es sensible a las fracciones recolectadas de la columna de separación 1-10 del extracto metanólico total de estróbilos femeninos de **Pinus moctezumae**. Cabe resaltar que se llevaron 2 blancos debido a los sistemas principales que se corrieron en la columna ya establecida principal.

Cepas de *E. coli*

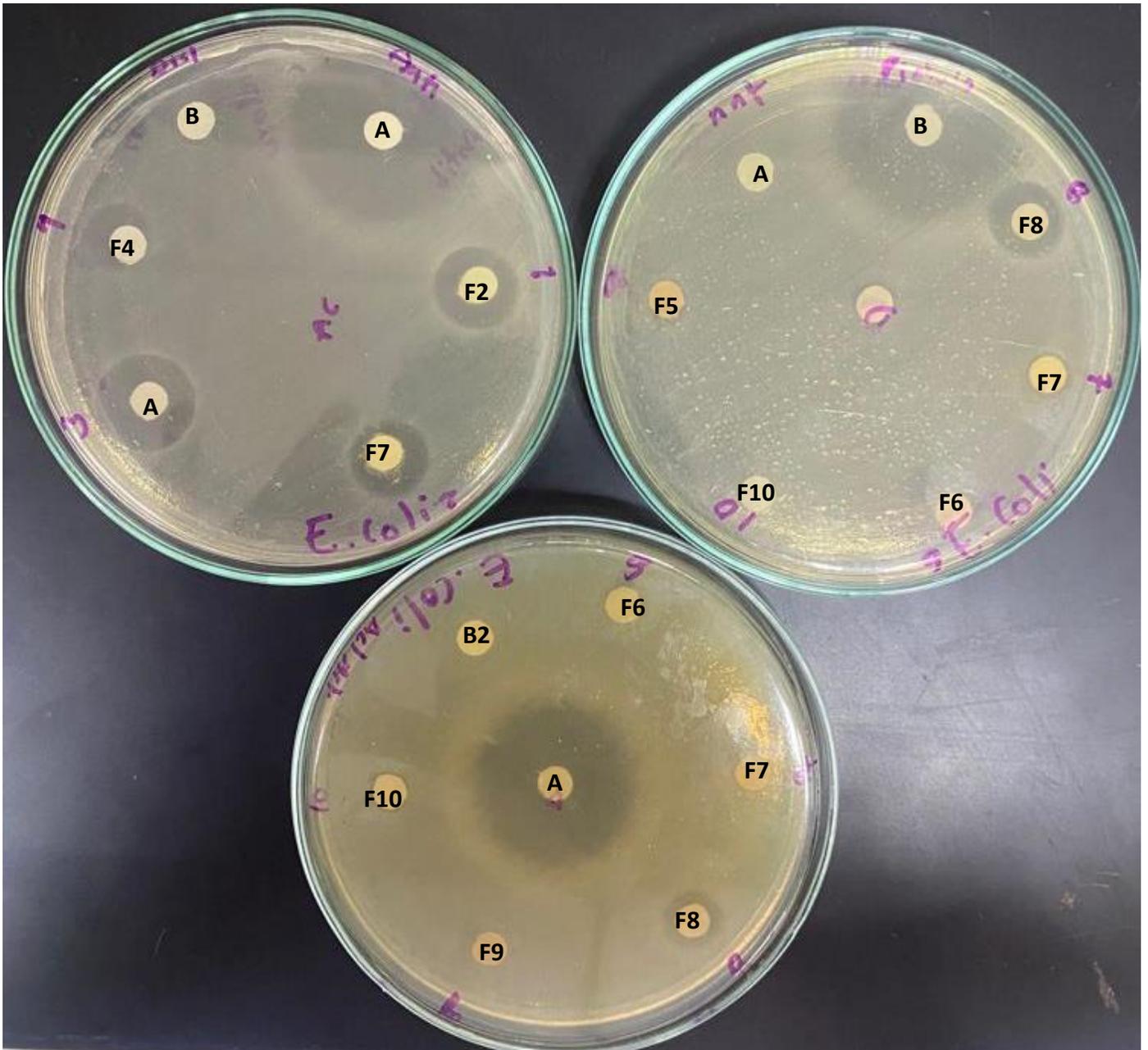


Figura 46 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico recolectadas en fracción de 1 a la 10 sobre la bacteria *E. coli*

A = Antibiotico ciprofloxacino [1 mg / 10 ml]

B= Blanco (Dicloro)

B2=Blanco 2 (Ac 80/20 Met)

F= F1, F2,F3,F3,F4,F5,F6,F7,F8,F9,F10 = Fracción

En estas cepas podemos observar que en la figura 46 , la cepa *E. coli* tiene como resultado que es sensible a las fracciones recolectadas de la columna de separación 1-10 del extracto metanólico total de estróbilos femeninos de *Pinus moctezumae*.



Figura 47 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico recolectadas en fracción de 1 a la 10 sobre la bacteria *S. aureus*.

A = Antibiotico ciprofloxacino [1 mg / 10 ml]

B= Blanco (Dicloro)

B2=Blanco 2 (Ac 80 / 20 Met)

F= F1, F2,F3,F4,F5,F6,F7,F8,F9,F10 = Fracción

En estas cepas podemos observar que en la figura 47 , la cepa *S. aureus* tiene como resultado que es resistente a las fracciones recolectadas de la columna de separación de la 1-10 del extracto metanólico total de estróbilos femeninos de ***Pinus moctezumae***.

Cepas de *S. pyogenes*

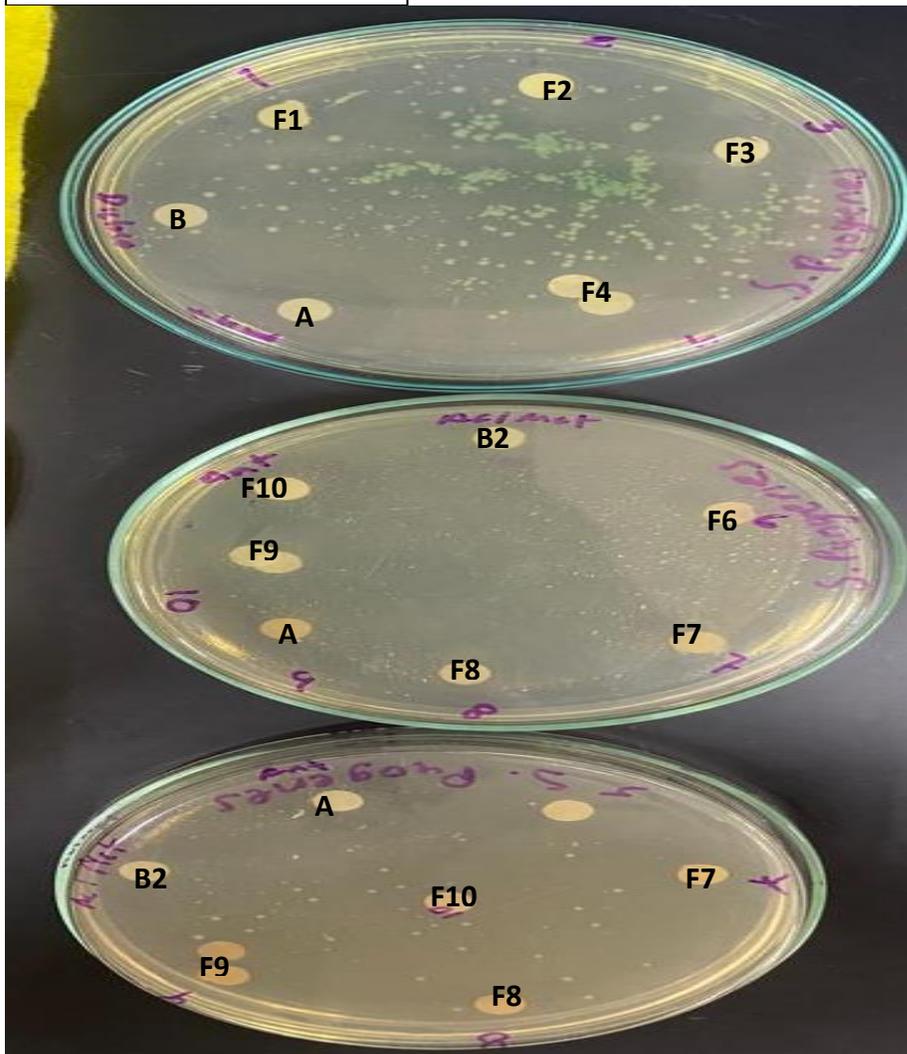


Figura 48 Imagen representativa del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico recolectadas en fracción de 1 a la 10 sobre la bacteria *S. pyogenes*

A = Antibiotico ciprofloxacino [1 mg / 10 ml]

B= Blanco (Dicloro)

B2=Blanco 2 (Ac/Met)

F= F1, F2,F3,F3,F4,F5,F6,F7,F8,F9,F10 = Fracción

En estas cepas podemos observar que en la figura 48, la cepa *S. pyogenes* tiene como resultado que es susceptible a las fracciones recolectadas de la columna de separación de la 1-10 del extracto metanólico total de estróbilos femeninos de ***Pinus moctezumae***.

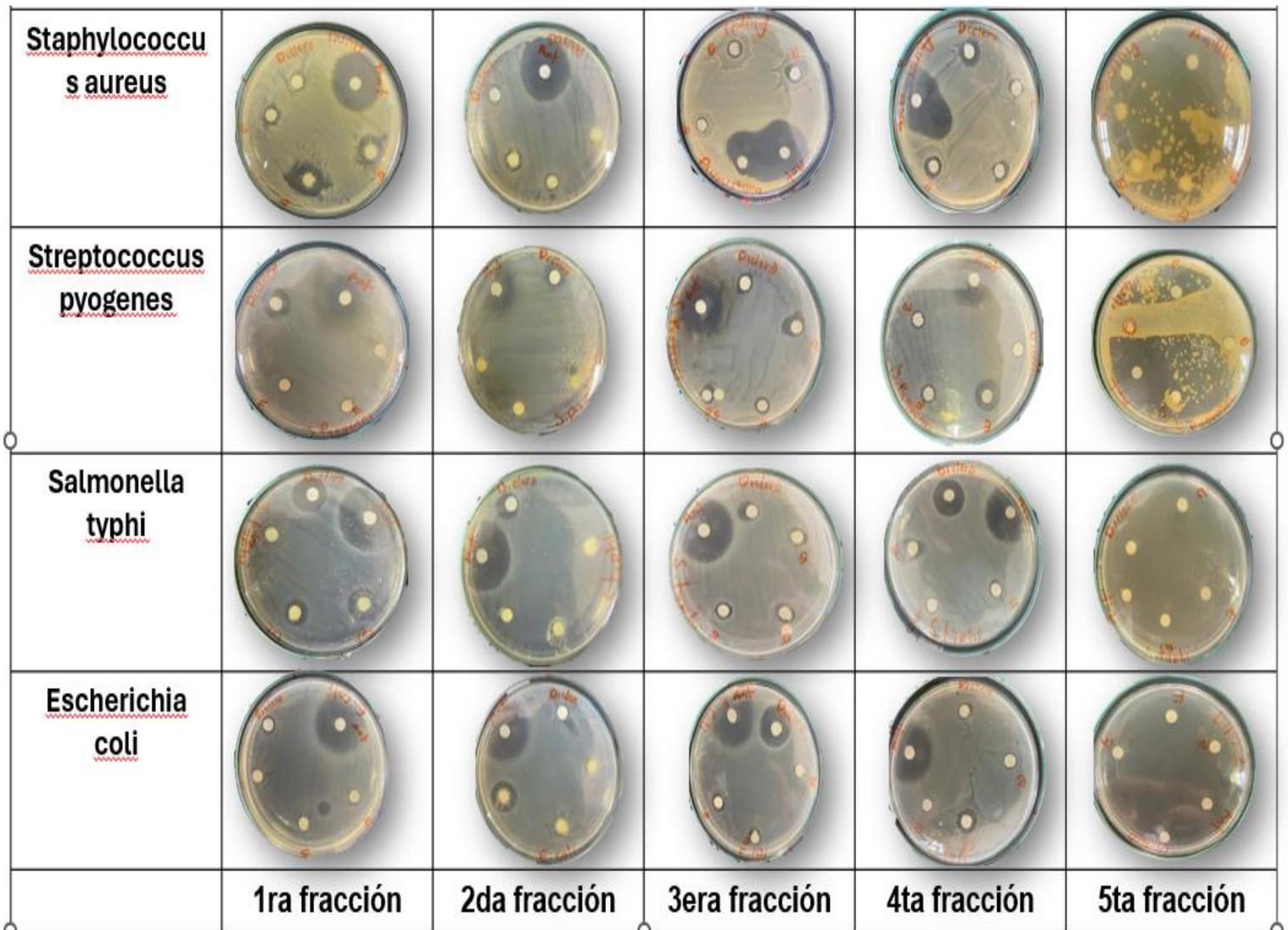


Figura 49 Diagrama de antibiogramas por cada fracción

<u>Staphylococcus aureus</u>				
<u>Streptococcus pyogenes</u>				
<u>Salmonella typhi</u>				
<u>Escherichia coli</u>				
	6ta fracción	7ma fracción	8va fracción	9na fracción

Figura 50 Diagrama de antibiogramas por cada fracción

Se procedió a la separación de cada compuesto del extracto metanólico para verificar que tuvieran el mismo efecto bactericida por cada fracción.

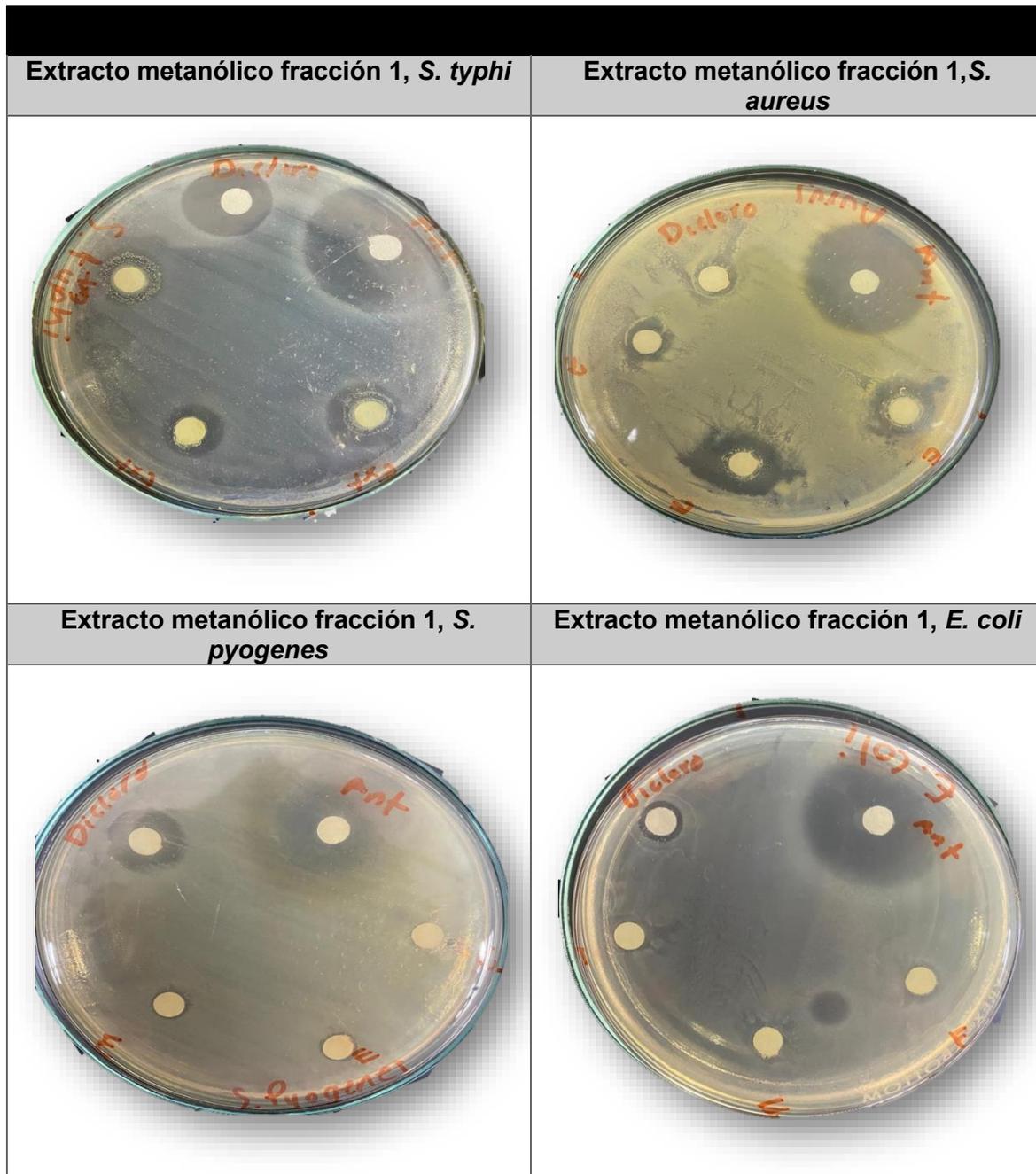


Figura 51 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total recolectadas en la fracción de 1

*En la figura 51 podemos ver que solo la cepa de *S. typhi* tiene resistencia a la primera fracción y las demás fueron susceptibles.

