

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



**DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICRO-
BIANA DE DIVERSOS PRODUCTOS NATURALES.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A N**

**LAZARO ALFREDO ABURTO FIERRO
ISABEL ROLDAN TREJO**

1 9 8 0



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

DE DIVERSOS PRODUCTOS NATURALES

LAZARO ALFREDO ABURTO FIERRO

ISABEL ROLDAN TREJO

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO -

BIOQUIMICO MICROBIOLOGO.

PRESIDENTE *Elda Peniche Quintana*

VOCAL *Rafael Castillo Bocanegra*

SECRETARIO *César Compadre Reyes*

1er. SUPLENTE *Olga Velázquez Madrazo*

2do SUPLENTE *Martha Jiménez Castañeda*

Sitio donde se desarrolló el tema: *Facultad de Química. IMIF*

Nombre completo y firma de los sustentantes: *Lázaro Alfredo Aburto Fierro*

Isabel Roldán Trejo

Nombre completo y firma del asesor del tema: *César Compadre Reyes*

AGRADECEMOS SINCERAMENTE A LOS MAESTROS:

ELDA PENICHE QUINTANA

OLGA VELAZQUEZ MADRAZO

MARTHA JIMENEZ CASTAÑEDA

MA. LUISA GARCIA PADILLA

*SU VALIOSA COLABORACION Y AYUDA PARA LA
ELABORACION DE ESTE TRABAJO.*

NUESTRO AGRADECIMIENTO PARA LOS SEÑORES:

Dr. MANUEL JIMENEZ

Dr. RAUL ENRIQUEZ

Dr. ALFREDO ORTEGA

Dr. EUGENE BRATTOEFF

M. C. ELISEO ONTIVEROS

M. C. MARIO GONZALEZ DE LA PARRA

*POR HABERNOS PROPORCIONADO LAS SUSTANCIAS
UTILIZADAS PARA LLEVAR A CABO ESTE TRABAJO.*

I N D I C E

	<i>Pags.</i>
<i>INTRODUCCION</i>	<i>1 - 5</i>
<i>GENERALIDADES</i>	
<i>A. METODOS</i>	<i>6 - 7</i>
<i>B. VENTAJAS Y DESVENTAJAS</i>	
<i>DE LOS METODOS</i>	<i>7 - 9</i>
<i>C. MICROORGANISMOS</i>	<i>9 - 12</i>
<i>D. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE</i>	
<i>LACTONAS SESQUITERPENICAS</i>	<i>12 - 13</i>
<i>E. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE</i>	
<i>QUINONAS</i>	<i>13 - 14</i>
<i>F. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE</i>	
<i>FLAVONAS</i>	<i>14 - 15</i>
<i>G. ACTIVIDAD BIOLOGICA DE</i>	
<i>COMPUESTOS METALICOS</i>	<i>16 - 17</i>

I N D I C E

	<i>Pags.</i>
<i>H. SUSTANCIAS PROBADAS</i>	18 - 29
<i>PARTE EXPERIMENTAL</i>	30 - 34
<i>RESULTADOS</i>	35 - 43
<i>DISCUSION</i>	44 - 45
<i>CONCLUSION</i>	46 - 47
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	48 - 53

INTRODUCCION.

El hombre primitivo para satisfacer sus necesidades hizo uso de los recursos que le presentaba la naturaleza, por medio de la observación de ésta fue descubriendo elementos que podían serle útiles, entre estos elementos se encuentran las plantas, las cuales además de darles diversos usos como en la alimentación, también las utilizó empíricamente en el tratamiento de las enfermedades.

El uso en Medicina de medicamentos derivados de plantas es muy antiguo. Se sabe que hace 4000 años los asirios ya tenían conocimiento acerca de plantas medicinales, asimismo las crónicas referentes a egipcios, griegos y romanos precristianos establecen el uso de muchas especies vegetales como agentes terapéuticos. (46).

Los papiros de los antiguos egipcios escritos hacia 1600 A. C. registran los nombres de numerosas sustancias usadas por los médicos de ese período, como son las siguientes: bilis de buey, aceite de oliva, azafrán, corteza de granado, aceite de ricino, lechuga silvestre, opio, canela, comino, etc.

Los antiguos griegos conocían ciertas drogas que todavía siguen utilizándose. El filósofo Pitágoras (582 A. C.) estaba familiarizado con la mostaza, el médico Hipócrates (966 A. C.) conocía el ajenojo, la canela, la cicuta, la genciana, la acacia, la manzanilla y otras muchas. Teofrasto (372 A. C.) discípulo de Aristóteles, escribió 10 libros sobre la historia de las plantas. Eran familiares para él las si-

güentes plantas: la pimienta, el opio, el helecho macho y la canela (46).

Algunos papiros egipcios como el de Ebers, el de Edwin Smith y otros, indican detalladamente la preparación y el uso de los remedios.

Homero en sus obras referentes al período heroico cita algunas plantas medicinales y habla además del uso de remedios para calmar el dolor. Entre los romanos existían los médicos, éstos eran esclavos cu yos conocimientos transmitidos en forma oral de unos a otros, se refieren a algunos vegetales con propiedades curativas. (2).

Hacia la Edad Media aparecen los herbolarios que describieron e ilustraron muchas especies vegetales. Algunos monjes se dedicaron al cultivo y recolección de plantas a las que atribuían propiedades medicinales. En los monasterios existía un lugar en el que se preparaban los medicamentos por medio de técnicas sencillas. (13).

Paracelso consideraba las enfermedades como desequilibrios en la composición química del organismo y para su curación señalaba prin cipalmente el uso de sustancias químicas inorgánicas y decía que en los vegetales que presentaban alguna actividad terapéutica existía un princi pio que debía extraerse y utilizarse en lugar de toda la planta. (2).

También en México hacia el siglo XVI existía el conocimiento de muchas plantas medicinales. En los jardines reales fundados por Netzahualcóyotl y Moctezuma se cultivaban estas plantas. En los tian guis se vendían hierbas medicinales para todo género de enfermedades. Las propiedades curativas atribuidas a algunas plantas a veces se ba-

saban en su forma, por ejemplo la flor de corazón por forma semejante a la de un corazón se administraba en enfermedades de éste o relacionadas a él. (43).

Con el desarrollo de la ciencia, los remedios que habían sido utilizados hasta entonces fueron cayendo en desuso, sólo algunos como la quinina, el opio y la belladona siguieron usándose por mucho tiempo. La quinina y la morfina son ejemplos de los primeros principios activos aislados de plantas medicinales.

A finales del siglo XIX Paul Ehrlich que trabajaba en Alemania, estudió la posibilidad de utilizar las afinidades específicas de los compuestos orgánicos para resolver problemas médicos. Aunque descu**br**ió colorantes que actuaban frente a tripanosomas y arsenicales que resultaban útiles frente a espiroquetas, no consiguió encontrar nada útil contra otros microorganismos.

Los estudios siguieron hasta 1935, en Alemania, se preparó un colorante, el Prontosil que actuaba contra estreptococos.

Un año después en Francia, Tréfouel mostró que los pacientes a los que administraba el colorante, eliminaban por la orina un producto incoloro de fórmula química sencilla, la sulfanilamida. Esta se utilizó como medicamento y pronto fue sustituida por derivados más activos, el conjunto de las sustancias de este tipo se conoce en medicina como sulfamidas.

Este éxito estimuló la búsqueda de nuevos tipos de agentes quimioterápicos. El resultado de ello condujo a los antibióticos que fue-

ron definidos como sustancias antimicrobianas producidas por microorganismos.

Fleming en 1929, señaló la acción antibiótica de una colonia del hongo Penicilium notatum que contaminaba un cultivo de estafilococos. La sustancia inhibidora denominada penicilina, pareció en principio demasiado inestable para poder aislarse.

Algunos años después Chain y colaboradores abordaron el problema de la purificación de la penicilina y demostraron que era relativamente estable una vez purificada y deshidratada. Además, resultó ser más activa que las sulfamidas frente a los microorganismos sensibles.

El éxito de la penicilina condujo a la búsqueda de nuevos antibióticos, en principio, en los centros de investigación médica y en los laboratorios que se ocupaban del estudio de la microbiología del suelo y posteriormente en la industria farmacéutica. (8).

Debido al uso indiscriminado de los antibióticos han surgido cepas de microorganismos resistentes, por lo cual la efectividad de ellos ha disminuido. Algunos antibióticos presentan desventajas debido a su limitado espectro antimicrobiano o por los efectos secundarios que producen. Es por ésto que la búsqueda de nuevos antibióticos continúa y se ha hecho intensiva en los últimos 25 años y sólo a una pequeña proporción de los encontrados se les ha dado uso clínico significativo.

El campo más estudiado en esta búsqueda ha sido el de los estreptomicetos. Se han reportado nuevos antibióticos de origen microbiano

provenientes de Micromonospora, Nocardia, Microbiospora, ciertos hongos, etc.

Además de esta área existe otra perteneciente a las plantas superiores. Acerca de estas investigaciones se han publicado artículos; pero son pocos aquellos en los cuales se ha intentado aislar e identificar el principio activo. Existe un continuo interés en los agentes antimicrobianos de plantas superiores y un ejemplo de esto es la continua aparición de artículos describiendo estudios al respecto. (27).

Al someter a un examen científico a las plantas a las que se les atribuyen propiedades curativas, se ha demostrado en ocasiones, que éstas carecen de esas propiedades pero en otras se ha encontrado que contienen sustancias de gran valor terapéutico.

El objetivo de este trabajo es implementar una metodología sencilla, que se pueda efectuar en un laboratorio de productos naturales, para determinar la actividad antimicrobiana de productos de origen vegetal, y probar diversas sustancias provenientes de vegetales a los que tradicionalmente se les atribuyen propiedades antimicrobianas o que debido a un análisis de su estructura se pensó pudieran tener una posible actividad antimicrobiana. Al mismo tiempo esta metodología podrá aplicarse a derivados sintéticos de dichos productos obtenidos bien sea en el proceso de identificación de la estructura o con el fin de incrementar su posible actividad antimicrobiana.

GENERALIDADES.

A. METODOS.

Todas las técnicas descritas para el análisis microbiológico están basadas en la respuesta de un organismo sensible a un antibiótico bajo de terminadas condiciones.

Dependiendo del método utilizado, la respuesta microbiana puede determinarse midiendo las zonas de inhibición presente en placas de agar, o por medición turbidimétrica del crecimiento microbiano.

En la literatura se encuentran reportadas diversas técnicas, entre las más usadas están:

1. *Métodos de difusión.*

a) Discos de papel (3, 4, 22, 29, 42).

b) Penicilindros (16, 21, 22).

c) Perforaciones en el agar (5, 16).

2. *Método turbidimétrico (16, 22).*

3. *Método de las estrías (25, 26, 27).*

1. *Métodos de difusión.*

a) Discos de papel.- Este método se realiza colocando sobre la placa de agar, previamente inoculada con el microorganismo, los discos de papel impregnados con el antibiótico de referencia o la sustancia de prueba.

- b) *Penicilindros.* - Una vez inoculada la placa de agar con el microorganismo se colocan los penicilindros sobre ella, agregando dentro de los mismos el antibiótico o la sustancia de prueba.
- c) *Perforaciones en el agar.* - Se coloca el agar sobre la placa, se deja solidificar, se inocula con el microorganismo, se hacen las perforaciones y éstas se llenan con la sustancia de prueba o el antibiótico de referencia.

2. Método turbidimétrico.

En este método un inóculo idéntico del germen estudiado se incubaba en tubos que contienen diferentes concentraciones del antibiótico. El punto límite es el que corresponde al tubo de menor concentración que impide la aparición de turbidez después de un tiempo determinado de incubación.

3. Método de las estrías.

Se coloca en la caja de petri el antibiótico de referencia o la sustancia de prueba, agregando después el agar, se deja solidificar y se siembran los microorganismos frente a los cuales se hace el estu por medio de estrías. De esta manera se pueden probar varios microorganismos en una misma caja.

B. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS METODOS.

- 1-a) *Métodos de los discos de papel.* - Es un método barato que no necesita equipo especial, se puede adaptar a cualquier laboratorio, es sensible y fácil de llevar a cabo,

requiere pequeñas cantidades de antibiótico o de la sustancia de prueba, no presenta muchos problemas de contaminación. La difusión tanto del antibiótico de referencia como de la sustancia de prueba puede verse afectada por el grosor de la capa de agar, por los disolventes, concentración de la sustancia, tiempo de predifusión, humedad, tiempo de incubación.

1-b) Método de penicilindros. - Requiere mayor cantidad de equipo, es más susceptible de contaminación, la difusión se puede ver afectada por los mismos factores que el de los discos, aunque es un método bastante sensible y exacto.

1-c) Método de perforaciones en el agar. - Se necesita un dispositivo especial para hacer las perforaciones de un modo uniforme en diámetro y profundidad, en la difusión influyen los mismos factores señalados en los dos métodos anteriores.

En todos estos métodos la distribución de un antibiótico en el agar alrededor del depósito, puede expresarse teóricamente por una ecuación que involucra la cantidad inicial del antibiótico, la profundidad de la capa de agar, la constante de difusión, la concentración a una distancia dada del depósito y el tiempo de difusión. La teoría nos dice que el cuadrado del diámetro de la zona de inhibición es proporcional al logaritmo de la concentración del antibiótico. (21).

Inhibición = I = f (c, g, t, r)

c = concentración de la sustancia

g = grosor de la capa de agar

t = tiempo de predifusión

r = tamaño de la molécula

2. Método turbidimétrico.

Necesita un menor tiempo de incubación, es un método sensible porque detecta muy pequeñas cantidades de antibióticos o de la sustancia de prueba. Se encuentran interferencias cuando hay muestras coloridas o cuando las sustancias se precipitan al contacto con el medio de prueba.

Para realizar las lecturas se necesita un espectrofotómetro.

(21).

3. Método de estrías.

Es un método sencillo con el que se pueden probar varios microorganismos a la vez, para una misma sustancia o antibiótico de referencia. Requiere de una mayor cantidad de la sustancia de prueba o el antibiótico.

C. MICROORGANISMOS.

En este estudio se utilizaron tres microorganismos.

Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Candida albicans.

Staphylococcus aureus. - Los estafilococos son cocos Gram positivos, que crecen agrupándose en racimos (griego staphyle "racimo de uvas").

Son células esféricas de alrededor de una - dos micras de diámetro, dispuestas en racimos irregulares. No forman esporas.

Los estafilococos crecen con facilidad en la mayoría de los medios bacteriológicos en condiciones de aerobiosis o microaerofilia. Se desarrollan más rápidamente a 37⁰C, pero forman mejor su pigmento a la temperatura ambiente (20⁰C). Las colonias en medios sólidos son redondas, lisas, elevadas, brillantes y forman diversos pigmentos, el de Staphylococcus aureus es amarillo intenso.

Estos microorganismos son relativamente resistentes a la desección, al calor (soportando temperaturas de 50⁰C durante 30 minutos), y al cloruro sódico al 10 - 15%.

Los estafilococos contienen tanto polisacáridos como proteínas antigénicas que permiten hasta cierto punto un agrupamiento de las cepas. Los ácidos teicoicos (polímeros del glicerol o de fosfato de ribitol), eslabonados al péptido glucano de la pared celular, pueden ser antigénicos.

Las infecciones estafilocócicas son a menudo complicaciones de traumas accidentales, heridas quirúrgicas, quemaduras, y otras lesiones de la piel y de enfermedades crónicas, como el cáncer, la diabetes mellitus y la cirrosis hepática.

La supuración es la característica de la enfermedad. Cuando consigue penetrar los tejidos profundos causa necrosis y eventualmente, provoca la formación de abscesos.

Los estafilococos pueden producir enfermedad tanto por su capacidad de multiplicarse y diseminarse ampliamente en los tejidos, como por la producción de diversas sustancias extracelulares. Entre estas últimas se encuentran las siguientes: exotoxina, leucocidina, enterotoxina, coagulasa y hialuronidasa. (18).

Escherichia coli. - Es un bacilo Gram negativo relativamente pequeño, mide de 2 - 3 micras de longitud y de 0.4 - 0.6 micras de anchura. Es móvil y posee flagelos peritricos, posee además fimbrias o pili.