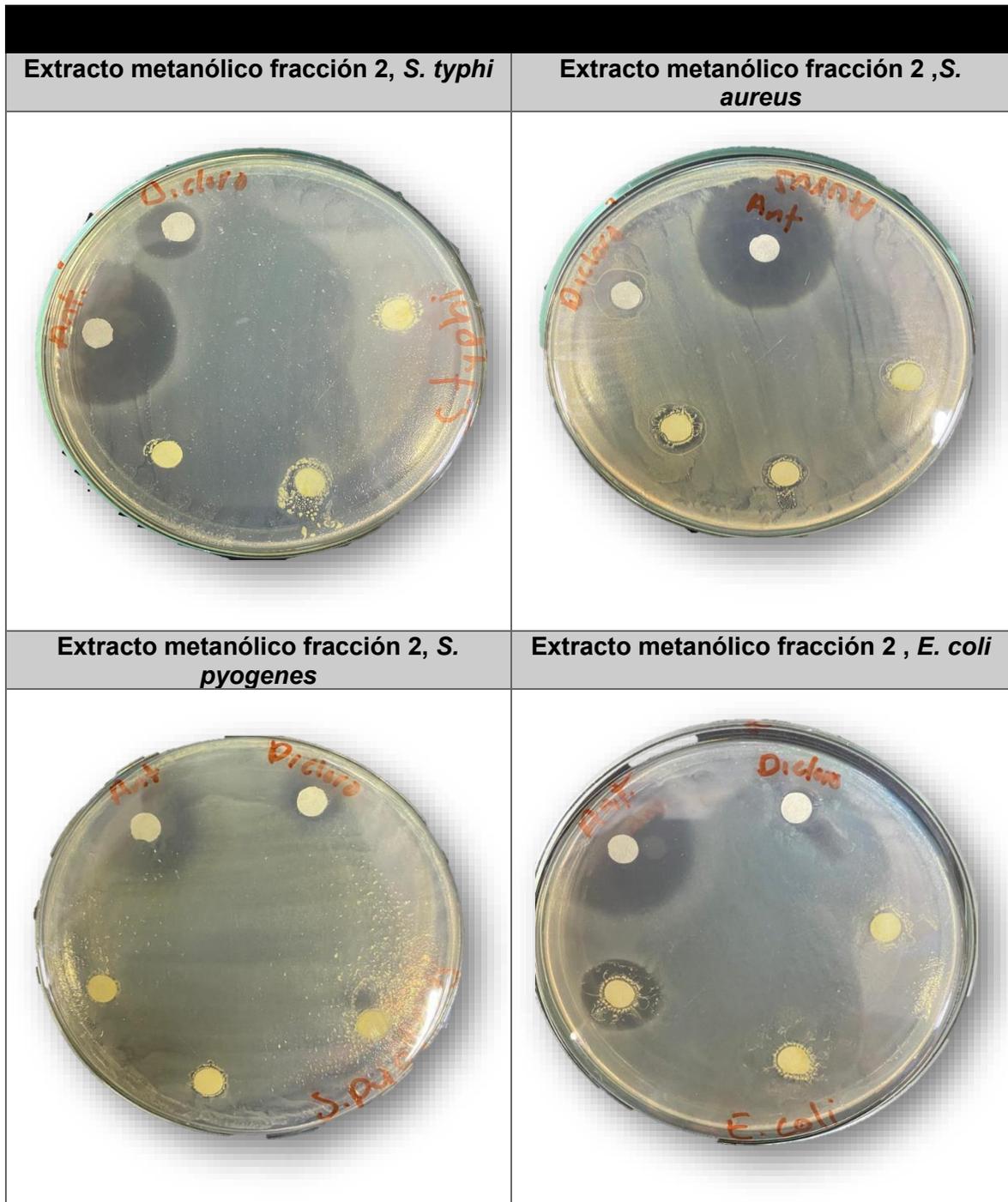


Figura 52 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total recolectadas en la fracción de 2

*En la figura 52 podemos observar que solo la cepa de *E. coli* tiene resistencia a la segunda fracción y las demás fueron susceptibles.

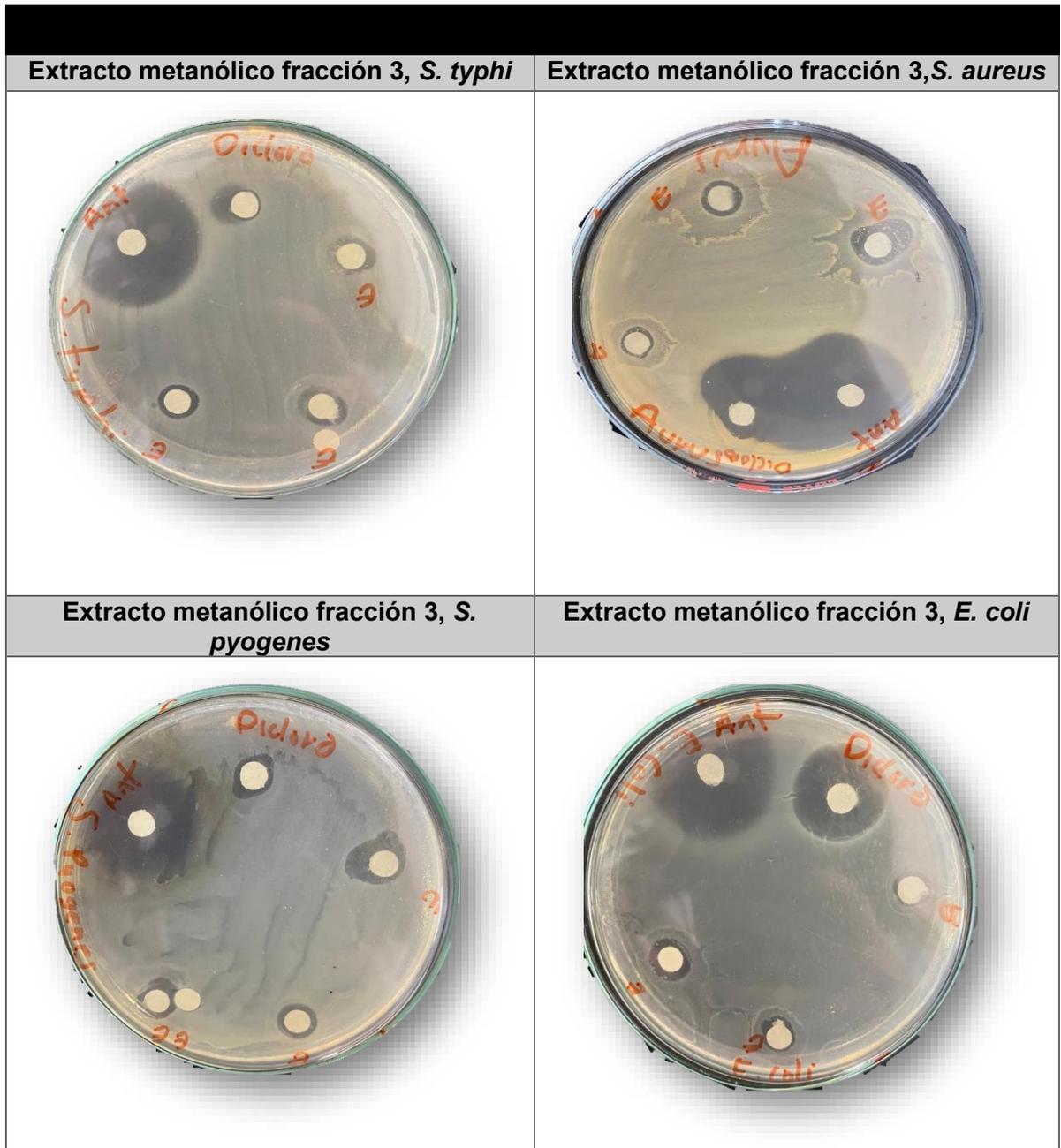


Figura 53 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total recolectadas en la fracción de 3

*En la figura 53 podemos observar que todas las cepas fueron susceptibles a la tercera fracción del extracto.

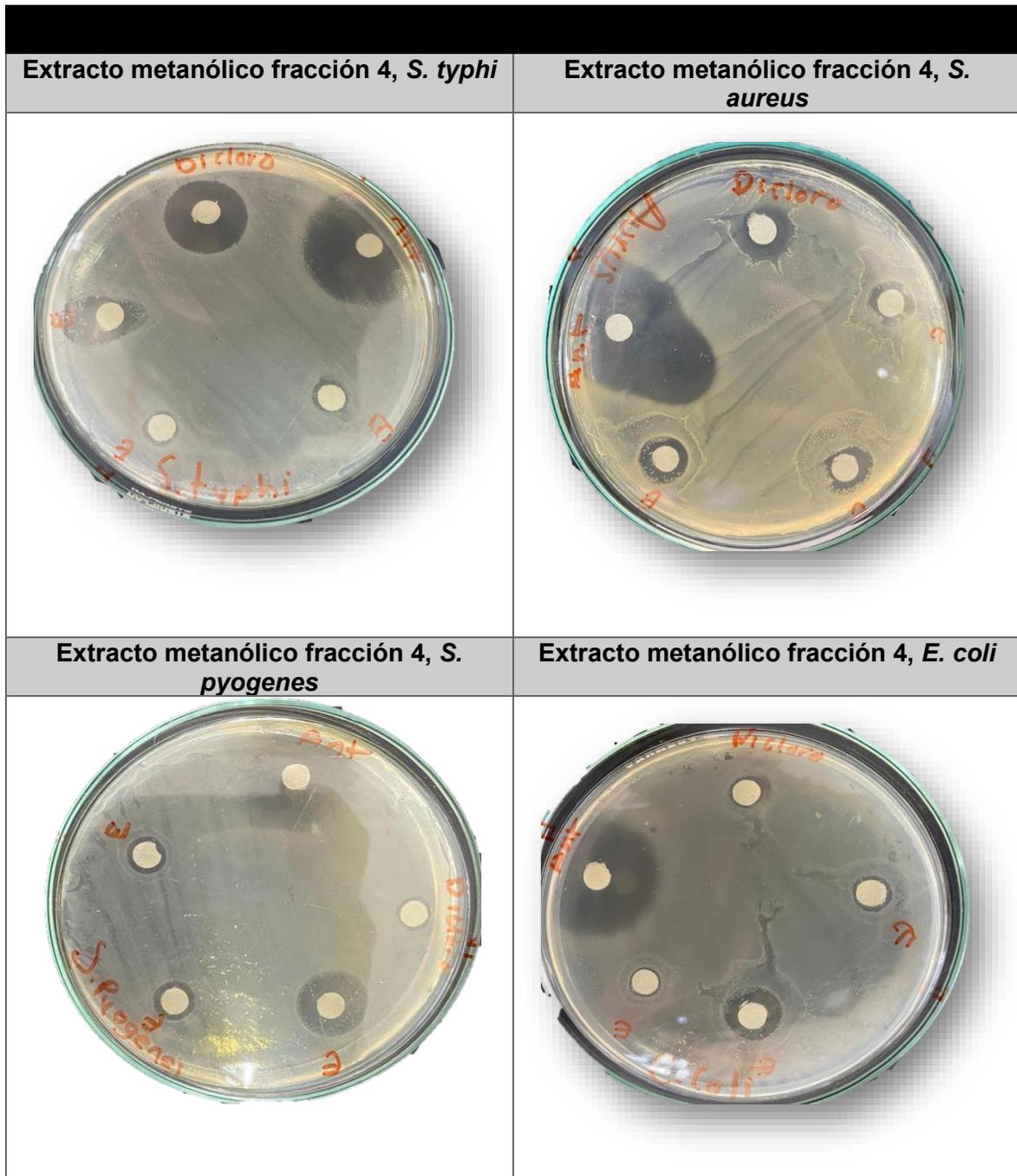


Figura 54 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total recolectadas en la fracción de 4

*En la figura 54 podemos observar que las cepas de *S. pyogenes*, *E. coli* y *S. aureus* son resistentes a la cuarta fracción de extracto.

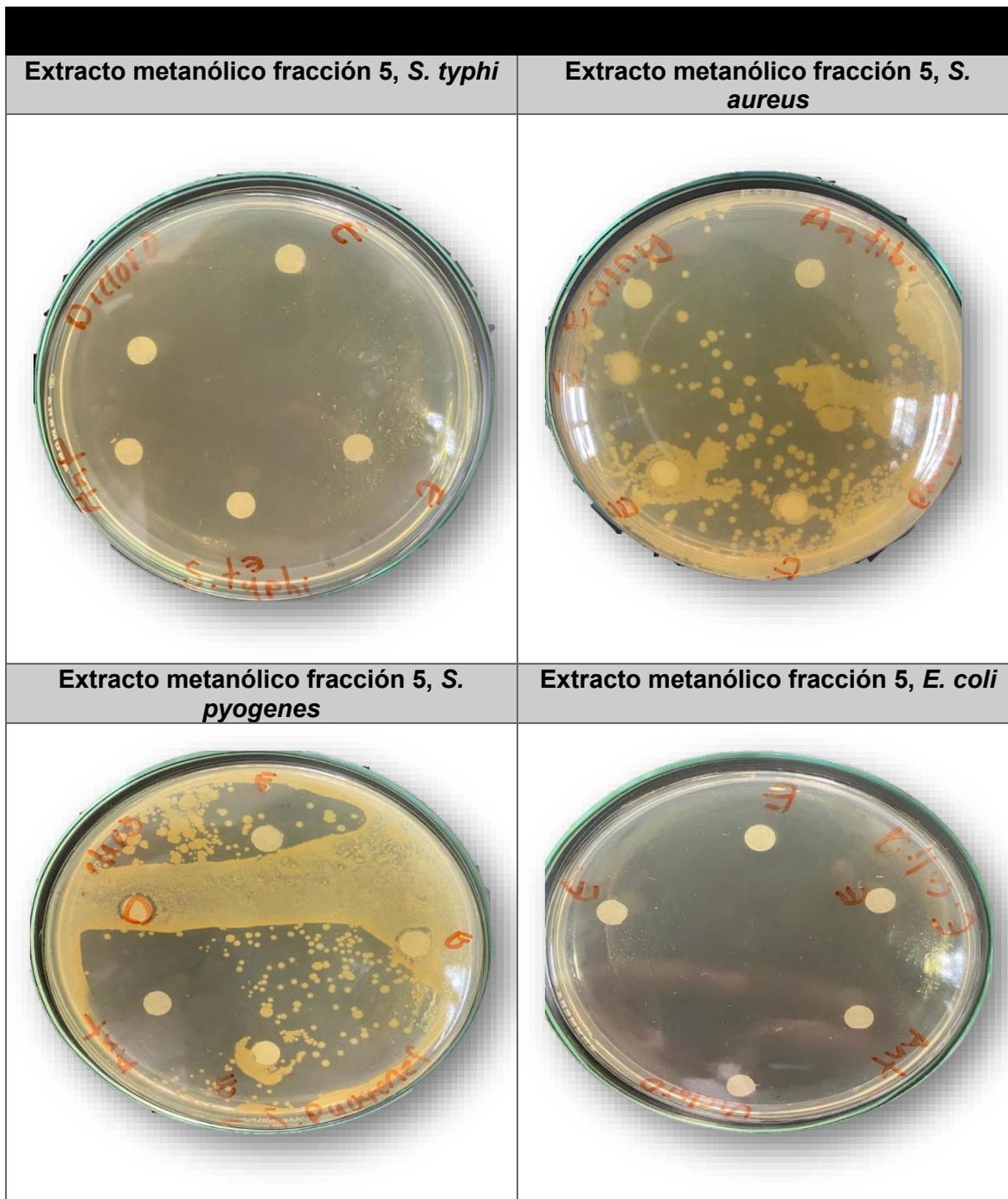


Figura 55 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total recolectadas en la fracción de 5

En la figura 55 podemos observar que todas la cepas fueron totalmente susceptibles a la quinta fracción de extracto.