Cuando crece en medio líquido produce un enturbiamiento difuso, pero si se desarrolla en condiciones subóptimas, puede formar largas cadenas filamentosas y originar un crecimiento regular. En agar, las colonias de cepas lisas son brillantes, convexas e incoloras; las colonias rugosas determinan la formación de colonias mates. Las variantes capsuladas producen colonias mucoides, en especial cuando se incuban a bajas temperaturas y crecen en un medio pobre en nitrógeno y fósforo pero rico en carbohidratos, en medios sólidos despiden un olor fétido característico.

Se han identificado más de 145 antígenos O de Escherichia coli diferentes. Además, se han descrito aproximadamente 50 antígenos H y más de 80 antígenos capsulares K diferentes.

Las enfermedades causadas mas frecuentemente por este microorganismo son las infecciones de las vías urinarias. (8).

Candida albicans. - Es un hongo levaduriforme oval y gemanante que produce pseudomicelio tanto en los cultivos como en los tejidos

y los exudados. Aparece como una levadura Gram positiva oval y gemante que mide de 2 - 3 x 4 - 6 micras, y también en forma de células alargadas formando hifas Gram positivas. En medio de Sabouraud glucosa do incubado a la temperatura de laboratorio, se desarrollan colonias blandas, color crema, que tienen olor a levadura. El crecimiento superficial está formado por células ovales y gemantes, en tanto que el crecimiento sumergido está formado por pseudomicelio, el cual está compuesto de células largas adheridas unas a otras.

Candida albicans fermenta la glucosa y la maltosa produciendo ácido y gas; produce ácido de la sacarosa y no ataca a la lactosa.

Es miembro de la flora normal de las mucosas de los aparatos respiratorio, digestivo y genital femenino. En estas y otras localizaciones puede llegar a tener preponderancia y estar asociada a condiciones patógenas. A veces produce infección general progresiva en pacientes debilitados o con supresión inmunitaria. (18).

D. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LACTONAS SESQUITERPÉNICAS.

De las lactonas sesquiterpénicas estudiadas, se ha visto que algunas poseen actividad carcinogénica (16), citotóxica (35), actividad antitumoral (26), producen dermatitis alérgica de contacto y toxicidad al ganado. Otras propiedades que se les atribuyen son irritación de la piel, acción estornutativa, antibacteriana, así como actividad vermífuga e insecticida. Se ha descrito también su uso como veneno

para peces, fármaco vigorizante y estomacal y como remedio para numerosos padecimientos. (42).

La reacción de las lactonas - insaturadas con tioles, se cree que tiene un papel clave en varios fenómenos biológicos reguladores del crecimiento. (24). Los estudios espectrofotométricos y colorimétricos mostraron que tiene lugar una reacción directa irreversible entre la lactona y el grupo tiol, el efecto ejercido es sobre la proliferación celular principalmente a través de su reactividad con grupos sulfhidrilo esenciales para la función enzimática. Estudios similares de lactonas - insaturadas que son antibióticos, permiten proponer algo similar en lo concerniente a su modo de acción. Algunos investigadores como Kupchan y colaboradores (24), encuentran que el aumento de reactividad de las lactonas sesquiterpénicas con metilenos exocíclicos puede encontrar explicación en varios factores. El carbono terminal de un grupo metileno exocíclico debería tener un menor requerimiento estérico que el correspondiente carbono de alguno de los compuestos endocíclicos. Los efectos inductivos de los sustituyentes alquílicos se esperaría que disminuirían el carácter electrofílico del carbono y así disminuiría la reactividad de los compuestos endocíclicos hacia el ataque nucleofílico.

E. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE QUINONAS.

En estudios realizados con la 2.6 dimetoxiquinona se observó la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Además,

se vió que la actividad del compuesto disminuía al cambiar los grupos - OCH_3 por - OH . (38).

La p-benzoquinona y la toluquinona mostraron ser tóxicas contra los espermatozoides de cuyo, estos estudios fueron realizados en 1932. (14).

Dos quinonas la 2,3 dihidroxi - 3 - undecil - 1,4 - benzoquinona y la 2,5 - dihidroxi - 3 - tridenil - 1,4 - benzoquinona aisladas de granos de Embelia ribes y de Rapanea maximowiczii respectivamente, presentaron actividad antihelmíntica. (38).

Se ha observado que el ácido filicínic que es un complejo quinónico encontrado en el helecho macho (Aspidium) Dryopteris filixmas, también posee propiedades antihelmínticas. (38).

En la agricultura se usan quinonas como la tetra cloro - p-benzoquinona para evitar el deterioro de las semillas. La 2,3 - dicloro - 1,4 - naftoquinona se usa como protección de semillas y como pulverizador para evitar enfermedades de las hojas. (6).

Se ha visto que sustituyendo los halógenos en los anillos de quinona su actividad fungicida puede mejorar. (6).

Algunas benzoquinas poseen actividad antineoplásica contra tumores en el hombre y animales y además ha sido demostrado que es fuerte inhibidor de la síntesis de ácidos nucleicos. (1).

F. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE FLAVONAS.

Existen numerosos estudios sobre los efectos biológicos de los flavonoides desde 1944 ya que antes de este año las investigaciones

realizadas fueron pocas. Estos estudios han sido efectuados en tejidos animales y de plantas.

Entre las actividades biológicas reportadas se encuentran las siguientes: bactericida (11), antihelmánticas (44), antivirales (16), inhibidores de antibióticos y bacteriostáticos (30), algunos otros flavonoides tienen efectos de inhibición (39) o de activación de enzimas, otros presentan toxicidad para los peces (30), también hay estimulantes o depresores de la actividad cardíaca (19). Se les han observado efectos diuréticos (11), efectos protectores de los islotes de Langerhans (44), así como actividad hipotensora e hipertensora.

Los sustituyentes OCH_3 y $-\text{OH}$ son de gran importancia en la actividad de los compuestos flavonoides, ya que pueden conferir efectos contrarios a un mismo tipo de compuesto, por ejemplo, al realizar estudios sobre toxicidad en peces usando flavonas y flavononas, se vió que los derivados $-\text{OCH}_3$ de flavonas eran más tóxicos que los derivados $-\text{OCH}_3$ de flavononas y que en los derivados OH de ambos, los efectos eran contrarios. (44).

Se ha observado también que la actividad puede verse afectada por una misma sustitución en diferentes posiciones.

G. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE COMPUESTOS

ORGANO - METÁLICOS.

El mercurio y sus componentes han sido usados desde hace mucho tiempo en el tratamiento de varias enfermedades. Los compuestos inorgánicos de mercurio se han usado oralmente, aunque su uso es

tá restringido ya que causan disturbios gastrointestinales y otras manifestaciones tóxicas como neumonía, fiebre, tos, dolor torácico, cianosis y hemorragia.

Los compuestos orgánicos de mercurio se han usado como desinfectantes y antisépticos. (12).

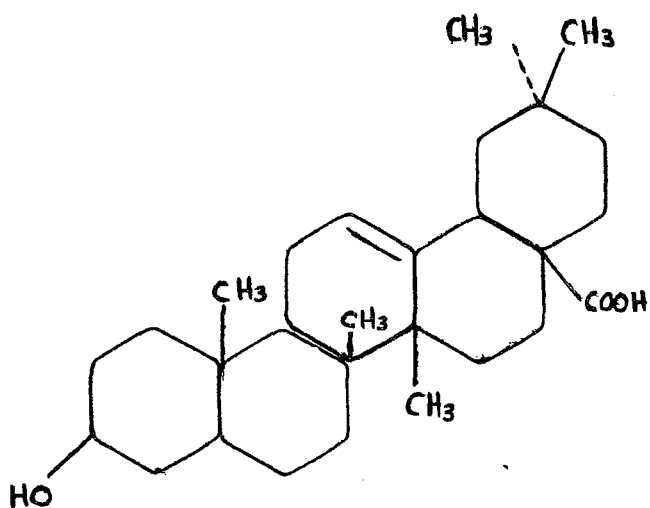
El mercurio forma fácilmente enlaces covalentes con el azufre, propiedad que explica la mayor parte de las propiedades biológicas del metal. Al encontrarse el azufre en forma de grupos sulfihídricos, el mercurio divalente sustituye al hidrógeno para formar mercáptidos del tipo $X\text{-Hg-SR}$ y $\text{Hg}(\text{SR})_2$, en donde X es el radical electronegativo y R la proteína. Los mercuriales, inactivan las enzimas con grupos sulfhidrilo y alteran el metabolismo y funcionamiento de las células. El mercurio se combina también con los grupos fosforilo, carboxilo, amido, amino.