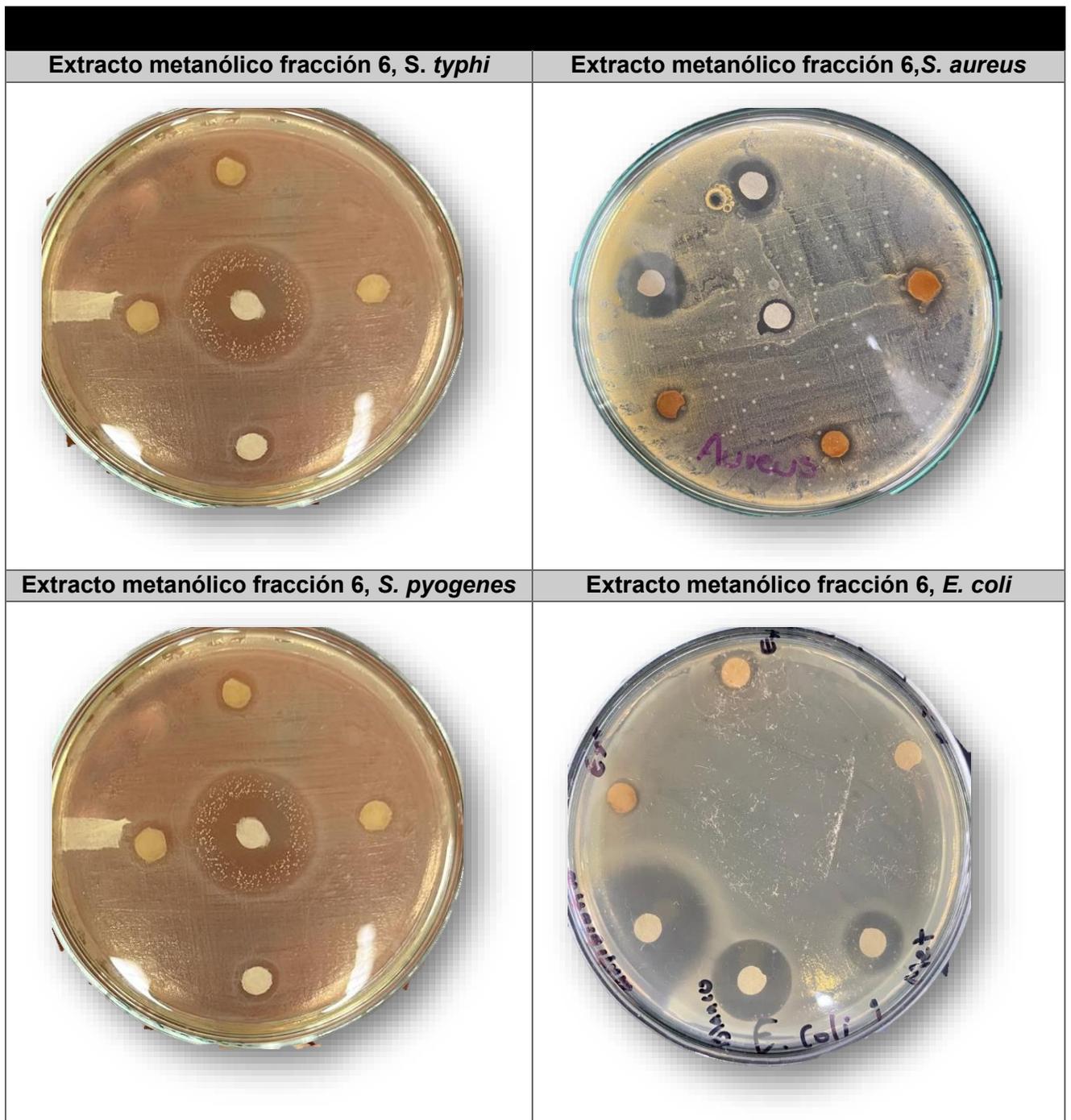


Figura 56 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanolico total recolectadas en la fracción de 6

*En la figura 56 podemos observar que todas la cepas fueron susceptibles a la sexta fracción de extracto.

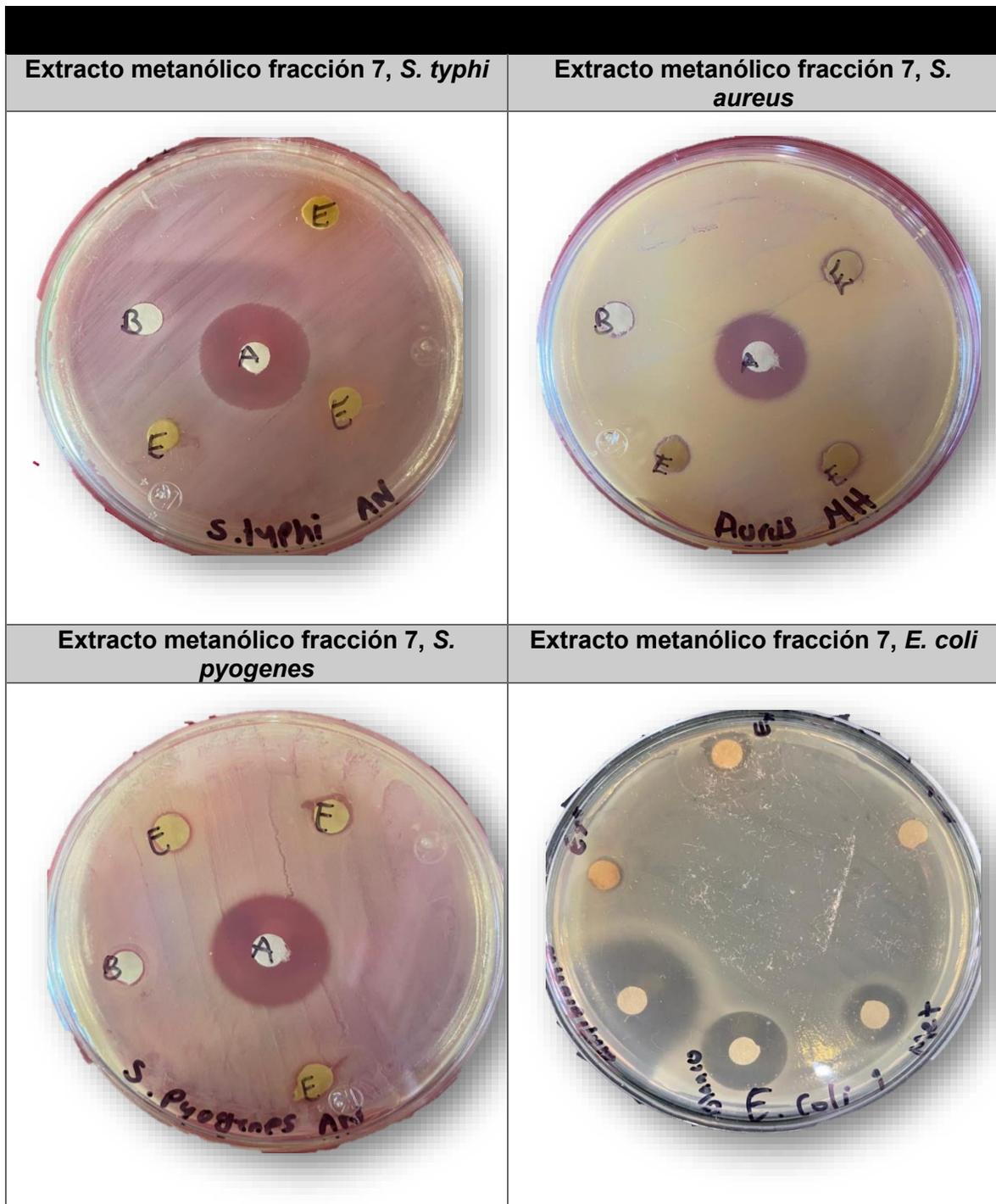


Figura 57 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total recolectadas en la fracción de 7

En la figura 57 podemos observar que todas la cepas fueron susceptibles a la septima fracción de extracto.

Extracto metanólico fracción 8, <i>S. typhi</i>	Extracto metanólico fracción 8, <i>S. aureus</i>
	
Extracto metanólico fracción 8, <i>S. pyogenes</i>	Extracto metanólico fracción 8, <i>E. coli</i>
	

Figura 58 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total recolectadas en la fracción de 8

En la figura 58 podemos observar que la cepa de *S. aureus* es sensible a la octava fracción mientras que las demás cepas fueron al extracto.

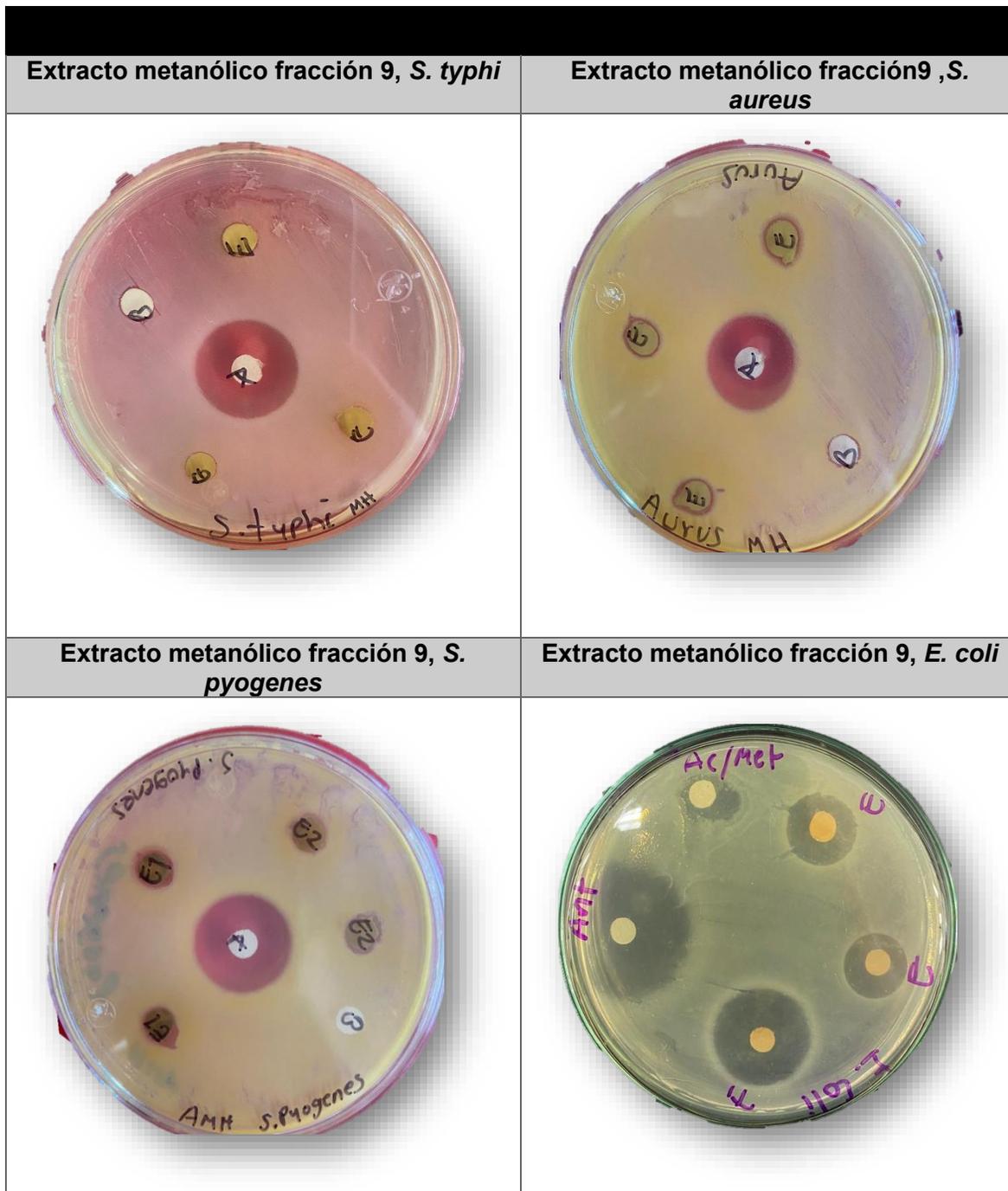


Figura 59 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total recolectadas en la fracción de 9

*En la figura 59 podemos observar que la cepa *E. coli* es altamente sensible a la novena fracción del extracto por lo que las demás cepas fueron susceptibles a esta misma.