Las variadas acciones terapéuticas de los mercuriales, están ligadas a los cambios en la configuración química de los compuestos que contienen mercurio, que afectan la solubilidad, la disociación y la afinidad relativa para diversos receptores celulares. (45).

Las sales de cinc son astringentes, corrosivas y debilmente antisépticas. Su acción bactericida probablemente se deba a la facultad del ion cinc de precipitar las proteínas, pero pueden también afectar otros factores en su efecto sobre las bacterias. (12).

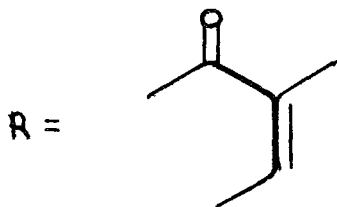
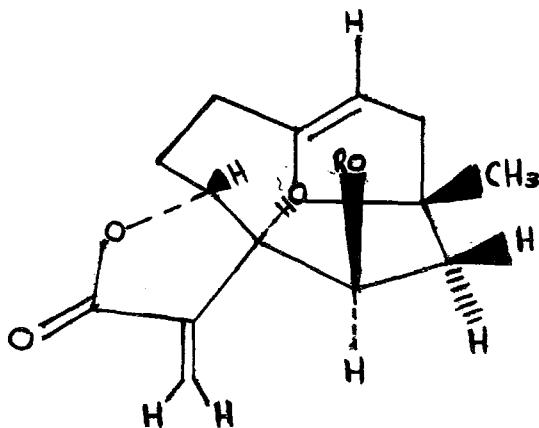
Las sales de cobre son astringentes, germicidas y fungici-

das. Los efectos del cobre como bactericida no son muy notables. Las sales solubles son bacteriostáticas en diluciones relativamente altas. (12).

H. SUSTANCIAS PROBADAS.*Acido Oleanólico*

Proviene del extracto de la planta Olea europea. (33).

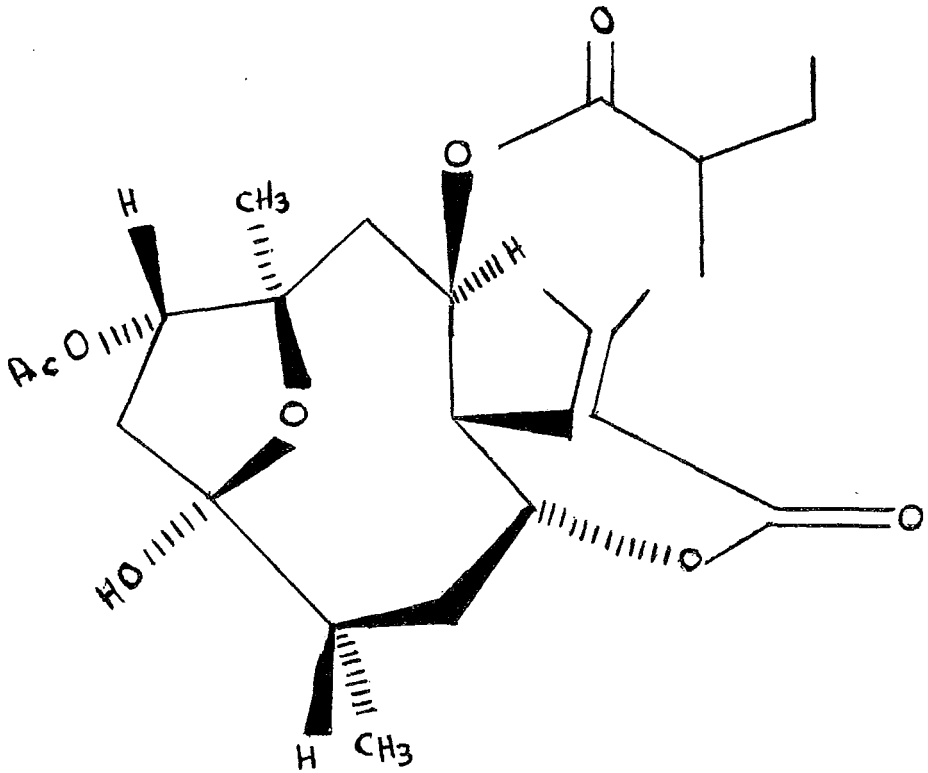
*A esta planta se le ha atribuido popularmente
uso como: antipirético. (9).*



Budleina A

Proviene del extracto etanólico de la planta de Viguiera budleiaeformis (35).

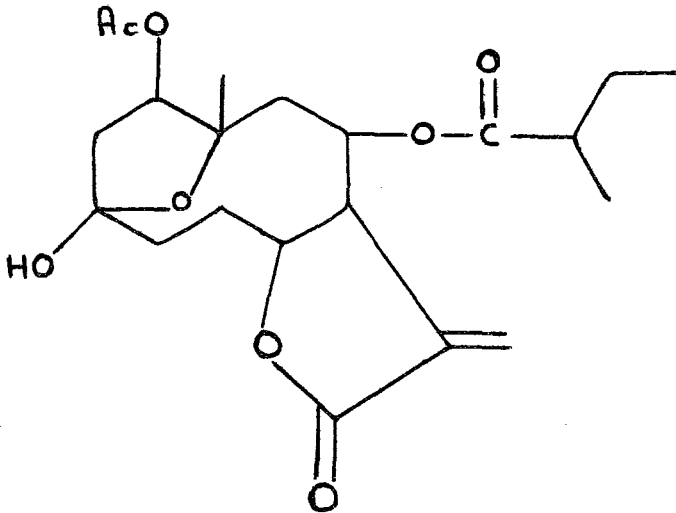
Se ha encontrado que plantas del mismo género pero con diferente especie como la Viguiera excelsa se les atribuye popularmente las propiedades siguientes: anti disentérico, expectorante, vulnerario (para la curación de las heridas) (9).



Cumanina

Proviene del extracto clorofórmico de la planta Ambrosia cumanensis (38).

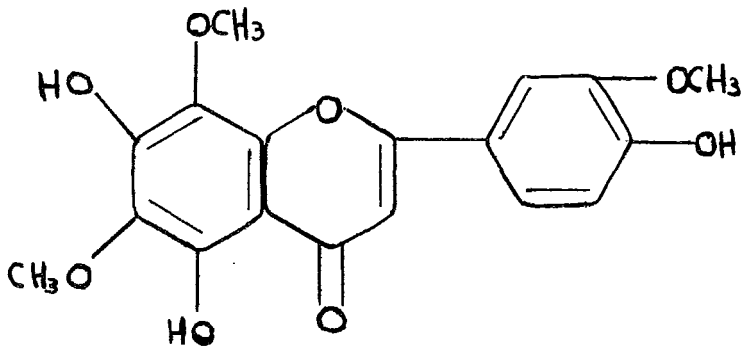
Se ha encontrado que a plantas del mismo género pero de diferente especie como la Ambrosia artemisiaefolia se les atribuye popularmente las propiedades siguientes: antiparasitario, antipirético, como agente que favorece la digestión (9).



Acetato de Viguelenina

Proviene del extracto metanólico de la planta Viguiera linearis (32).

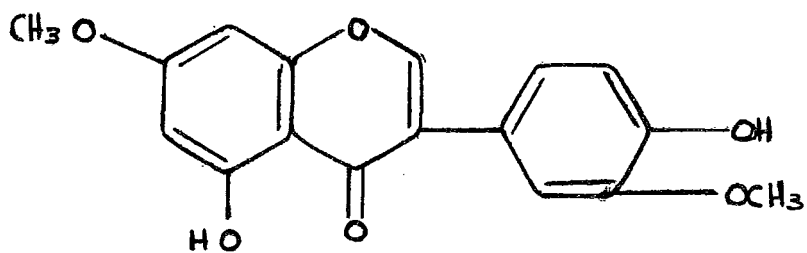
Se ha encontrado que a plantas del mismo género pero de diferente especie como la Viguiera excelsa se les atribuye popularmente las propiedades siguientes: anti disentérico, expectorante, vulnerario (para la cura-ción de las heridas) (9).



Acerosina

Proviene del extracto metanólico de la planta de Thitonia pedunculata (28).

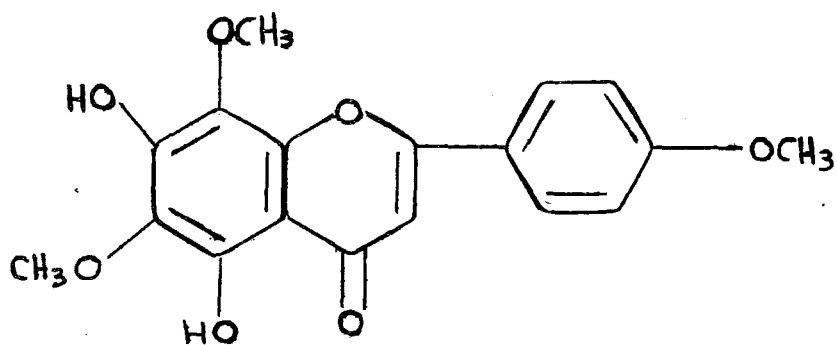
No disponemos de la información acerca del uso popular de esta planta.



Fetiontivilina

Proviene del extracto etanólico de la planta de Simsia foetida (32).

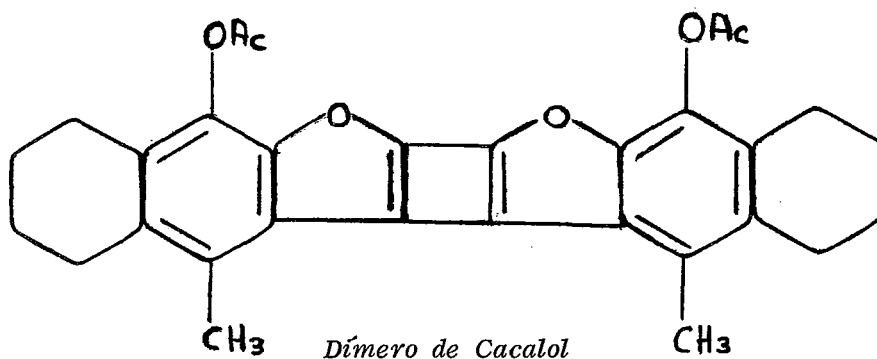
No disponemos de la información acerca del uso popular de esta planta.



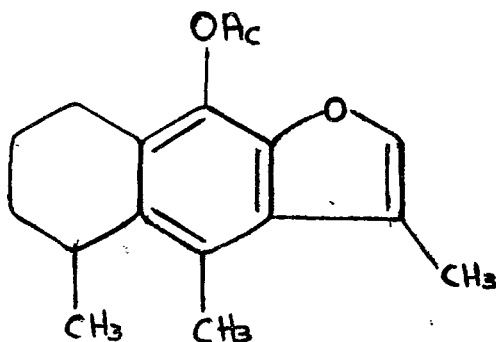
Nevadesina

Proviene del extracto metanólico de la planta de Thitonia pedunculata (28).

No disponemos de la información acerca del uso popular de esta planta.

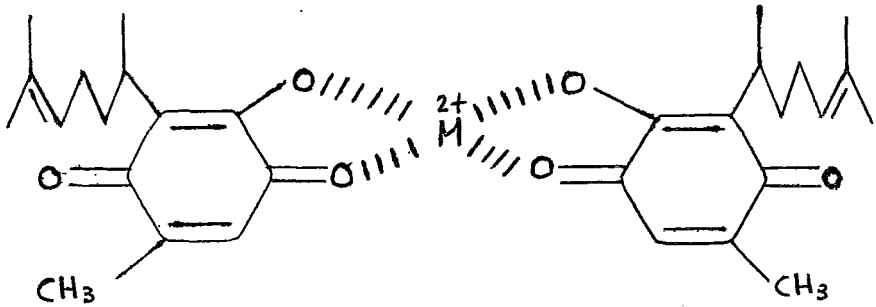


Se obtiene a partir del Acetato de Cacalol. Comunicación personal
(M. Jiménez).



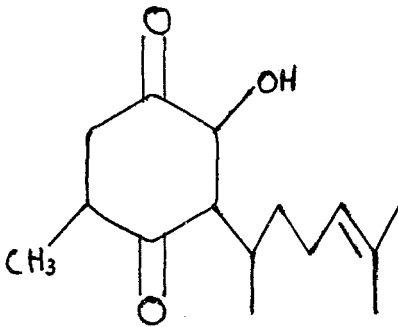
Proviene del extracto hexánico acetilado de la planta Cacalia decompositae.
(37).

A esta planta se le han atribuido popularmente las propiedades siguientes:
antidiabético, antidiarréico, antidisentérico, antineurálgico, antirreumá-
tico, antiséptico, astringente, catártico, vulnerario (para la curación de
las heridas). (9).



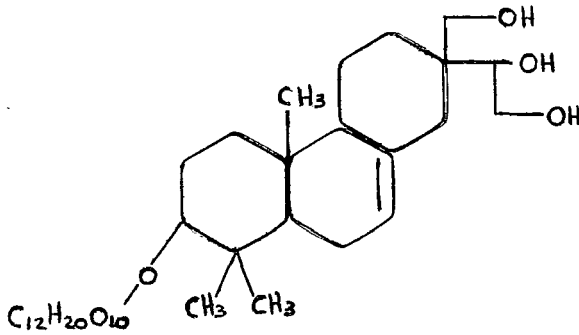
Perezónido metálico

M = Zn, Hg, Cu, Co, Ni, Cd. Comunicación personal (M. González)

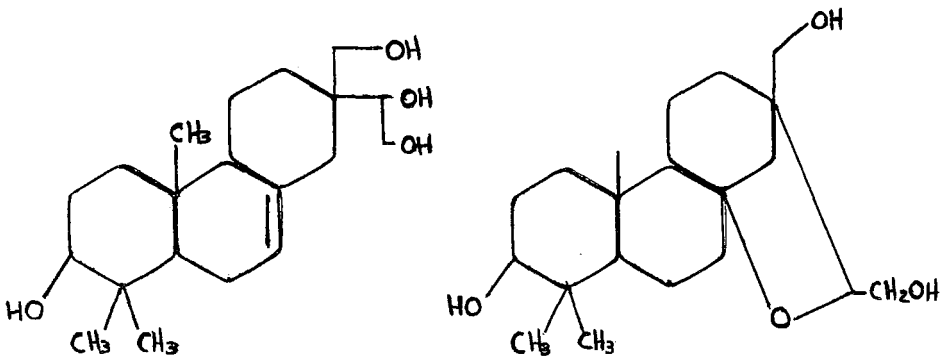


Perezona

Proviene del extracto hexánico de la planta Perezia cuernavacana (10). A esta planta se le han atribuido popularmente las propiedades siguientes: antipirético, astringente, catártico, cicatrizante y regenerativo, diurético, emético, expectorante, analgésico, contra hemorroides y tabardillo (variedad mexicana de tifus exantemático). (9).



Piquerina



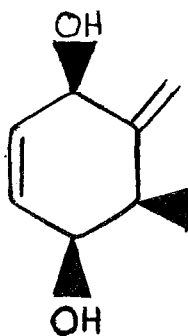
Trinervina

Isotrinervina

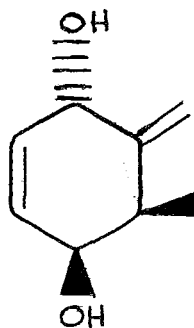
La Piquerina proviene del extracto etanólico de la planta Piqueria trinervia, la Trinervina de la fermentación y del extracto cloro-fórmico de la Piqueria trinervia y la Isotrinervina proviene de la acidificación de la Trinervina (36).

A esta planta se le han atribuido popularmente las propiedades si-

güentes: antitérmico, emético, contra bronquitis, cálculos de la vesícula, enfermedades exantemáticas, fiebre tifoidea, tífus exán_{temático}. (9).



Piquerol A



Piquerol B

El Piquerol A y el Piquerol B provienen de un extracto etanólico de la planta Piqueria trinervia, recolectada en San Angel y en Atlocomulco, Edo. de México. (36).