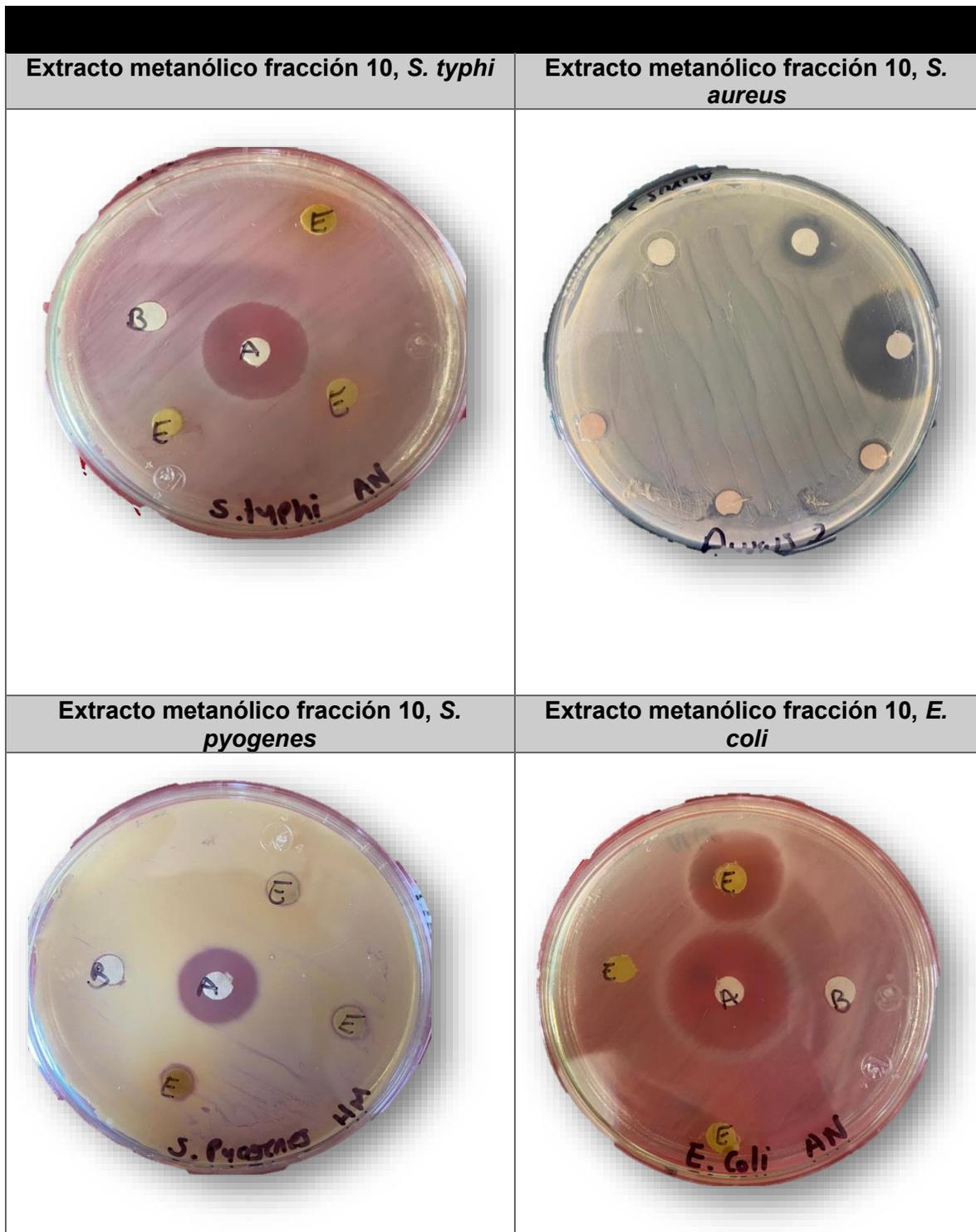


Figura 60 Imágenes representativas del ensayo de difusión en placa del extracto metanólico total recolectadas en la fracción de 10

*En la figura 60 podemos observar que la cepa E. coli es sensible a la décima fracción del extracto por lo que las demás cepas fueron susceptibles.

Se tomaron las fracciones con mayor efecto inhibitorio de cada fracción.

Tabla 23 Medición del halo de inhibición de *S. typhi* (fracción 1)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (Dicloro)	3 cm
Extracto 1	1.2 cm
Extracto 2	1.3 cm
Extracto 3	1.7 cm

Se puede observar que la cepa *S. typhi* nos dice que el halo de inhibición es resistente a la 1ra fracción.

Tabla 24 Medición del halo de inhibición de *E. coli* (fracción 1)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (Dicloro)	0.9 cm
Extracto 1	0 cm nota: no es susceptible
Extracto 2	0 cm nota: no es susceptible
Extracto 3	0.9 cm nota: no es susceptible

Se puede observar que la cepa *E. coli* nos dice que el halo de inhibición que es susceptible a la 1ra fracción.

Tabla 25 Medición del halo de inhibición de *S. pyogenes* (fracción 1)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (Dicloro)	1.5 cm
Extracto 1	0.7 cm nota: no es susceptible
Extracto 2	0.7cm nota: no es susceptible
Extracto 3	0.7 cm nota: no es susceptible

Se puede observar que la cepa *S. pyogenes* nos dice que el halo de inhibición que es susceptible a la 1ra fracción.

Tabla 26 Medición del halo de inhibición de *S. aureus* (fracción 1)

Blanco (antibiótico)	2.8 cm
Blanco (Dicloro)	1 cm
Extracto 1	1 cm
Extracto 2	2 cm
Extracto 3	1.2 cm

Se puede observar que la cepa *S. aureus* nos dice que el halo de inhibición es susceptible a la 1ra fracción.

Tabla 27 Medición del halo de inhibición de *S. typhi* (fracción 2)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (Dicloro)	1.3 cm
Extracto 1	0 nota: no susceptible
Extracto 2	0 no susceptible
Extracto 3	0 no susceptible

Se puede observar que la cepa *S. typhi* nos dice que el halo de inhibición es susceptible a la 2da fracción.

Tabla 28 Medición del halo de inhibición de *E. coli* (fracción 2)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (Dicloro)	0.8 no susceptible
Extracto 1	1.7 cm
Extracto 2	0 nota: no susceptible
Extracto 3	0 nota: no susceptible

Se puede observar que la cepa *E. coli* nos dice el halo de inhibición que es resistente a la 2da fracción.

Tabla 29 Medición del halo de inhibición de *S. pyogenes* (fracción 2)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (Dicloro)	1.4 cm
Extracto 1	0 nota: no susceptible
Extracto 2	0 nota: no susceptible
Extracto 3	0 nota: no susceptible

Se puede observar que la cepa *S. pyogenes* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 2da fracción.

Tabla 30 Medición del halo de inhibición de *S. aureus* (fracción 2)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (Dicloro)	1.2 cm
Extracto 1	0.6 cm
Extracto 2	0.6 cm
Extracto 3	0.6 cm

Se puede observar que la cepa *S. aureus* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 2da fracción.

Tabla 31 Medición del halo de inhibición de *S. typhi* (fracción 3)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (Dicloro)	1 cm
Extracto 1	0.5 cm
Extracto 2	0.5 cm
Extracto 3	0.4 cm

Se puede observar que la cepa *S. typhi* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 3ra fracción.

Tabla 32 Medición del halo de inhibición de *E. coli* (fracción 3)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (Dicloro)	2.1 cm
Extracto 1	0.5 cm
Extracto 2	0.4 cm
Extracto 3	0.5 cm

Se puede observar que la cepa *E. coli* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 3ra fracción.

Tabla 33 Medición del halo de inhibición de *S. pyogenes* (fracción 3)

Blanco (antibiótico)	3.5 cm
Blanco (Dicloro)	0.5 cm
Extracto 1	0.5 cm
Extracto 2	0.5 cm
Extracto 3	0.5 cm

Se puede observar que la cepa *S. pyogenes* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 2da fracción.

Tabla 34 Medición del halo de inhibición de *S. aureus* (fracción 3)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (Dicloro)	1 cm
Extracto 1	0.7 cm
Extracto 2	0.6 cm
Extracto 3	0.8 cm

Se puede observar que la cepa *S. aureus* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 3ra fracción.

Tabla 35 Medición del halo de inhibición de *S. typhi* (fracción 4)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (dicloro)	1.9 cm
Extracto 1	0.9 cm
Extracto 2	0.8 cm nota: no susceptible
Extracto 3	0.8 cm nota: no susceptible

Se puede observar que la cepa *S. typhi* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 4ta fracción.

Tabla 36 Medición del halo de inhibición de *E. coli* (fracción 4)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (dicloro)	1.6 cm
Extracto 1	1.2 cm
Extracto 2	1.2 cm
Extracto 3	1.2 cm

Se puede observar que la cepa *E. coli* nos dice el halo de inhibición que es resistente a la 4ta fracción.

Tabla 37 Medición del halo de inhibición de *S.pyogenes* (fracción 4)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (dicloro)	1.2 cm
Extracto 1	1.2 cm
Extracto 2	1.4 cm
Extracto 3	1.1 cm

Se puede observar que la cepa *S. pyogenes* nos dice el halo de inhibición que es resistente a la 4ta fracción.

Tabla 38 Medición del halo de inhibición de *S. aureus* (fracción 4)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (dicloro)	1.5 cm
Extracto 1	1 cm
Extracto 2	1 cm
Extracto 3	1 cm

Se puede observar que la cepa *S. aureus* nos dice el halo de inhibición que es resistente a la 4ta fracción.

Tabla 39 Medición del halo de inhibición de *S. typhi* (fracción 5)

Blanco (antibiótico)	0 cm nota: no es susceptible
Blanco (dicloro)	0 cm nota: no es susceptible
Extracto 1	0 cm nota: no es susceptible
Extracto 2	0 cm nota: no es susceptible
Extracto 3	0 cm nota: no es susceptible

Se puede observar que la cepa *S. typhi* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 5ta fracción.

Tabla 40 Medición del halo de inhibición de *E. coli* (fracción 5)

Blanco (antibiótico)	0 cm nota: no es susceptible
Blanco (dicloro)	0 cm nota: no es susceptible
Extracto 1	0 cm nota: no es susceptible
Extracto 2	0 cm nota: no es susceptible
Extracto 3	0 cm nota: no es susceptible

Se puede observar que la cepa *E. coli* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 5ta fracción.

Tabla 41 Medición del halo de inhibición de *S. pyogenes* (fracción 5)

Blanco (antibiótico)	0 cm no es susceptible
Blanco (dicloro)	0 cm no es susceptible
Extracto 1	0 cm no es susceptible
Extracto 2	0 cm no es susceptible
Extracto 3	0 cm no es susceptible

Se puede observar que la cepa *S. pyogenes* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 5ta fracción.

Tabla 42 Medición del halo de inhibición de *S. aureus* (fracción 5)

Blanco (antibiótico)	0 cm no es susceptible
Blanco (dicloro)	0 cm no es susceptible
Extracto 1	0 cm no es susceptible
Extracto 2	0 cm no es susceptible
Extracto 3	0 cm no es susceptible

Se puede observar que la cepa *S. aureus* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 5ta fracción.

Tabla 43 Medición del halo de inhibición de *S. typhi* (fracción 6)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (dicloro)	1 cm
Extracto 1	1 cm
Extracto 2	1 cm
Extracto 3	1 cm

Se puede observar que la cepa *S. typhi* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 6ta fracción.

Tabla 44 Medición del halo de inhibición de *E. coli* (fracción 6)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (dicloro)	2.5 cm
Extracto 1	1 cm
Extracto 2	1 cm
Extracto 3	1 cm

Se puede observar que la cepa *E. coli* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 6ta fracción.

Tabla 45 Medición del halo de inhibición de *S. pyogenes* (fracción 6)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (dicloro)	0.5 cm
Extracto 1	1 cm
Extracto 2	1 cm
Extracto 3	1 cm

Se puede observar que la cepa *S. pyogenes* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 6ta fracción.

Tabla 46 Medición del halo de inhibición de *S. aureus* (fracción 6)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (dicloro)	2 cm
Extracto 1	1 cm
Extracto 2	1 cm
Extracto 3	1 cm

Se puede observar que la cepa *S. aureus* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 6ta fracción.

Tabla 47 Medición del halo de inhibición de *S. typhi* (fracción 7)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (acetato: metanol)	0 cm nota: no es susceptible
Extracto 1	0 cm nota: no es susceptible
Extracto 2	0 cm nota: no es susceptible
Extracto 3	0 cm nota: no es susceptible

Se puede observar que la cepa *S. typhi* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 7ma fracción.

Tabla 48 Medición del halo de inhibición de *E. coli* (fracción 7)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (acetato: metanol)	2.5 cm
Extracto 1	0.5 cm
Extracto 2	0.5 cm
Extracto 3	0.5 cm

Se puede observar que la cepa *E. coli* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 7ma fracción.

Tabla 49 Medición del halo de inhibición de *S. pyogenes* (fracción 7)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (acetato: metanol)	0.9
Extracto 1	0.9
Extracto 2	1
Extracto 3	0.9

Se puede observar que la cepa *S. pyogenes* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 7ma fracción.

Tabla 50 Medición del halo de inhibición de *S. aureus* (fracción 7)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (acetato: metanol)	0.9
Extracto 1	0.9
Extracto 2	1
Extracto 3	1

Se puede observar que la cepa *S. aureus* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 7ma fracción.

Tabla 51 Medición del halo de inhibición de *S. typhi* (fracción 8)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (Dicloro)	0 cm
Extracto 1	0.5 cm
Extracto 2	0.5 cm
Extracto 3	0.5 cm

Se puede observar que la cepa *S. typhi* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 8va fracción.

Tabla 52 Medición del halo de inhibición de *E. coli* (fracción 8)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (acetato: metanol)	1 cm
Extracto 1	1 cm
Extracto 2	1 cm
Extracto 3	1 cm

Se puede observar que la cepa *E. coli* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 8va fracción.

Tabla 53 Medición del halo de inhibición de *S.pyogenes* (fracción 8)

Blanco (antibiótico)	2 cm
Blanco (acetato: metanol)	1 cm
Extracto 1	1 cm
Extracto 2	1 cm
Extracto 3	1 cm

Se puede observar que la cepa *S. pyogenes* es una bacteria gram positiva por lo que nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 8va fracción.

Tabla 54 Medición del halo de inhibición de *S. aureus* (fracción 8)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (acetato: metanol)	1 cm
Extracto 1	2.5 cm
Extracto 2	1.5 cm
Extracto 3	1.5 cm

Se puede observar que la cepa *S. aureus* nos dice el halo de inhibición que es sensible a la 8va fracción.

Tabla 55 Medición del halo de inhibición de *S. typhi* (fracción 9)

Blanco (antibiótico)	2.8
Blanco (acetato: metanol)	0.9
Extracto 1	0 nota: no susceptible
Extracto 2	0 nota: no susceptible
Extracto 3	0 nota: no susceptible

Se puede observar que la cepa *S. typhi* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 9na fracción.

Tabla 56 Medición del halo de inhibición de *E.coli* (fracción 9)

Blanco (antibiótico)	3 cm
Blanco (acetato: metanol)	1.5 cm
Extracto 1	2 cm
Extracto 2	2 cm
Extracto 3	3 cm

Se puede observar que la cepa *E. coli* nos dice el halo de inhibición que es sensible a la 9na fracción.

Tabla 57 Medición del halo de inhibición de *S.pyogenes* (fracción 9)

Blanco (antibiótico)	2.8 cm
Blanco (metanol)	0 nota: no susceptible
Extracto 1	0 nota: no susceptible
Extracto 2	0 nota: no susceptible
Extracto 3	0 nota: no susceptible

Se puede observar que la cepa *S. pyogenes* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 9na fracción.

Tabla 58 Medición del halo de inhibición de *S. aureus* (fracción 9)

Blanco (antibiótico)	2.8 cm
Blanco (metanol)	1 cm
Extracto 1	0.9 cm
Extracto 2	0.9 cm
Extracto 3	0.9 cm

Se puede observar que la cepa *S. aureus* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 9na fracción.

Tabla 59 Medición del halo de inhibición de *S. typhi* (fracción 10)

Blanco (antibiótico)	2.8 cm
Blanco (metanol)	0 nota: no susceptible
Extracto 1	0 nota: no susceptible
Extracto 2	0 nota: no susceptible
Extracto 3	0 nota: no susceptible

Se puede observar que la cepa *S. typhi* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 10ma fracción.

Tabla 60 Medición del halo de inhibición de *E.coli* (fracción 10)

Blanco (antibiótico)	2.8 cm
Blanco (metanol)	0 nota: no susceptible
Extracto 1	2.6 cm
Extracto 2	0 nota: no susceptible
Extracto 3	0 nota: no susceptible

Se puede observar que la cepa *E. coli* nos dice el halo de inhibición que es sensible a la 10ma fracción.

Tabla 61 Medición del halo de inhibición de *S. pyogenes* (fracción 10)

Blanco (antibiótico)	2.7 cm
Blanco (metanol)	0.9 cm
Extracto 1	0.5 cm
Extracto 2	0.5 cm
Extracto 3	0.5 cm

Se puede observar que la cepa *S. pyogenes* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 10ma fracción.

Tabla 62 Medición del halo de inhibición de *S. aureus* (fracción 10)

Blanco (antibiótico)	2.7 cm
Blanco (metanol)	1 cm
Extracto 1	0.9 cm
Extracto 2	0.9 cm
Extracto 3	0.9 cm

Se puede observar que la cepa *S. aureus* nos dice el halo de inhibición que es susceptible a la 10ma fracción.

Resultados de las curvas de crecimiento de cada cepa con extracto metanólico total filtrado de 10,000 ppm - 0.001 ppm.

Cabe mencionar que estas graficas nos ayudan a rectificar lo ya se había mencionado anteriormente, pero por otro método de aplicación más específico en donde se observa que en efecto el extracto metanólico tiene buenas referencias de que es un antimicrobiano ya que son los experimentos en donde el extracto funcionó como se requería y el propósito de estas graficas es ver que si hay respuesta bactericida.

Por otra parte, es importante mencionar que los ejes de la [Y] van a referente a la concentración del extracto metanólico de *Pinus moctezumae* y los ejes de la [X] van referentes a las horas en que se realizó (cada prueba fue a 30 min por lo que se dio un total a 48 hrs).

Cepa *E. coli* + Extracto metanólico 10,000 ppm – 0.001 ppm

La siguiente imagen presenta una comparación del crecimiento de *E. coli* con el extracto de 10,000 ppm a 0.001ppm.

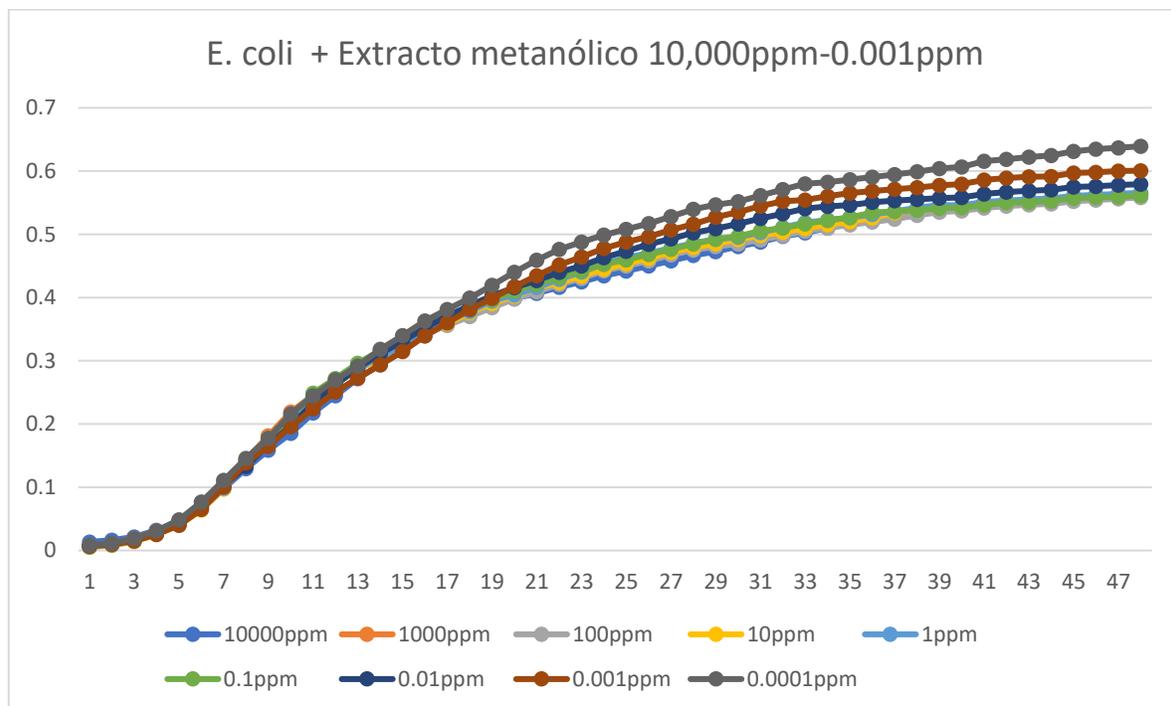


Figura 61. Curva de crecimiento de la cepa *E. coli* con extracto metanólico total de 10,000 ppm - 0.001 ppm

En la gráfica (figura 61) podemos observar una respuesta más clara y lógica según las concentraciones de el extracto que fueron probadas.

Se repitió el experimento con *E. coli* después de hacer pruebas de antibiograma con todas las cepas, en donde se pudiera confirmar el efecto bactericida del nuevo extracto que se realizó ya que el extracto metanólico tiene un tiempo de vida de aproximadamente 5 días, una vez que las pruebas confirmaron que el extracto funcionaba comenzamos las pruebas con *E. coli* y las cepas restantes.

Cepa *S. aureus* + Extracto metanólico 10,000 ppm – 0.001 ppm

La siguiente imagen presenta una comparación del crecimiento de *S. aureus* con el extracto total filtrado de 10,000 ppm a 0.001 ppm.

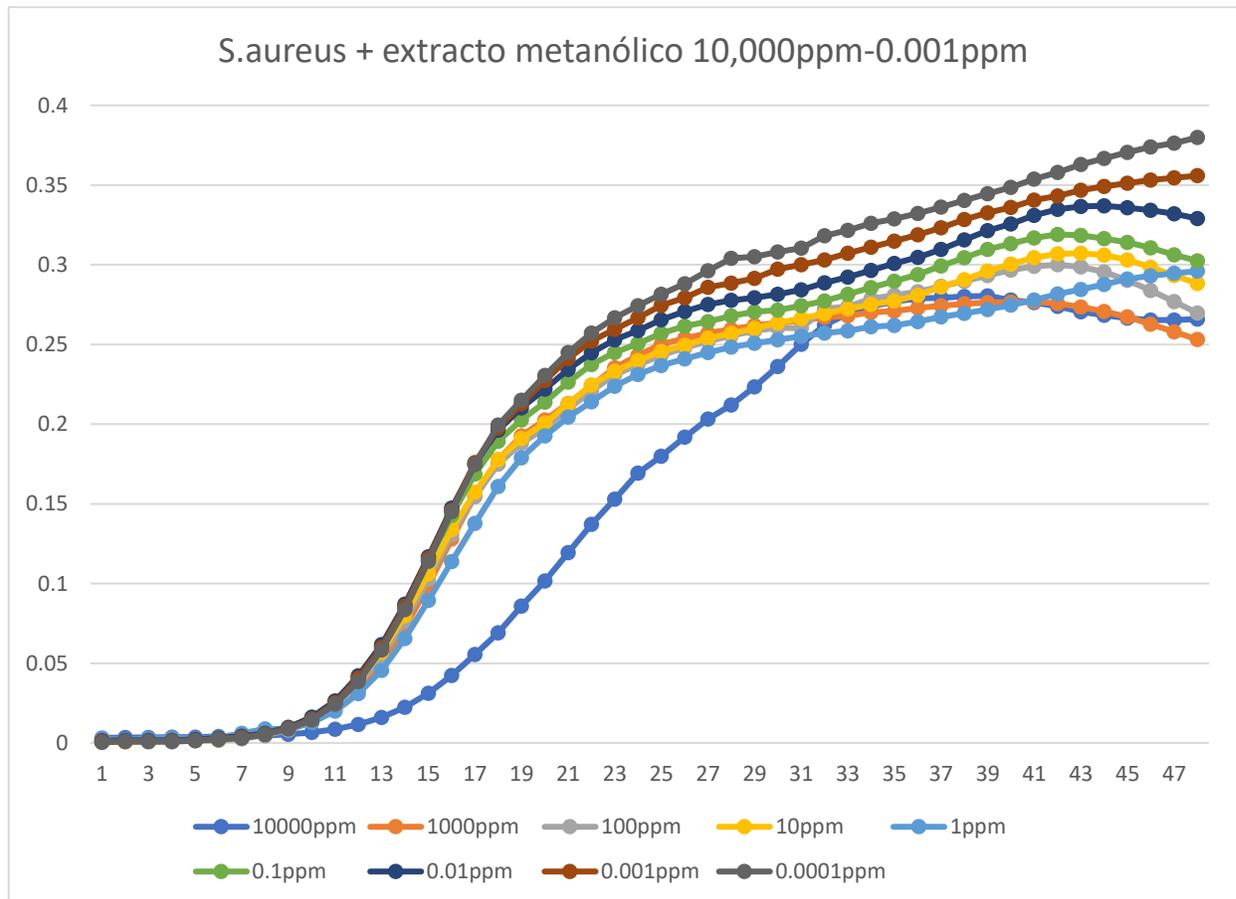


Figura 62. Curva de crecimiento de la cepa *S. aureus* con extracto metanólico total de 10,000 ppm -0.001 ppm

En la gráfica (figura 62) podemos observar que la concentración fue la correcta y que el extracto realizo su función bactericida ya que fue inhibiendo el crecimiento de esta cepa.

Cepa *S. pyogenes* + Extracto metanólico 10,000 ppm – 0.001 ppm

La siguiente imagen presenta una comparación del crecimiento de *S. pyogenes* con el extracto total filtrado de 10,000 ppm a 0.001ppm.

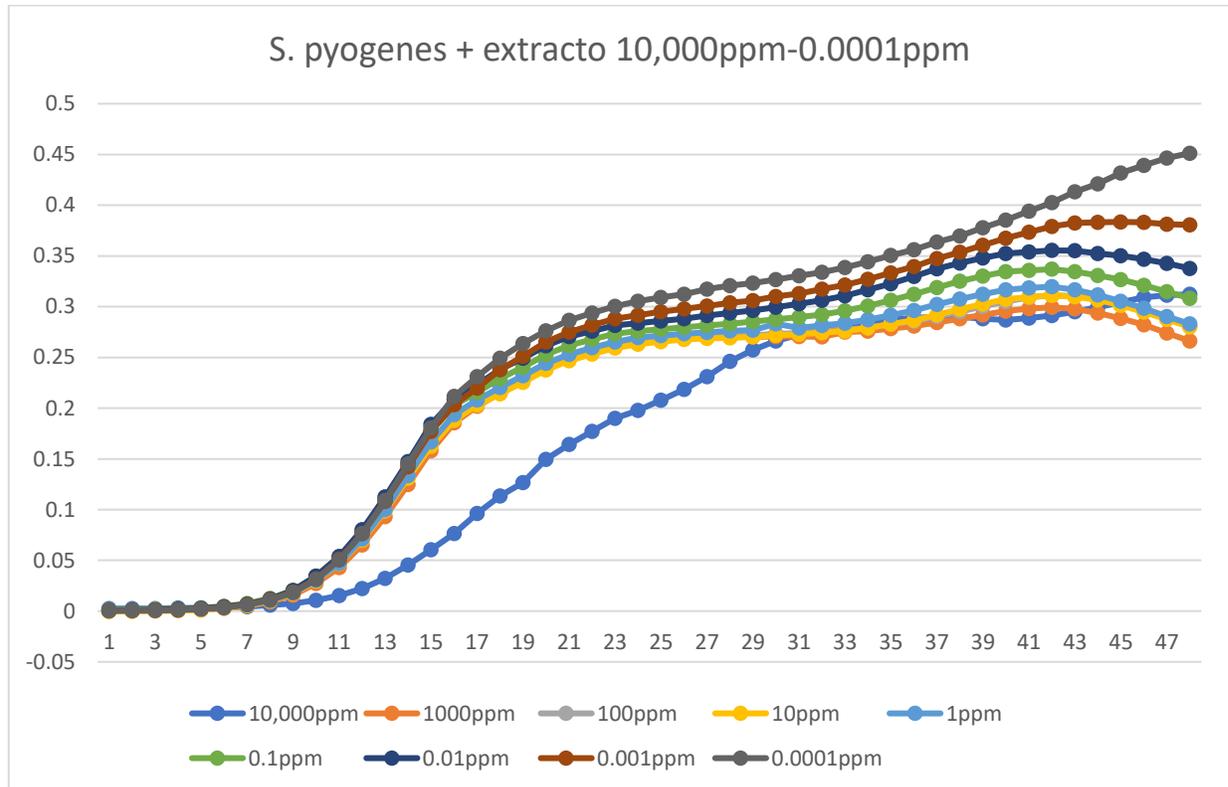


Figura 63. Curva de crecimiento de la cepa *S. pyogenes* con extracto metanólico total de 10,000 ppm -0.001 ppm

En la gráfica (figura 63) podemos observar que la concentración fue la correcta y que el extracto realizo su función bactericida ya que fue inhibiendo el crecimiento de esta cepa.

Se observa que la concentración más alta es la que está inhibiendo más a la bacteria.

Cepa *S. Typhi* + Extracto metanólico 10,000 ppm – 0.001 ppm

La siguiente imagen presenta una comparación del crecimiento de *S. typhi* con el extracto total filtrado de 10,000 ppm a 0.001 ppm.

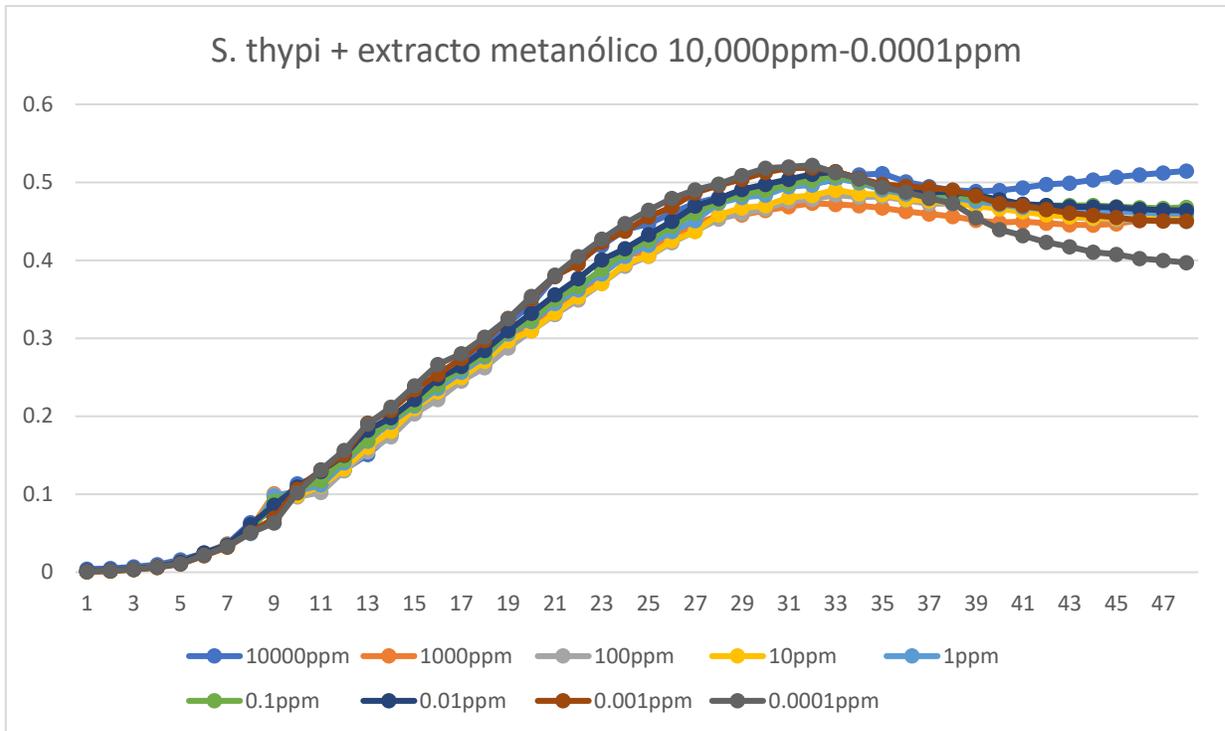


Figura 64. Curva de crecimiento de la cepa *S. typhi* con extracto metanólico total de 10,000 ppm -0.001 ppm

En la gráfica (figura 64) podemos observar que la concentración fue la correcta y que el extracto realizó su función bactericida ya que fue inhibiendo el crecimiento de esta cepa.