A esta planta se le han atribuido popularmente las propiedades siguientes: antipalúdico, antipirético, antirreumático, emético, contra bronquitis, cálculos de la vesícula, fiebre tifoidea, tifus exantemático. (9).

PARTE EXPERIMENTAL.

Para efectuar el trabajo experimental fue necesario estudiar los factores que afectaban de alguna manera la realización del método con este fin se analizaron los siguientes: tiempo de preincubación, tiempo de incubación, efecto de disolventes y concentración del inóculo. Además, se realizó un análisis estadístico para determinar la reproducibilidad del método. De acuerdo a las condiciones encontradas se procedió a la determinación cualitativa de la actividad de las sustancias de prueba. Después se determinó la concentración mínima inhibitoria CIM tanto a las sustancias que resultaron activas, como a los antibióticos de referencia.

Se utilizaron 3 microorganismos:

- a) Escherichia coli "O" 126
- b) Staphylococcus aureus
- c) Candida albicans

Todos en cultivos de 24 horas. Los cultivos fueron otorgados por el cepario de la Facultad de Química.

Los antibióticos utilizados como referencia fueron:

- a) Ampicilina anhidra. 102%. Laboratorios Fermic, S. A.
- b) Sulfato de gentamicina. 630 mcg/mg. Laboratorios Fermic, S. A.
- c) Nistatina. 5537 U/mg. Laboratorios Merck.

Los medios de cultivo fueron:

- a) Agar de Dextrosa de Sabouraud para Candida albicans

b) *Agar de Mueller - Hinton para Staphylococcus aureus y Escherichia coli.*

Los disolventes fueron:

DMSO = Dimetil sulfoxido. Para síntesis. Merck.

DMF = N, N, - Demtilfomamida. Para síntesis. Merck.

Redestilado a 580 mm Hg.

Espectrofotómetro. Varian Techtron series 634.

Incubadora. J. M. Ortiz.

Discos de papel filtro de 1.701 cm de diámetro. Los discos se hicieron con un sacabocados de 17 mm de diámetro adaptado a un taladro de banco, usando papel de filtración rápida con un grosor de 0.2 mm.

El estudio se dividió en dos partes:

1) Cualitativa.

2) Cuantitativa.

1) Determinación Cualitativa.

Se vierten en las cajas de Petri 15 ml del medio de cultivo y se deja solidificar a temperatura ambiente. Después se inoculan las cajas con 0.1 ml de una suspensión de microorganismos extendiéndola uniformemente con un hisopo sobre la superficie del agar.

Se colocan en cada caja cuatro discos de papel con 0.06 ml de una solución del antibiótico de referencia o de la sustancia de prueba. Se usaron de ampicilina y de sulfato de gentamicina 10 microorganismos por disco, de nistatina fueron 39.8 unidades.

Las sustancias de prueba se usaron en concentración de 2 mg/ml.

Las placas se preincubaban a 4°C por 60 minutos, después se incubaban a 28°C y 37°C según el microorganismos de que se trate.

Al finalizar el tiempo de incubación se mide el diámetro del halo de inhibición. Cada prueba se realiza por triplicado.

Tomando esta técnica como base se estudiaron los siguientes factores.

Efecto de la Concentración del Inóculo.

La concentración de la suspensión del microorganismo se ajusta con solución salina isotónica a 17%, 30% 50% de transmitancia a una longitud de onda de 580 nm. (41).

Siguiendo la técnica anterior se inoculan las cajas de Petri con estas suspensiones preincubando por una hora. El tiempo de incubación fue de 21 horas. Los resultados de esta prueba se observan en la tabla 2, página 36.

Influencia de los Disolventes.

La concentración de la suspensión del microorganismo se ajusta entre 20% y 30% de transmitancia.

Los disolventes usados fueron: DMF, DMSO, agua destilada. Para estudiar su efecto se colocan en las cajas de Petri discos con 0.06 ml de cada disolvente. El tiempo de preincubación fue de 60 minutos, la incubación de las cajas se hace por 21 horas. Los resultados de esta prueba se observan en la tabla 1, página 35.

Efecto del Tiempo de Incubación.

Se ajusta la concentración de la suspensión del microorganismo

entre 20% y 30% de transmitancia. Se preincuban las cajas por 60 minutos, se incuban las cajas por: 16, 18, 21, 24 horas. Los resultados de esta prueba se observan en la tabla 3, página 37.

2) Determinación Cuantitativa.

Concentración Mínima Inhibitoria.

Para determinar el rango en el que se encontraba la concentración mínima inhibitoria de las sustancias estudiadas, se utilizan tres concentraciones: 200, 150, 100 microgramos por mililitro, para ampicilina y sulfato de gentamicina se usaron 1, 3, 6, 9, 12, 20, 30, 40, 50 microgramos por mililitro, para nistatina se utilizaron 5, 20, 40 unidades por mililitro.

Se colocan las cajas de Petri con el antibiótico de referencia o la sustancia de prueba incorporando después el medio de cultivo a una temperatura de 45°C y se deja solidificar.

Sobre las placas preparadas de esta manera se deposita 0.1 mililitro del microorganismo ajustando su concentración entre 20% y 30% de transmitancia con solución salina isotónica, el inóculo se extiende uniformemente sobre la superficie del agar con un hisopo.

Se inoculan las placas a 28°C ó a 37°C según el microorganismo de que se trate por 21 horas. La lectura de las cajas se efectúa al término de este tiempo.

Todas las pruebas se realizan por triplicado. Se hicieron testigos de crecimiento del microorganismo así como testigos con el disolvente solo.

Conociendo el rango en el que se encuentra la concentración mínima inhibitoria se procede a una determinación más precisa de ella, siguiendo el mismo procedimiento pero usando concentraciones que estén dentro de un rango menor.

Los resultados de esta prueba para los antibióticos se encuentran en las tablas 8, 9, páginas 42, 43.

Los resultados obtenidos para las sustancias activas se observan en las tablas 8, 9, páginas 42, 43.

T A B L A 1

*Influencia del Disolvente**Inhibición del crecimiento promedio en cm*

	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>DMF</i>	-	-	-
<i>DMSO</i>	-	-	-
<i>Agua</i>	-	-	-
<i>Gentamicina - Agua</i>	*	4.3	*
<i>Gentamicina - DMF</i>	*	3.3	*
<i>Ampicilina - Agua</i>	3.86	*	*
<i>Ampicilina - DMF</i>	3.30	*	*
<i>Nistatina - DMSO</i>	*	*	3.52

(-) *No inhibió el crecimiento*

(*) *No se probó*

T A B L A 2

Efecto de la Concentración del Inóculo

	<i>17% Transmitancia</i>	<i>30% Transmitancia</i>	<i>50% Transmitancia</i>
<u><i>Staphylococcus aureus</i></u>	+++	++	+
<u><i>Escherichia coli</i></u>	+++	++	+
<u><i>Candida albicans</i></u>	+++	++	+

(+++) *Crecimiento abundante*

(++) *Crecimiento regular*

(+) *Crecimiento escaso*

T A B L A 3

Influencia en el Tiempo de Incubación

	<i>16 Horas</i>	<i>18 Horas</i>	<i>21 Horas</i>	<i>24 Horas</i>
<i><u>Staphylococcus aureus</u></i>	<i>††</i>	<i>††</i>	<i>††</i>	<i>††</i>
<i><u>Escherichia coli</u></i>	<i>††</i>	<i>††</i>	<i>††</i>	<i>††</i>
<i><u>Candida albicans</u></i>	<i>††</i>	<i>††</i>	<i>††</i>	<i>††</i>

(††) Crecimiento regular

T A B L A 4

Reproducibilidad del Método

	<u>Staphylococcus aureus</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>Candida albicans</u>
	<i>(Inhibición en cm)</i>		
Agua	-	-	-
DMF (a)	-	-	-
DMSO (b)	-	-	-
Papel	-	-	-
Ampicilina - H ₂ O (c)	2.95	*	*
Gentamicina - H ₂ O (d)	*	1.27	*
Nistatina - DMSO (e)	*	*	1.97

(*) No se probó

(-) No creció

(a) N, N, Dimetil formamida

(b) Dimetil sulfóxido

(c) Concentración 10 µg/ml

(d) Concentración 10 µg/ml

(e) Concentración 33.3 U/ml

T A B L A 5

Análisis Estadístico del Método (7)

	$\bar{X} \pm Z_{0.025}$	σ	$\% \sigma$
<u>Staphylococcus aureus</u>	2.959 ± 0.048	0.054	1.82
<u>Escherichia coli</u>	1.279 ± 0.073	0.083	6.48
<u>Candida albicans</u>	1.979 ± 0.073	0.083	4.19

$$\text{Media} = \bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i \quad (\text{expresada en cm})$$

$$\text{Desviación estandar} = \sigma = \left[\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \right]^{1/2}$$

$$\% \text{ Desviación estandar} = \% \sigma = \frac{\sigma}{\bar{X}} (100)$$

T A B L A 6

(Inhibición Promedio en mm)

S U S T A N C I A	<u>Staphylococcus aureus</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>Candida albicans</u>
<i>Budleina A</i>	13.6	--	--
<i>Fetiontivina</i>	--	--	--
<i>Acido Oleanólico</i>	--	--	--
<i>Acetato de Viguelenina</i>	--	--	--
<i>Piquerol A</i>	--	--	--
<i>Dímero de Cacalol</i>	--	--	--
<i>Acetato de Cacalol</i>	--	--	--
<i>Piquerol B</i>	--	--	--
<i>Isotrinervina</i>	--	--	--
<i>Cumanina</i>	--	--	--
<i>Trinervina</i>	--	--	--
<i>Acerosina</i>	--	--	--
<i>Perezona</i>	20.6	--	--
<i>Perezónido de Zinc</i>	16.6	--	--
<i>Perezónido de Mercurio</i>	20.6	12.6	9.2
<i>Perezónido de Cobre R. E. 1</i>	--	--	--

T A B L A 7

(Inhibición Promedio en mm)

S U S T A N C I A	<u>Staphylococcus aureus</u>	<u>Escherichia coli</u>	<u>Candida albicans</u>
<i>Perezónido de cobre R.E. 2</i>	18.6	- -	- -
<i>Anilido de Perezona</i>	6.6	- -	- -
<i>Perezónido de Cobalto R.E. 2</i>	11.2	- -	- -
<i>Perezónido de Níquel R.E. 1</i>	14.6	- -	- -
<i>Perezónido de Níquel R.E. 2</i>	17.2	- -	14.6
<i>Perezónido de Cobalto R.E. 1</i>	13.2	- -	- -
<i>Perezónido de Cadmio</i>	- -	- -	- -
<i>Nevadesina</i>	- -	- -	- -
<i>Piquerina</i>	- -	- -	- -

R.E. 1 y R.E. 2, se investiga actualmente la estructura de estos compuestos.

T A B L A 8

*Sustancias activas**Concentración Mínima Inhibitoria*

<i>Microorganismo</i>	<i>Sustancia</i>	<i>Concentración µg/ml</i>	<i>Rango de Prueba µg/ml</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Budleina A</i>	60	200 - 10
<i>S. aureus</i>	<i>Perezona</i>	15	200 - 10
<i>S. aureus</i>	<i>Perezónido de Mercurio</i>	50	200 - 10
<i>S. aureus</i>	<i>Perezónido de Cobre</i>	50	200 - 10
<i>S. aureus</i>	<i>Perezónido de Zinc</i>	Por abajo de 100	200 - 100
<i>S. aureus</i>	<i>Perezónido de Cobalto</i>	Por abajo de 100	200 - 100
<i>S. aureus</i>	<i>Anilido de Perezona</i>	Por abajo de 100	200 - 100
<i>S. aureus</i>	<i>Ampicilina</i>	9	50 - 1
<i>S. aureus</i>	<i>Acetato de Mercurio</i>	70	200 - 10

T A B L A 9

*Sustancias activas**Concentración Mínima Inhibitoria*

<i>Microorganismo</i>	<i>Sustancia</i>	<i>Concentración g/ml</i>	<i>Rango de Prueba g/ml</i>
<i><u>E. coli</u></i>	<i>Perezónido de Mercurio</i>	70	200 - 10
<i><u>E. coli</u></i>	<i>Acetato de Mercurio</i>	50	200 - 10
<i><u>E. coli</u></i>	<i>Gentamicina</i>	3	50 - 1
<i><u>C. albicans</u></i>	<i>Perezónido de Mercurio</i>	<i>Por abajo de 100</i>	200 - 100
<i><u>C. albicans</u></i>	<i>Acetato de Mercurio</i>	50	200 - 10
<i><u>C. albicans</u></i>	<i>Nistatina</i>		

RESULTADOS Y DISCUSION.

De los resultados obtenidos, se observa en la tabla 1 que los disolventes usados no presentan ninguna actividad contra los microorganismos, ésto es de gran importancia ya que permite probar sustancias que no son solubles en agua sin peligro de que se obtengan respuestas falsas positivas.

En esta tabla se observa que algunas pruebas no se realizaron, ésto se debió a que los antibióticos que se usaron eran selectivos para cada microorganismo por lo que no se probaba un antibiótico contra los tres microorganismos.

Para la realización del método es necesario contar con una adecuada concentración del microorganismo ya que si hay una concentración elevada se presenta un crecimiento masivo que puede afectar los resultados obtenidos, dándonos halos más pequeños; por el contrario, si se tiene una concentración baja el desarrollo será escaso y los halos obtenidos serán mayores, ésto se presentaría porque hay muy pocos microorganismos y no se debería a un efecto de las sustancias. Por todo lo anterior los rangos de concentración no deben ser muy amplios para que no se presente mucha variación; el rango escogido fue entre 20 y 30% en el cual el crecimiento que se presentaba da buenos resultados en las pruebas. Estos resultados se pueden ver en la tabla 2.

Con respecto al tiempo de predifusión, se escogió un tiempo

de 60 minutos a 40°C, se eligió éste por lo recomendado en la literatura (20, 42), además de que se tenían muchos problemas de horario con la incubadora.

En lo referente al tiempo de incubación los resultados se observan en la tabla 3, no se observa ninguna diferencia entre 16 y 24 horas, se escogió un tiempo de 21 horas, ésto debido a la facilidad de horario de la incubadora.

Utilizando las fórmulas que se observan en la tabla 5, se realizó un pequeño análisis estadístico del método, con el fin de determinar la reproducibilidad del método, por este análisis se determinó que el método es de una reproducibilidad adecuada.

Los datos utilizados en este análisis se presentan en la tabla 4, los antibióticos aquí no se probaron contra microorganismos ya que eran selectivos para cada microorganismo.

En las tablas 6 y 7 se presenta un estudio cualitativo de todas las sustancias utilizadas.

El método escogido para determinar la concentración mínima inhibitoria fue diferente al que se usó para la determinación cualitativa de las sustancias. En el método de los discos de papel se presenta una concentración muy grande cerca del disco y la concentración va disminuyendo al alejarse de él debido a un fenómeno de difusión, por lo que la concentración no es uniforme en toda la placa. En cambio al incorporar el antibiótico al medio se tiene una concentración uniforme en toda la placa, por lo anterior se eligió este método y no es de los discos de papel.

CONCLUSIONES.

1. *El método descrito antes para el estudio de la actividad biológica de las sustancias es, por su sencillez, adaptable a un laboratorio de productos naturales.*
2. *Se encontraron dos disolventes, el dimetil sulfóxido y la dimetil formamida que no presentan actividad antimicrobiana, esto es importante ya que muchas de las sustancias son insolubles en agua y es importante contar con disolventes que no intervengan en la prueba.*
3. *De las 24 sustancias probadas, 7 resultaron activas, éstas son: Budleina A, Perezona, Perezónido de Mercurio, Perezónido de Zinc, Perezónido de Cobre, Anilido de Perezona, Perezónido de Cobalto. Solo el Perezónido de Mercurio fue activo contra los 3 microorganismos: Staphylococcus aureus, Escherichia coli y Candida albicans. Todas las demás sustancias solo fueron activas contra Staphylococcus aureus.*
4. *La Perezona es un compuesto más activo que sus derivados metálicos, por lo que se debe poner una mayor atención en este compuesto.*
5. *Los Perezónidos metálicos que fueron activos creemos que se debió a la toxicidad de los iones de estos metales como el mercurio.*

6. *Las sustancias activas, en este caso la Budleina A, Perezona y el Anilido de la Perezona presentan un campo abierto a la investigación, pudiéndose probar frente a otros microorganismos, así como también hacer modificaciones a las moléculas para obtener derivados y después determinar su toxicidad.*

B I B L I O G R A F I A .