Hasta ahora no se encuentra alguna observación diferente a lo que se esperaba del resultado.

CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico del extracto metanólico de los estróbilos femeninos de *Pinus moctezumae* dio muy buenos resultados como agente antimicrobiano por lo que permitió seguir probando con diferentes tipos de disolventes para realizar más investigaciones relacionado con el tema, cabe mencionar que estos no son tóxicos a niveles terapéuticos, y los compuestos polifenólicos tienen importantes actividades biológicas. Los estilbenos, terpenos, alcaloides, ligninas y flavonoides, como la quercetina, la rutina, el resveratrol y los compuestos PYC y enzogenol, son los componentes fitoquímicos de los extractos de coníferas.

Se demostró que mediante los ensayos por difusión de acuerdo con su polaridad en este caso el metanol (muy polar) pudo inhibir, tener sensibilidad y resistencia de manera abundante en estas bacterias que hoy en día cada vez se hacen más resistentes a los antibióticos ya existentes.

Se ha discutido los usos tradicionales y farmacológicos de las coníferas especialmente en el género *pinus* de lo cual aparte de ser muy buen anti bactericida , también es muy buen antioxidante y antiinflamatorio, aparte de que otros géneros de las coníferas tienen otras utilidades importantes en la medicina tradicional de productos naturales.

Sin duda, los fitoquímicos de las coníferas son la fuente natural de futuros fármacos; En el campo del descubrimiento de fármacos, todavía se necesitan muchos estudios sobre fitoquímicos. Se necesitan más esfuerzos para investigar y evaluar el potencial clínico y la caracterización molecular de compuestos medicinales con la ayuda de bases de datos y esfuerzos de grupos interdisciplinarios.

ANEXOS

ANEXO 1

Procedimiento Soxhlet

Colocamos 200 ml de disolvente metanol en un matraz bola de fondo plano de 250ml con tres perlas de ebullición previamente llevado a peso constante, posteriormente fabricar el cartucho con papel filtro para el Soxhlet y agregarle 10g de polvo de estróbilo previamente triturado, montar equipo para Soxhlet, después Iniciamos el calentamiento en la parrilla eléctrica cabe mencionar que para evitar una proyección es necesario comenzar de una temperatura baja a una más alta , en seguida se toma la hora de inicio, registrar el tiempo y la temperatura en que comienza a ebullición o en el que cae la primera gota de reflujo, el reflujo debe tener un volumen constante y con registrar el tiempo y la temperatura del primer ciclo del Soxhlet obtenido, repetir los pasos anteriores hasta obtener 7 ciclos de Soxhlet, quitar calentamiento y dejar enfriar a temperatura ambiente, desmontar el equipo Soxhlet.

Procedimiento de concentrado

Posteriormente llevamos el producto de extracción Soxhlet en el matraz bola de 250ml a concentrar a sequedad en un rotavapor a 64°C, colocar el matraz 24hrs en un desecador, después pesamos el matraz bola en una balanza analítica, regresar el matraz al desecador durante una hora, pesar en la balanza analítica el matraz bola, repetir los pasos anteriores hasta obtener el peso constante del matraz con el producto de estróbilo de extracción por metodología Soxhlet.

ANEXO 2

Agua Tridestilada estéril

Se utiliza dos matraces Erlenmeyer, colocando en cada uno 100 ml de agua tridestilada, en seguida se tiene que tapar considerando el efecto de la presión en la autoclave y etiquetarlos con cinta testigo, después se lleva a esterilizar a 120 °C y 2 atm (de presión en una autoclave) cabe mencionar que estos datos ya están establecidos de acuerdo a la ficha técnica de equipo, una vez concluido el proceso de esterilización (lleva un tiempo de duración de aproximadamente 20 a 30 minutos) , cerrar correctamente y almacenar hasta que el agua alcance la temperatura ambiente, durante su utilización solo abrir dentro de la campana de flujo laminar estéril, utilizando un mechero y solo puntas estériles para

Esterilización de celdas para espectrofotómetro

Se eligen las celdas en mejor estado sin rayaduras ni que se observen opacas, se procede a limpiarlas con una solución desinfectante de alcohol al 70% o en su defecto, una solución con hipoclorito de sodio. Una vez puesto nuestra solución se tiende a secar las celdas con cuidado y esterilizar con UV por 30 minutos. Si las celdas tienen residuos líquidos, llevarlas dentro de su caja estéril a una estufa para evaporar el resto del solvente. Para el traslado, mantener la caja cerrada en todo momento.

Estandarización de la concentración bacteriana

En un tubo eppendorf de 1.5 ml, colocar 1 ml de agua tridestilada estéril, posteriormente tapar y posicionar en la base para tubos eppendorf. Después con ayuda de un asa de cultivo metálica previamente esterilizada con un mechero, se toma de un cultivo en caja Petri, una colonia independiente de *E. coli* o de la cepa que se desee trabajar crecida en agar nutritivo. Utilizando el asa, sumergimos la colonia en el tubo eppendorf con agua tridestilada estéril y agitamos hasta que la colonia se disperse dentro del tubo. Se procede a tapar el tubo eppendorf y llevar a vortex durante 30 segundos. Después se centrifuga el tubo eppendorf con el inóculo por 5 min a 1200 rpm para formar un pellet. Más tarde se decanta el agua restante dentro del tubo, de modo que solo quede el pellet con la concentración de células en el fondo. Más adelante añadimos el volumen necesario de agua tridestilada estéril y se lleva a vortex para dispersar las células nuevamente, hasta alcanzar la absorbancia del estándar de McFarland 0.5 (0.08 – 0.1) a 600 nm. Si la absorbancia supera el rango descrito por McFarland, diluir con agua tridestilada estéril, si la absorbancia no alcanza los valores del rango, añadir una mayor cantidad de células del mismo cultivo. Una vez obtenida la absorbancia deseada, centrifugar de nuevo a 1200 rpm por 5 min hasta formar de nuevo el pellet. Seguidamente se decanta el agua destilada. Luego una vez obtenido y aislado el pellet, añadir la cantidad de caldo nutritivo necesaria para el llenado de la placa multipozos.

Placa multipozos

Una vez obtenido el pellet que corresponda a 1.5×10^8 células, añadimos la cantidad adecuada de caldo nutritivo estéril considerando las alícuotas que se tomarán a partir de este inóculo. Posteriormente, considerando la cantidad de caldo nutritivo añadida hay que hacer una regla de tres para saber el volumen que hay que tomar para tener 10×10^6 células, que posteriormente se utilizarán para el llenado de la placa multipozos.

Ejemplo:

$$1.5 \times 10^8 \text{ --- } 1 \text{ mL}$$

$$10 \times 10^6 \text{ --- } X \text{ mL}$$

Después de realizar la relación es importante considerar que el volumen de aforo debe tener en cuenta que al final se adicionarán 10 μL de cada concentración del extracto, por lo que, si el volumen de aforo son 2000 μL , el volumen tendría que ser de 1990 μL .

Finalmente, cada una de las columnas de la placa multipozos tendrá 1.6 ml de caldo nutritivo, por lo que deben de tomarse las alícuotas necesarias considerando que van a llenarse 12 columnas en total.

ANEXO 3

Procedimiento para la preparación de una solución isotónica a base de cloruro de sodio

Se tiene que medir la cantidad de NaCl, se utiliza una balanza analítica para medir la cantidad exacta de cloruro de sodio que necesitas para preparar tu solución isotónica. La concentración típica de una solución isotónica de NaCl es del 0.9% en masa. Esto significa que necesitas 0.9 gramos de NaCl por cada 100 ml de solución. Puedes calcular la cantidad requerida utilizando la siguiente fórmula: Cantidad de NaCl (gramos) = $(0.9/100) \times \text{Volumen de solución deseado (ml)}$ Por ejemplo, si deseas preparar 500 ml de solución isotónica, necesitarás: Cantidad de NaCl = $(0.9/100) \times 500 \text{ ml} = 4.5 \text{ gramos de NaCl}$.

Posteriormente disolver el NaCl en agua destilada agregando la cantidad medida de cloruro de sodio al matraz o recipiente, luego, agregar una pequeña cantidad de agua destilada (aproximadamente la mitad del volumen total de la solución) al matraz, lo agitas suavemente para disolver el NaCl en el agua, si tienes un agitador magnético, puedes usarlo para acelerar la disolución, completar el volumen con agua destilada una vez que el NaCl se haya disuelto por completo, agregar agua destilada adicional para completar el volumen deseado de la solución isotónica, por ejemplo, si estás preparando 500 ml de solución, asegúrate de agregar suficiente agua destilada para alcanzar los 500 ml en total.

Mezclar muy bien y asegúrate de mezclar la solución de manera uniforme para que el NaCl esté distribuido homogéneamente en la solución, puedes hacerlo agitando suavemente con una varilla de vidrio o utilizando un agitador magnético si lo tienes.

Etiquetar el recipiente que contiene la solución isotónica con la concentración, la fecha de preparación y cualquier otra información relevante.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Nisar, B., Sultan, A., & Rubab, S. L. (2018). Comparison of medicinally important natural products versus synthetic drugs-a short commentary. *Nat. Prod. Chem. Res*, 6(2), 308.
- [2] Newman, DJ, Cragg, GM y Snader, KM (2003). Productos naturales como fuentes de nuevos fármacos durante el período 1981-2002. *Journal of natural products* , 66 (7), 1022-1037.
- [3] Galm, U., & Shen, B. (2007). Natural product drug discovery: The times have never been better. *Chemistry & biology*, 14(10), 1098-1104.
- [4] Alós, J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 33(10), 692-699.
- [5] Fernández Riverón, F., López Hernández, J., Ponce Martínez, L. M., & Machado Betarte, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista cubana de medicina militar*, 32(1), 0-0.
- [6] World Health Organization: WHO. (2020). Resistencia a los antibióticos. [www.who.int. https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos](https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos)
- [7] Bandow, J.E., H. Brotz and L.I.O. Leichert. 2003. Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:948- 955.
- [8] Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et technica*, 15(42), 263-268.
- [9] Westh, H., C.S. Zinn and V.T. Rosdah. 2004. An international multicenter study of antimicrobial consumption and resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from 15 hospitals in 14 countries. *Microb. Drug Resist.* 10:169-176
- [10] Bandow, J.E., H. Brotz and L.I.O. Leichert. 2003. Proteomic approach to understanding antibiotic action. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:948- 955.
- [11] Gyles, CL y Fairbrother, JM (2010). *Escherichia coli*. *Patogénesis de infecciones bacterianas en animales* , 4 , 267-308.
- [12] Vázquez-Cabrera, N., Espinosa-Márquez, A., & Cedillo-Ramírez, ML (2023). Evolución histórica de la Organización Mundial de la Salud y la resistencia a los antimicrobianos. *Revista Panamericana de Salud Pública* , 47 , e51.

- [13] Camacho Carranza, R., & Gonsebatt Bonaparte, M. (2024). Contaminación indirecta en resistencia bacteriana a los antibióticos. *GACETA UNAM*, 3.
- [14] Gyles, CL y Fairbrother, JM (2010). *Escherichia coli*. *Patogénesis de infecciones bacterianas en animales*, 4, 267-308.
- [15] Kaper, JB, Nataro, JP y Mobley, HL (2004). *Escherichia coli* patógena. *La naturaleza revisa la microbiología*, 2 (2), 123-140.
- [16] Pham Thanh, D., Karkey, A., Dongol, S., Ho Thi, N., Thompson, CN, Rabaa, MA, ... y Baker, S. (2016). Un nuevo subclade de *Salmonella Typhi* H58 resistente a ciprofloxacina se asocia con el fracaso del tratamiento con fluoroquinolonas. *Elife*, 5, e14003.
- [17] Turgis, M., Han, J., Caillet, S. y Lacroix, M. (2009). Actividad antimicrobiana del aceite esencial de mostaza contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella typhi*. *Control de alimentos*, 20 (12), 1073-1079.
- [18] Langridge, G. C., Phan, M. D., Turner, D. J., Perkins, T. T., Parts, L., Haase, J., ... & Turner, A. K. (2009). Simultaneous assay of every *Salmonella Typhi* gene using one million transposon mutants. *Genome research*, 19(12), 2308-2316.
- [19] Lyon, GJ y Novick, RP (2004). Señalización peptídica en *Staphylococcus aureus* y otras bacterias Gram positivas. *Péptidos*, 25 (9), 1389-1403.
- [20] Seo, KS y Bohach, GA (2012). *Estafilococo aureus*. *Microbiología de los alimentos: Fundamentos y fronteras*, 547-573.
- [21] Fisher, JF y Mobashery, S. (2020). β-lactámicos contra la fortaleza de la bacteria grampositiva *Staphylococcus aureus*. *Revisiónes químicas*, 121 (6), 3412-3463.
- [22] Rodríguez, R. S., Calderón-Jaimes, E., Gómez-Barreto, D., & Espinosa-de los Monteros, L. E. (2000). Características de la resistencia antimicrobiana de una colección clínica de *Streptococcus pyogenes*. *Salud pública de México*, 42(3), 226-229.
- [23] Jimeno-Almazán, A., Viqueira-Gonzalez, M., del Mar Alcalde, M., Alcaraz-Vidal, B., & Vera-Méndez, F. (2013). Epidemiología y características clínicas de los episodios de bacteriemia por *Streptococcus pyogenes* en Cartagena (Murcia). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(7), 448-450.

- [24] Mustafa, G., Arif, R., Atta, A., Sharif, S., & Jamil, A. (2017). Bioactive compounds from medicinal plants and their importance in drug discovery in Pakistan. *Matrix Sci. Pharma*, 1(1), 17-26.
- [25] Médicos Descalzos-Guatemala. Plantas medicinales para las 10 enfermedades más comunes en Guatemala. Guatemala: Médicos Descalzos, OPS/OMS;1998.
- [26] Cabrera, Y., Fdragas, A., & Guerrero, L. (2005). Antibióticos naturales. Mito o realidad. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 21(3-4), Casa Pía (2020). Antibióticos Naturales: 12 remedios para el malestar. Casa Pía [página web], López, M. (2005). *Equinácea*. *Offarm*, 24(1), 68-74.
- [27] Bhardwaj, K., Dhanjal, D. S., Sharma, A., Nepovimova, E., Kalia, A., Thakur, S., ... & Kuča, K. (2020). Conifer-derived metallic nanoparticles: Green synthesis and biological applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 9028.
- [28] Bhardwaj, K.; Islam, MT; Jayasena, V.; Sharma, B.; Sharma, S.; Sharma, P.; Kuča, K.; Bhardwaj, P. Revisión sobre aceites esenciales, composición química, extracción y utilización de algunas coníferas en el noroeste del Himalaya. *Phyther. Res.* 2020 , 34 , 2889–2910.
- [29] Akaberi, M., Boghrati, Z., Amiri, MS, Khayyat, MH y Emami, SA (2020). Una revisión de las coníferas en Irán: química, biología y su importancia en la medicina tradicional y moderna. *Diseño farmacéutico actual* , 26 (14), 1584-1613.
- [30] Judd, WS; Campbell, CS; Kellogg, EA; Stevens, PF; Donoghue, MJ (2002). *Sistemática de las plantas, a phylogenetic approach* (2 edición). Sinauer Associates, Sunderland MA, USA.
- [31] Farjon A. 2003. The remaining diversity of conifers. *ISHS Acta Horticultura* 615(1): 75-89. Doi:10.17660/ActaHortic.2003.615.5.
- [32] Gernandt, D. S., & Pérez-de la Rosa, J. A. (2014). Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 126-133.
- [33] Flores, A. 2019. Producción maderable de *Abies religiosa* (Kunth) Schtdl. & Cham. en zonas de movimiento de germoplasma. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 10(56): 238-247. Doi:10.29298/rmcf.v10i56.481.

- [34] Christenhusz, M.J.M, Reveal, J.L, Farjon, A., Gardner, M.F, Mill, R.R, y Chase, M.W. 2011. A new classification and linear sequence of extant gymnosperms. *Phytotaxa* 19: 55-70
- [35] Gernandt, D. S., & Pérez-de la Rosa, J. A. (2014). Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85, 126-133.
- [36] Sánchez G., A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y Bosques* 14(1): 107-120. Doi: 1021829/myb.2008.1411222.
- [37] Sánchez-González, A. (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y bosques*, 14(1), 107-120.
- [38] *Sunset Western Garden Book*. 1995. pp. 606-607.
- [39] Farjon A (2005). *Pines* (2nd ed.). Leiden: E. J. Brill.
- [40] Bhardwaj, K.; Dhanjal, DS; Sharma, A.; Nepovimova, E.; Kalia, A.; Thakur, S.; Bhardwaj, S.; Chopra, C.; Singh, R.; Verma, R.; et al. Nanopartículas metálicas derivadas de coníferas: síntesis verde y aplicaciones biológicas. *En t. J. Mol. Ciencia*. 2020 , 21 , 9028.
- [41] Graciano-Ávila, G., Aguirre-Calderón, Ó. A., Alanís-Rodríguez, E., & Lujan-Soto, J. E. (2017). Composición, estructura y diversidad de especies arbóreas en un bosque templado del Noroeste de México. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 4(12), 535-542.
- [42] Tomback, Diana F. (junio 1982). «Dispersión de semillas de pino carrasco por el cascanueces de Clark: una hipótesis de mutualismo». *The Journal of Animal Ecology* 51 (2): 451-467.
- [43] Rev. mex. de cienc. forestales vol.11 no.60 México jul./ago. 2020 Epub 09-Dic-2020
- [44] Kopaczyk, JM; Warguła, J.; Jelonek, T. La variabilidad de los terpenos en las coníferas bajo estímulos ambientales y de desarrollo. *Reinar. Exp. Bot.* 2020 , 180 , 104197.
- [45] Virjamo, V.; Fyhrquist, P.; Koskinen, A.; Lavola, A.; Nissinen, K.; Julkunen-Tiitto, R. La 1,6-deshidropinidina es un compuesto abundante en los brotes de *Picea abies* (*Pinaceae*) y la fracción de 1,6-deshidropinidina muestra actividad antibacteriana contra *Streptococcus equi* Subsp. *equi*. *Moléculas* 2020 , 25 , 4558.

- [46] Hernández, T. (1987). Estimación de la influencia de los factores agrometeorológicos sobre la productividad del género *Pinus* en México.
- [47] Villagómez-Flores, E., Hinojosa-Espinosa, O., & Villaseñor, J. L. (2018). El género *Stevia* (Eupatorieae, Asteraceae) en el estado de Morelos, México. *Acta botánica mexicana*, (125).
- [48] Farjon, A., Perez de la Rosa, J. A., & Styles, B. T. (1997). Guía de campo de los pinos de México y América Central.
- [49] Farjon, A., Perez de la Rosa, J. A., & Styles, B. T. (1997). Guía de campo de los pinos de México y América Central.
- [50] Nava, R. F. (2007). PLANTAS CON POTENCIAL USO ORNAMENTAL DEL ESTADO DE MORELOS, MÉXICO Alejandro Rendón Correa. *Polibotánica*, (23), 121-165.
- [51] Recaséns, A. B. C., & Rodríguez, V. T. El clima como integrador de ecosistemas.
- [52] López García, G., & Nieto de Pascual Pola, M. C. D. C. (2019). Características estructurales de un bosque de pino en Tlalnepantla, Morelos. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 10(51), 23-52.
- [53] Barseló Oliete, M. T. (1982). Las actividades primarias en el estado de Morelos, 1950-1970. *Investigaciones geográficas*, (12), 67-117.
- [54] Tomback, Diana F. (junio 1982). «Dispersión de semillas de pino carrasco por el cascanueces de Clark: una hipótesis de mutualismo». *The Journal of Animal Ecology* 51 (2): 451-467.
- [55] Estrada-Castillón, A. E., J. A. Villarreal-Quintanilla, M. M. Salinas-Rodríguez, C. M. Cantú-Ayala, H. González-Rodríguez, y J. Jiménez-Pérez. 2014. Coníferas de Nuevo León, México. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León. 111 p.
- [56] Farjon, A., and B. T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropical Monograph 75. New York Botanical Garden Press. New York, USA. 291 p.
- [57] Perry, J. 1991. The pines of Mexico and Central America. Oregon Timber Press. Portland, USA. 231 p.

- [58] Hernández-Molina, E. G. 2004. Experiencias en recolección y acondicionamiento de frutos y semillas de 25 especies forestales con demanda en el programa de incentivos forestales. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- [59] Rodríguez-Franco, C. 1997. La silvicultura de *Pinus montezumae* Lamb. en la región central de México. *Ciencia Forestal en México* 22(81): 91-115.
- [60] Rodríguez-Franco, C. 1997. La silvicultura de *Pinus montezumae* Lamb. en la región central de México. *Ciencia Forestal en México* 22(81): 91-115.
- [61] Rodríguez-Franco, C. 1997. La silvicultura de *Pinus montezumae* Lamb. en la región central de México. *Ciencia Forestal en México* 22(81): 91-115.
- [62] Bhangale, J. O., & Acharya, S. R. (2016). Anti-Parkinson activity of petroleum ether extract of *Ficus religiosa* (L.) leaves. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2016.
- [63] Willan, R. L. 1991. Guía para la Manipulación de Semillas Forestales. FAO, Roma. 502 p.
- [64] Willan, R. L. 1991. Guía para la Manipulación de Semillas Forestales. FAO, Roma. 502 p.
- [65] . Bhardwaj, K., Sanches-Silva, A., Atanassova, M., Sharma, R., Nepovimova, E., Musilek, K., Sharma, R., Alghuthaymi, M. A., Dhanjal, D. S., Nicoletti, M., Sharma, B., Upadhyay, N., Cruz Martins, N., Bhardwaj, P., & Kuca, K. (2021). Conifers Phytochemicals: A Valuable Forest with Therapeutic Potential. *Molecules*, 26(10), 3005. <https://doi.org/10.3390/molecules26103005>
- [66] Porres-Martínez, M.; González-Burgos, E.; Carretero, ME; Pilar Gómez-Serranillos, M. Potencial neuroprotector in vitro de los monoterpenos α -pineno y 1,8-cineol contra el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en células PC12. *Z. fur Naturforsch. Secta. C J. Biosci.* 2016 , 71 , 191–199.
- [67] Singh, B.; Sharma, RA Terpenos vegetales: respuestas de defensa, análisis filogenético, regulación y aplicaciones clínicas. *3 biotecnología* 2015 , 5 , 129-151.
- [68] Da Silveira E Sá, RDC; Andrade, LN; De Sousa, DP Sesquiterpenos provenientes de aceites esenciales y actividad antiinflamatoria. *Nat. Pinchar. Comunitario.* 2015 , 10 , 1767–1774.

- [69] Kopaczyk, JM, Warguła, J. y Jelonek, T. (2020). La variabilidad de los terpenos en las coníferas bajo estímulos ambientales y de desarrollo. *Botánica Ambiental y Experimental* , 180 , 104197.
- [70] Dey, P.; Kundu, A.; Kumar, A.; Gupta, M.; Lee, BM; Bhakta, T.; Dash, S.; Kim, *análisis HS de alcaloides (alcaloides indol, alcaloides isoquinolina, alcaloides tropano)* ; Elsevier Inc.: Ámsterdam, Países Bajos, 2020; ISBN 9780128164556.
- [71] Thawabteh, A.; Juma, S.; Bader, M.; Karaman, D.; Scrano, L.; Bufo, SA; Karaman, R. La actividad biológica de los alcaloides naturales contra herbívoros, células cancerosas y patógenos. *Toxinas* 2019 , 11 , 656.
- [72] Virjamo, V.; Fyhrquist, P.; Koskinen, A.; Lavola, A.; Nissinen, K.; Julkunen-Tiitto, R. La 1,6-deshidropinidina es un compuesto abundante en los brotes de *Picea abies* (*Pinaceae*) y la fracción de 1,6-deshidropinidina muestra actividad antibacteriana contra *Streptococcus equi* Subsp. equi. *Moléculas* 2020 , 25 , 4558.
- [73] Ignacio, I.; Volf, I.; Popa, VI Una revisión crítica de los métodos para la caracterización de compuestos polifenólicos en frutas y verduras. *Química de los alimentos*. 2011 , 126 , 1821–1835.
- [74] Kumar, B., Rani, R., Das, S. y Das, S. (2012). Fitoconstituyentes y potencial terapéutico de *Thuja occidentalis*. *Revista de investigación de ciencias farmacéuticas, biológicas y químicas* , 3 (2), 354-362.
- [75] Akaberi, M., Boghrati, Z., Amiri, MS, Khayyat, MH y Emami, SA (2020). Una revisión de las coníferas en Irán: química, biología y su importancia en la medicina tradicional y moderna. *Diseño farmacéutico actual* , 26 (14), 1584-1613.
- [76] Branco, CS; Duong, A.; Machado, Alaska; Wu, A.; Scola, G.; Andrezza, AC; Salvador, M. *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze tiene acción neuroprotectora mediante modulación mitocondrial en células dopaminérgicas SH-SY5Y. *Mol. Biol. Rep.* 2019 , 46 , 6013–6025.
- [77] El Omari, N.; Ezzahrae Guaouguaou, F.; El Menyiy, N.; Benali, T.; Äanniz, T.; Chamkhi, I.; Balahbib, A.; Taha, D.; Shariati, MA; Zengin, G.; et al. Actividades fitoquímicas y biológicas de *Pinus halepensis* mill., y su uso etnomedicinal. *J. Etnofarmacol.* 2021 , 268 , 113661.

- [78] Metsämuuronen, S.; Sirén, H. Compuestos fenólicos bioactivos, metabolismo y propiedades: una revisión de compuestos químicos valiosos en el *pino silvestre* y la *píce*a común. *Fitoquímica. Rev.* 2019 , 18 , 623–664, ISBN 0123456789.
- [79] Akaberi, M., Boghrati, Z., Amiri, MS, Khayyat, MH y Emami, SA (2020). Una revisión de las coníferas en Irán: química, biología y su importancia en la medicina tradicional y moderna. *Diseño farmacéutico actual* , 26 (14), 1584-1613.
- [80] Tsao, R. Química y Bioquímica de los polifenoles dietéticos. *Nutrientes* 2010 , 2 , 1231–1246.
- [81] Nanda, S.; Mohanty, JN; Mishra, R.; Joshi, RK Ingeniería metabólica de fenilpropanoides en plantas. En *Transgénesis y Metabolismo Secundario* ; Springer: Berlín/Heidelberg, Alemania, 2017; págs. 485–510.
- [82] Saleem, M.; Kim, J.; Ali, S.; Sup, Y. Una actualización sobre lignanos vegetales bioactivos. *Nat. Pinchar. Representante* 2005 , 22 , 696–716.
- [83] García-Pérez, ME; Royer, M.; Herbette, G.; Desjardins, Y.; Pouliot, R.; Stevanovic, T. Corteza de *Picea mariana* : una nueva fuente de trans-resveratrol y otros polifenoles bioactivos. *Química de los alimentos.* 2012 , 135 , 1173–1182.
- [84] García-Pérez, ME; Royer, M.; Herbette, G.; Desjardins, Y.; Pouliot, R.; Stevanovic, T. Corteza de *Picea mariana* : una nueva fuente de trans-resveratrol y otros polifenoles bioactivos. *Química de los alimentos.* 2012 , 135 , 1173–1182.
- [85] Salminen, J.; Karonen, M. Ecología química de taninos y otros fenólicos: necesitamos un cambio de enfoque. *Hno. Ecológico. Soc.* 2011 , 25 , 325–338.
- [86] Raitanen, JE; Järvenpää, E.; Korpinen, R.; Makinen, S.; Hellstrom, J.; Kilpeläinen, P.; Liimatainen, J.; Ora, A.; Tupasela, T.; Jyske, T. Taninos de corteza de conífera como *picante nórdico* : ¿conservante y aroma sostenibles? *Moléculas* 2020 , 25 , 567.
- [87] Koche, D.; Shirsat, R.; Kawale, M. Una descripción general de las principales clases de fitoquímicos: su tipo y función en la prevención de enfermedades. *Hislopi*a J. 2016 , 9 , 2016.
- [88] Salminen, J.; Karonen, M. Ecología química de taninos y otros fenólicos: necesitamos un cambio de enfoque. *Hno. Ecológico. Soc.* 2011 , 25 , 325–338

- [89] Prothmann, J.; Sol, M.; Spéjel, P.; Sandahl, M.; Turner, C.; Scheuba, J.; Wronski, VK; Rodador, JM; Grienke, U.; Santos-Buelga, C.; et al. Relación entre compuestos fenólicos, contenido de antocianinas y actividad antioxidante en germoplasma de cebada coloreada. *J. Agrícola. Química de los alimentos*. 2017 , 53 , 1713.
- [90] Matthews, S.; Mila, I.; Scalbert, A.; Donnelly, DMX Proantocianidinas extraíbles y no extraíbles en cortezas. *Fitoquímica* 1997 , 45 , 405–410.
- [91] Koleckar, V.; Kubikova, K.; Rehakova, Z.; Kuca, K.; junio, D.; Jahodar, L.; Opletal, L. Taninos condensados e hidrolizables como antioxidantes que influyen en la salud. *Mini-Rev. Medicina. Química*. 2008 , 8 , 436–447.
- [92] De Bruyne, T.; Pieters, L.; Deelstra, H.; Vlietinck, A. Taninos vegetales condensados: biodiversidad en estructura y actividades biológicas. *Bioquímica. Sistema. Ecológico*. 1999 , 27 , 445–459.
- [93] St-Pierre, A.; Blondeau, D.; Bourdeau, N.; Bley, J.; Desgagné-Penix, I. Composición química de los extractos de corteza de abeto negro (*Picea mariana*) y su potencial como desinfectante natural. *Ind. Biotecnología*. 2019 , 15 , 219–231.
- [94] Metsämuuronen, S.; Sirén, H. Compuestos fenólicos bioactivos, metabolismo y propiedades: una revisión de compuestos químicos valiosos en el *pino silvestre* y la *píceas común* . *Fitoquímica. Rev.* 2019 , 18 , 623–664, ISBN 0123456789.
- [95] Farjon, A., and B. T. Styles. 1997. *Pinus* (Pinaceae). Flora Neotropical Monograph 75. New York Botanical Garden Press. New York, USA. 291 p.
- [96] Bhardwaj, K., Sanches-Silva, A., Atanassova, M., Sharma, R., Nepovimova, E., Musilek, K., Sharma, R., Alghuthaymi, M. A., Dhanjal, D. S., Nicoletti, M., Sharma, B., Upadhyay, N., Cruz Martins, N., Bhardwaj, P., & Kuca, K. (2021). Conifers Phytochemicals: A Valuable Forest with Therapeutic Potential. *Molecules*, 26(10), 3005. <https://doi.org/10.3390/molecules26103005>.
- [97] Herrera-Hernández, R. 2021. Producción y calidad de semilla de *Pinus montezumae* de siete sitios en el centro de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, México. (en curso).
- [98] Bernal, M., & Guzmán, M. (1984). El antibiograma de discos. Técnica de Kirby-Bauer. *Biomédica*, 4(3), 112-121.