- 1) Ai Jeng Lin, Potencial Bioreductiva Alkylating Agent 1. Benzo-quinone Derivates, *J. Med. Chem.*, 15, 1247. (1972).
- 2) Ayala Villafuerte F., Compadre Reyes C. M., Nivon Bolan C. A., La Farmacognosia y el Químico Farmacéutico, Tesis de Licenciatura UNAM, (1976).
- 3) Barry et. al., An Improved Single - Disk Method for Testing the Antibiotic Suceptibility of Rapidly Growing Pathogens, *Am. J. Clin. Patholog.*, 53, 149, (1970).
- 4) Bauer et. al., Antibiotic Suceptibility Testing by Standardized of Single Disk Method, *Am. J. Clin. Pahtol.*, 45, 493, (1965).
- 5) Bhakuni et. al., Screening of Chilean Plants for Antimicrobial Activity, *Lloydia*, 37, 621, (1974).
- 6) Burchfield H. P., George L., Mc New Quinonas, Enciclopedia de Química. George L. Clarck (Editor), pags. 1162 - 1163.
- 7) Crow E. et. al., Statistics Manual, Dover Publications, Inc., New York 1960, pags. 10, 12, 18, 43.
- 8) Davis et. al., Tratado de Microbiología, Salvat Editores, S. A., México 1976, pags. 307, 308, 744, 745, 751, 787, 1015.

- 9) *Diaz J. L., Usos de las Plantas Medicinales de México, Monografías Científicas II, IMEPLAM.*
- 10) *Domínguez X, Método de Investigación Fitoquímica, Editorial Limusa, México 1973, pag. 164.*
- 11) *Fukuda T., The Pharmacological Effects of Flavone Groups, C. A., 26, 3298.*
- 12) *Goodman L., y Gilman A., Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Editorial Interamericana, México 1974, pags. 802, 803, 867.*
- 13) *Greulach A Víctor, Las Plantas. Introducción a la Botánica Moderna, México/Buenos Aires 1970, pag. 26.*
- 14) *Gulland M. J., IV. The Spermicidal Activity of Quinones and Quinols, Biochem. J., 26, 32, (1932).*
- 15) *Herz W., Watanabe H., Miyazaki M., and Kishida., The Structures of Phartenin and Ambrosin, J. Am. Chem. Soc., (1962).*
- 16) *Hufford et. al., Two Antimicrobial Alkaloids from Heartwood of Liriodendron tulipifera L., J. Pharm. Sci., 64, 789, (1975).*
- 17) *Jones J. B., J. M. Young, Carcinogenicity of Lactones. IV. Alkylation of Analogues of DNA Guanine Groups such as*

- Imidazole, and Guanosine by α, β - Unsaturated Acids *Can J.*
48, 1566 (1970).
- 18) Jawetz E., Manual de Microbiología Médica, Editorial El Manual Moderno, S. A., México 1975, *pages*. 198, 199, 309, 310.
- 19) Jeney A. V. and Czimmer A. G., The Effect of Rhamnetin and Hesperetin on the Frog Heart. The Relationship between the Structure and the Mode of Action of Flavones and Flavonones, *C. A.*, 33, 7380.
- 20) Kavanagh F. N. Microbial Diffusion Assay I: Operations Studies with Cooper Equation, *J. Pharm. Sci.*, 63, 1459, (1974).
- 21) Kavanagh F., Microbial Diffusion Assay II: Design and Applications, *J. Pharm. Sci.*, 64, 1224, (1975).
- 22) Kersey R. C. and Fink F. C., Microbiological Assay of Antibiotics Methods of Biochemical Analysis, 1,53 Edited by David Glick, Interscience Publishers Inc., New York 14th printing 1967.
- 23) Kupchan S. M., Giacobe T. J., Krull I. S., Thomas A. M. Eakin M. A. and Fessler D. C., Reactions of Endocyclic Unsaturated Lactones with Thiols, *J. Org. Chem.*, 35, 3539, (1970).

- 24) Kupchan, Eakin and Thomas, Tumor Inhibitors. 69. Structure - Citotoxicity Relationships among the Sesquiterpene Lactones, J. Med. Chem., 14,1147, (1971).
- 25) Mitscher et al., Antimicrobial Agents from Higher Plant. I. Introduction, Rationale and Methodology, Lloydia, 35,157, (1972).
- 26) Mitscher et. al., Antimicrobial Agents from Higher Plants. The Quaternary Alkaloids of Ptelea trifoliata, Lloydia, 35,109, (1975).
- 27) Mitscher et. al., Antimicrobial Agents from Higher Plants. An Investigation of Hunnemannia fumariaefolia Pseudoalcoholates of Sanguinarine and Chelerytrine, Lloydia, 41,145, (1978).
- 28) Morales Ríos M. Sonia, Nevadensina, Aceroxina y Epoxiachilina Componentes de Plantas Mexicanas, Tesis de Licenciatura UNAM, (1975).
- 29) Naghski J., Copley M. J. and Couch J F., Effect of Flavonols on the Bacteriostatic Action of Dicoumarol, Science, 105,125, (1947).
- 30) Narsimhachari N. and Seshadri T. R., Insecticidal Properties and Chemical Constitution. V. Flavonones and Chalcones, C. A., 42, 564 d.

- 31) N. L. T. R. M. Von Jeney De Bovesjenö et. al., Detection and Thin Layer Chromatography of Sesquiterpene Lactones from Geigeria Species, *J. Chrom.*, 94,255, (1974).
- 32) Ontiveros E, Estructura de la Viguelenina y de la Fetiontivina Una nueva Lactona sesquiterpénica e Isoflavona aisladas de Plantas Compuestas, *Tesis de Maestría UNAM*, (1979).
- 33) Picard W. C. et. al., The Triterpene Resinols and Related Acids, *J. Chem. Soc.*, 1045, (1939).
- 34) Rodney G., Swanson A. L., et. al., The Effect of a Series of Flavonoids on Hyaluronidase and some other Related Enzymes, *J. Biol. Chem.*, 183,739, (1950).
- 35) Romo de Vivar A., Guerrero C., Diaz E., Bratoeff E. A. Jiménez L., The Germacranolides of Vigüiera budleiaeformis Structures of Budlein A and B, *Phytochemistry*, 15,525, (1976).
- 36) Romo J., Romo de Vivar A., Quijano L., Ríos T. y Diaz E., Los Componentes Terpenoides de la Piqueria trinervia Cav., *Revista Latinoamericana de Química*, 1,72, (1970).
- 37) Romo J. et. al., The Constituents of Cacalia Decomposita, *Tetrahedron*, 20,2331, (1969).

- 38) Romo J. et. al., The Structure of Cumanin a Constituent of Ambrosia Cumanensis, Tetrahedron, 22,1499, (1966).
- 39) Sorm F. and Dolejs L. in Lederer E. (Editor), Guaianolides and Germacranolides. Chemistry of Natural Products, Herman, Paris, Holden - Day, San Francisco, 1966, pags. 29, 35, 39, 40, 46.
- 40) Su et. al., Antimicrobial Effects of Aquatic Plants from Minnesota, Lloydia, 36,80, (1973).
- 41) The United States Pharmacopeia XIX, United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1975.
- 42) Veliky and Latta, Antimicrobial Activity of Cultured Plant Cells and Tissues, Lloydia, 37,611, (1974).
- 43) Viesca Treviño C., La Herbolaria en el México Prehispánico Estado Actual del Conocimiento en Plantas Medicinales Mexicanas, Dr. Xavier Lozoya (Editor), IMEPLAM, A. C. pags. 11 - 23, (1976).
- 44) Willaman J. J., Some Biological Effects of the Flavonoids, J. Am. Pharm Assoc., 44,404, (1955).
- 45) Wilson Ch, Gisvold O. and Doerge R., Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 6th edition, J. B.