- [99] Kopaczyk, JM; Warguła, J.; Jelonek, T. La variabilidad de los terpenos en las coníferas bajo estímulos ambientales y de desarrollo. *Reinar. Exp. Bot.* **2020** , *180* , 104197.
- [100] Sharma, A.; Sharma, L.; Goyal, R. Una revisión sobre las especies de pino del Himalaya: aspectos etnofarmacológicos, fitoquímicos y farmacológicos. *Farmacéutico. J.* **2018** , *10* , 611–619.
- [101] Bhardwaj, K.; Islam, MT; Jayasena, V.; Sharma, B.; Sharma, S.; Sharma, P.; Kuča, K.; Bhardwaj, P. Revisión sobre aceites esenciales, composición química, extracción y utilización de algunas coníferas en el noroeste del Himalaya. *Phyther. Res.* **2020** , *34* , 2889–2910.
- [102] Kopaczyk, JM; Warguła, J.; Jelonek, T. La variabilidad de los terpenos en las coníferas bajo estímulos ambientales y de desarrollo. *Reinar. Exp. Bot.* **2020** , *180* , 104197.
- [103] St-Pierre, A.; Blondeau, D.; Bourdeau, N.; Bley, J.; Desgagné-Penix, I. Composición química de los extractos de corteza de abeto negro (*Picea mariana*) y su potencial como desinfectante natural. *Ind. Biotecnología.* **2019** , *15* , 219–231.
- [104] Rafieian-kopaei, M.; Suleimani dehkordi, I.; Ghana, M.; Shokrollahi, A.; Aghaei, M.; Ayatollahi, SA; Choudhary, MI Aislamiento guiado por bioactividad de nuevos compuestos antiproliferativos de *Juniperus foetidissima* Willd. *Nat. Pinchar. Res.* **2016** , *30* , 1927–1933.
- [105] Virjamo, V.; Fyhrquist, P.; Koskinen, A.; Lavola, A.; Nissinen, K.; Julkunen-Tiitto, R. La 1,6-deshidropinidina es un compuesto abundante en los brotes de *Picea abies* (*Pinaceae*) y la fracción de 1,6-deshidropinidina muestra actividad antibacteriana contra *Streptococcus equi* Subsp. *equi*. *Moléculas* **2020** , *25* , 4558.
- [106] Rafieian-kopaei, M.; Suleimani dehkordi, I.; Ghana, M.; Shokrollahi, A.; Aghaei, M.; Ayatollahi, SA; Choudhary, MI Aislamiento guiado por bioactividad de nuevos compuestos antiproliferativos de *Juniperus foetidissima* Willd. *Nat. Pinchar. Res.* **2016** , *30* , 1927–1933
- [107] Küpeli, E.; Erdemoğlu, N.; Yeşilada, E.; Şener, B. Actividad antiinflamatoria y antinociceptiva de taxoides y lignanos del duramen de *Taxus baccata* L. *J. Ethnopharmacol.* **2003** , *89* , 265–270.

- [108] Juyal, D.; Thawani, V.; Thaledi, S.; Joshi, M. Propiedades etnomédicas de *Taxus wallichiana* Zucc. (*Tejo del Himalaya*). *J. tradición. Complementar. Medicina*. **2014** , *4* , 159–161.
- [109] Kanchan, B.; Prerna, B.; Simran, K. Valor medicinal de los metabolitos secundarios de los pinos cultivados en la región del Himalaya de la India. *Res. J. Biotecnología*. **2020** , *15* , 131–140.
- [110] Asmi, KS; Lakshmi, T.; Balusamy, SR; Parameswari, R. Aspectos terapéuticos de la taxifolina: una actualización. *J. Adv. Farmacéutica. Educativo. Res*. **2017** , *7* , 187–189.
- [111] St-Pierre, A.; Blondeau, D.; Bourdeau, N.; Bley, J.; Desgagné-Penix, I. Composición química de los extractos de corteza de abeto negro (*Picea mariana*) y su potencial como desinfectante natural. *Ind. Biotecnología*. **2019** , *15* , 219–231.
- [112] Michael, HN; Awad, HM; El-Sayed, NH; Paré, PW Investigaciones químicas y antioxidantes: agujas de pino de Norfolk (*Araucaria excelsa*). *Farmacéutica. Biol*. **2010** , *48* , 534–538.
- [113] ranco, CS; Duong, A.; Machado, Alaska; Wu, A.; Scola, G.; Andrezza, AC; Salvador, M. *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze tiene acción neuroprotectora mediante modulación mitocondrial en células dopaminérgicas SH-SY5Y. *Mol. Biol. Rep*. **2019** , *46* , 6013–6025.
- [114] Nisar, M.; Khan, I.; Ahmad, B.; Ali, yo; Ahmad, W.; Choudhary, MI Actividades antifúngicas y antibacterianas de *Taxus wallichiana* Zucc. *J. Enzima. Inhibir. Medicina. Química*. **2008** , *23* , 256–260.
- [115] St-Pierre, A.; Blondeau, D.; Bourdeau, N.; Bley, J.; Desgagné-Penix, I. Composición química de los extractos de corteza de abeto negro (*Picea mariana*) y su potencial como desinfectante natural. *Ind. Biotecnología*. **2019** , *15* , 219–231.
- [116] Kanchan, B.; Prerna, B.; Simran, K. Valor medicinal de los metabolitos secundarios de los pinos cultivados en la región del Himalaya de la India. *Res. J. Biotecnología*. **2020** , *15* , 131–140.
- [117] Ferrentino, G.; Amán, N.; Morozova, K.; Tonon, G.; Scampicchio, M. Compuestos fenólicos extraídos de abeto (*Picea abies*) mediante dióxido de carbono supercrítico como

agentes antimicrobianos contra bacterias grampositivas evaluados mediante calorimetría isotérmica. *J. Terma. Anal. Calorim.* **2020** .

[118] Hoon, LY; Choo, C.; Watawana, Michigan; Jayawardena, N.; Waisundara, VY Evaluación de la capacidad antioxidante total y compuestos antioxidantes de diferentes extractos solventes de piñones Chilgoza (*Pinus gerardiana*). *J. Función. Alimentos* **2015** , 18 , 1014–1021.

[119] Gascón, S.; Jiménez-Moreno, N.; Jiménez, S.; Quero, J.; Rodríguez-Yoldi, MJ; Ancín-Azpilicueta, C. Composición nutracéutica de tres extractos de corteza de pino y su efecto antiproliferativo sobre las células Caco-2. *J. Función. Alimentos* **2018** , 48 , 420–429.

[120] Kanchan, B.; Prerna, B.; Simran, K. Valor medicinal de los metabolitos secundarios de los pinos cultivados en la región del Himalaya de la India. *Res. J. Biotecnología.* **2020** , 15 , 131–140.

[121] Michael, HN; Awad, HM; El-Sayed, NH; Paré, PW Investigaciones químicas y antioxidantes: agujas de pino de Norfolk (*Araucaria excelsa*). *Farmacéutica. Biol.* **2010** , 48 , 534–538.

[122] St-Pierre, A.; Blondeau, D.; Bourdeau, N.; Bley, J.; Desgagné-Penix, I. Composición química de los extractos de corteza de abeto negro (*Picea mariana*) y su potencial como desinfectante natural. *Ind. Biotecnología.* **2019** , 15 , 219–231.

[123] Osuna-Torres, L.; García-Martí, X.; Ventura-Zapata, E.; López-Upton, J.; Zamilpa-Álvarez, A.; González-Cortázar, M.; Herrera-Ruiz, M.; Tapia-Barrera, N. *Taxus globosa* Schltdl. (*Tejo mexicano*) y *Taxus baccata* L. (*Tejo europeo*): Análisis intra e interespecies del contenido de taxol y actividad biológica según diferentes fuentes. *Para. Sistema.* **2015** , 24 , 16.

[124] St-Pierre, A.; Blondeau, D.; Bourdeau, N.; Bley, J.; Desgagné-Penix, I. Composición química de los extractos de corteza de abeto negro (*Picea mariana*) y su potencial como desinfectante natural. *Ind. Biotecnología.* **2019** , 15 , 219–231.

[125] Bhardwaj, K.; Islam, MT; Jayasena, V.; Sharma, B.; Sharma, S.; Sharma, P.; Kuča, K.; Bhardwaj, P. Revisión sobre aceites esenciales, composición química, extracción y utilización de algunas coníferas en el noroeste del Himalaya. *Phyther. Res.* **2020** , 34 , 2889–2910.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Facultad de Ciencias
Químicas e Ingeniería

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA

Programas educativos de calidad reconocidos por CIEES, CACEI y CONACYT
SGI certificado en la norma ISO 9001:2015 e ISO 21001:2018

FORMA T4
NOMBRAMIENTO COMITÉ REVISOR

Cuernavaca, Mor., a 18 de octubre de 2023

DR. JORGE A. DOMÍNGUEZ PATIÑO
DR. MARCOS AMED SALAZAR BLAS
DRA. GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA
MTRA. MARÍA DEL CARMEN PÉREZ REDONDO
Q.I. JESÚS DÍAZ HUERTA
P R E S E N T E

Me permito comunicarles que han sido designados integrantes del **COMITÉ REVISOR** de la TESIS titulada:

Caracterización antimicrobiana del extracto metanólico de estróbilos de pino (*Pinus Moctezumae*)

Dirigida por la **DRA. GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA**

Que presenta (el) o (la) **C. ALONDRA MICHELLE DÍAZ XICOTENCATL**, del programa educativo de la **LICENCIATURA en INGENIERÍA QUÍMICA**

ATENTAMENTE
Por una humanidad culta

DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA

Se anexa firma electrónica

DICTAMEN

DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA DE LA FCQeI
P R E S E N T E

En respuesta a su amable solicitud para emitir DICTÁMEN sobre el trabajo que se menciona, me permito informarle que nuestro voto es:

VOTO	NOMBRE
Aprobatorio	DR. JORGE A. DOMÍNGUEZ PATIÑO
Aprobatorio	DR. MARCOS AMED SALAZAR BLAS
Aprobatorio	DRA. GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA
Aprobatorio	MTRA. MARÍA DEL CARMEN PÉREZ REDONDO
Aprobatorio	Q.I. JESÚS DÍAZ HUERTA

Se anexan firmas electrónicas de cada revisor, en las cuales se incluye la fecha y hora que se ha emitido el voto aprobatorio.

VALH/fmg

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VIRIDIANA AYDEE LEON HERNANDEZ | Fecha:2023-10-18 18:21:25 | Firmante

ZYyjoC2yfCHQyGmr9FfRtto7mmslQ+8Y963qTPeGN0Am9vfYdGxVsStR9fG6VMFGilEYqfSHo+38q/t4PeREyGO1GLQsTOJGzn2xlzSO85KsTrSgfrBodr6cx6VQjAm3ZPYQ7MJaI7rlQn1X5fM06OZATVZ1bV09t5ZXOqFQE3e2rKxYfOxlkTvMqZETklE3ANM1dZ1bHF9uplRgBN6MzWQqKvAhukcilxXfTswcYcln659k5f1vdlFylle0U5SwVlc2+tgJpucTTPsbDbpbqKRhTbvm/6ky+dJre6QKrX+mOrV9okTD8hXzwd0TGddrnPMOV1slRnFnp0Ke3l4rA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



008YzZI5C

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/cQ8dwDC4KaZ3rJb3T6Kkf5QybREwxtCK>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DEL CARMEN PEREZ REDONDO | Fecha:2023-11-09 16:15:23 | Firmante

ajhD00ki1FZtK2UElffhLdu+uV1QzisDBedRt03n9ag/+WafePV57bxlnZG1NjChHNNMvXVWlGeUl+Ur5cFwX0kVMRZMtTbgE6MwDJuZxZL8PFPvaWrog8H/A3jDul8uDFtXGYNz00FyCM3Qtl4F7nNZH+grFlllSQty2DQ7197+sG6UAzkYv+D+FmVcF3w/7FGsPkgdmrBNXQ9yDtBfVrRD/sVmuWLVLYdQVyp9Z9gCpMeKJD1pklig9dgmU7X+GYoOGZ47ccfX22dD9Q3wYwtYTNStilHpfFtoouRlFqpbw6VXmrVgCVUj4KSHLDn9tyRCpy0lVBknWZE70gg==

JORGE AVELINO DOMINGUEZ PATIÑO | Fecha:2023-11-09 16:54:27 | Firmante

T5zFH09Fa4Hymzh9+cloWbs1VQcULGvG1TDgDC/SufW66HUXep7ljiAON7GI2uoZMm2wJHSc8JfKQN9d0dBAri0ux+0b2mWW60N7N718UrM6hM0Hk7uBq0DfTYxax0pufGcl5o tXm9AQSiBeAcwT/xUJFPhDEBRhIKGA9foD/pc7MM20ONg0ggZQ+ZDSXHUi1f4VTpLol+iQWAbGOyHvez44lcnkRdzV+BYwQrMys/DENYrsBZ2lxXc7FgU8HFDTr4EvUPJ/DHV f3lhOnFJ+nKtsSPal6AinSNmkl0J0Qlr5aZ3dSYC+/9j5HwDPXj5P/yyqd2u7slq1ds3yL6LA==

MARCOS AMED SALAZAR BLAS | Fecha:2023-11-10 13:31:59 | Firmante

jAmvOgxnCP+l4SYeg8NBVIznZsnS4BImqeO2r5++3t1UxgCM5tt8WcelM9bBwsxpojDtdDSRnjMMdVxPeppXC50IPNhtNm0veSjTZow9ZJzk8i0njiF521Djfe6orL/lvFQL9gHYvb5 LJ5z9iUmxd2D4vObHLJbxvymEX8BChVxxwJEVjwbSl28Vllic2Fe4Gb8eqjRPxQn3Pzpi7RrRGVCCl0CV6itBvZgKXeajHGR9yRPxHHKYDCLb9CH61h0r1vIA/QSSv4wazXPav5tEr Xqg0Ph/V+mteVlyHZkxazxmdzS63XKJxjqh6Frq8eUjylrOmTdOlyRd2NT8lxStgUQ==

GENOVEVA BUSTOS RIVERA BAHENA | Fecha:2023-11-10 13:44:44 | Firmante

clhQ4pHqFvngOD16YcTKfqFhTkWkuUhdjSVtxRo0GgZTmNd2pRteFZLN27VYSOQgppXn9C7tUI7SFC6b7HkTX180jp+SIEfq2ipRgYrV58fdV0v5PHj84g6T1813cb9KvOw7oUte Tlffb9TX0FyyMeAi9LqfP9Q95ahOZ38IZIFbSavLY6XtYyBeHxQ1RYgB3NDMz3x4uBDmU58UaRThuT9FYCuRyN1DdZ4XiMBeoJwakRHY02AwWsWBWvSL0vhEUJqQlhl4QKqg /P3qwum6fARILq7s70Y78XRD/skjeCchZatkJ07ggBHwIx+rQCdmCetUhon9Q9tfPcpubw==

JESUS DIAZ HUERTA | Fecha:2023-11-10 13:55:01 | Firmante

qEOfo5hkvIRR9sSu3Bqa2AiVn2cyG+BHjaD7FRJU3F8yjmQl/BiNr+f1wlJlcEB1JjJwkGTw1jNN2tL0jg/i9YZR0cvQukf6YJumZ8ilZGWJv12TuZ+5mde/BAKN+8FQv5ZOCsU/Eg DxcMrEikVZVS88sCuYHfsqMih6wqbR/r3R9VRi6hWOI5ldYDfP72Elts4Cq9FMSpDwjklGXZsqQAvxM3TdIU/tD6+CzA6hq6G39pn5VbRaaATHwiS6GOzGdUFjnyQ7nlzkPKbBT DAfjn+UfirYwU3MLfUYwm/Rsflcapf5Lgtwe0khhb1IPu++2f9k+j4lcWN1OiwI25w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



xahSHZiCt

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QvieD5XY1jHkCYbRk0vi3b3lWu94PKL6>

