



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

"DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA Y CITOTOXICA POTENCIAL DE  
EXTRACTOS DERIVADOS DE TREINTA ESPECIES  
VEGETALES UTILIZADAS EN LA MEDICINA  
TRADICIONAL MEXICANA".

TESIS MANCOMUNADA  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A N :  
TOMASA BARRIENTOS BENITEZ  
MARIA TERESA GUTIERREZ LUGO



MEXICO, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1994



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 está 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.

## JURADO ASIGNADO

**PRESIDENTE:** M. en C. ANGELA SOTELO LOPEZ  
**VOCAL** DRA. RACHEL MATA ESSAYAG  
**SECRETARIO** DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA  
**1er.SUPLENTE** M. en C. PERLA CAROLINA CASTAÑEDA LOPEZ  
**2do.SUPLENTE** M. en C. FRANCISCO HERNANDEZ LUIS

### SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

LABORATORIO 124, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, EDIFICIO E Y  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA EXPERIMENTAL EDIFICIO A,  
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.

### SUSTENTANTES:

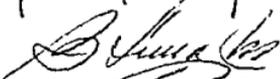


TOMASA BARRIENTOS BENITEZ



MARIA TERESA GUTIERREZ LUGO

  
**ASESOR:** DRA. RACHEL MATA ESSAYAG

  
**ASESOR TECNICO:** Q.F.B. BEATRIZ LUNA MILLAN

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Rachel Mata, por la dirección del presente trabajo.

A la M. en C. Rosa María Ramírez y a la Q.F.B. Beatriz Luna por la asesoría proporcionada y por permitir la realización de las pruebas microbiológicas en el laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por el apoyo brindado en la revisión de esta tesis.

Al Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM y al Dr. Victor Rico del Instituto de Ecología A.C. por proporcionar e identificar parte del material vegetal utilizado en el presente estudio.

Al M. en C. Atilano Gutiérrez del Instituto de Química, por el registro de los espectros de RMN.

A la Q.F.B. Graciela Chávez y a la Q. Marisela Gutiérrez de la Facultad de Química, por el registro de los espectros de IR.

Al Dr. Rubén Toscano por la realización del análisis de difracción de rayos X.

Al Dr. Roberto Cedillo de la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría , Centro Médico Nacional Siglo XXI.

A la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo brindado a través del subprograma 127 "Formación Básica para la Investigación".

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por su financiamiento proporcionado para la realización del presente estudio a través del Proyecto IN202493 otorgado a los doctores Rachel Mata y Rogelio Pereda.

A nuestros amigos y compañeros del Laboratorio 124, Fausto, Samuel, Perla S., Perla C., Adelina, Fernando, Lupita, Elizabeth, Susi, Martha y en especial a Daniel Chávez por su apoyo y buena disposición para la realización de este trabajo.

## DEDICATORIAS

A la Dra. Rachel Mata por que sin su invaluable dirección y sus consejos no hubiera sido posible la realización del presente trabajo. Por su preocupación por la formación de los nuevos investigadores y por su apoyo personal en todo momento.

A nuestros maestros de la Facultad de Química y de toda la vida que han dejado alguna huella en nuestras vidas.

A nuestros amigos: Claudia, Pablo, Omar, Adolfo, Gustavo, Carmen, Carlos, David, Adriana y Euclides, por todas las veladas que hemos corrido juntos.

Tommy - Fere.

A mis padres: Isaías y Victoria por ser el pilar de bronce que sostiene mi existir.  
Por darme lo más importante: Vida, Amor y Libertad. Porque no hay suficientes palabras para decirlo todo solo dire.....Gracias.

A mis hermanos: Moises, Elsa, Rufino, Rosario y Consuelo por compartir sueños y alegrías y por todo el apoyo que me han dado.

A Marco Antonio, Eligia, Dora y Aristire por ser tan pacientes y poner todo de su parte para integrarse a la familia.

A mis cuatro pequeños grandes amores, Berelyn America, Neisy Sarai, Ricardo Ivan y ..... aunque no le conozco ya te quiero, porque cada sonrisa tuya es un amanecer de esperanza.

A mi Tío Arturo y Yolanda, porque alguna vez, hace muchos años, supe que podría contar con ellos en las buenas y en las malas y siempre así ha sido.

A mi amiga Rosa Ruth por compartir mis sueños de la adolescencia.

A mis amigos Idalia y Ricardo porque ojala nunca olvidemos los momentos compartidos.

A la Familia Gutiérrez, porque aún cuando la relación con cada uno es diferente he aprendido lo mejor de ellos. De la Dra. Fere he aprendido a perseguir mis sueños, del Dr. Eduardo la realidad de la vida, de Mariana aprendí la necesidad de un futuro, de Humberto la serenidad del presente y de Eduardo lo más difícil, discutir sin perder la sonrisa.

A la Familia Muciño por darme un hogar cuando lo necesite y porque siempre recordare las fines de semana en Cuernavaca.

A mis tíos Deferino y Rosaura por estar siempre al pendiente de mi vida.

A Carmen C. mi maestra y amiga del CELE, por todos sus consejos.

A mi gran amigo Juan Carlos por todas las veces que ha corrido a mi llamado y porque estando con él no se puede dejar de sonreír.

A Lupita e Isa por soportarme tanto tiempo y por que ahora se que lo único que se necesita para ser feliz es una mesa.

A Monica Serrano y Pilar Vivanco, porque encontrar personas con una manera abierta de pensar es realmente difícil y más aún por casualidad.

A Iris Escudero por su apoyo de siempre y por enseñarme con tanta paciencia sobre las proteasas.

A Jere B. por compartir un año de su vida conmigo.

A Martín L. porque también puso su granito de arena.

Por último a una persona muy, pero muy importante:

A Armando Conca por su apoyo incondicional, por su cariño y por todos los buenos y malos ratos compartidos y porque aún tenemos muchos que compartir. Porque nada me alegra más que saber que siempre tendremos cosas en común.

A todos Ustedes Gracias por ser parte de Mí.

Tommy.

A mis padres y amigos, *Babi y Fidel*:

Por el amor, comprensión, apoyo y consejos que me han brindado. Por los innumerables sacrificios que han hecho por mí, por la formación que me han dado, por la confianza que me tienen y por darme la oportunidad de tomar mis decisiones. Por el inmenso amor que siento y por la orgulloso que estoy de ustedes.

A mis hermanos *Papo y Coco*:

Por los bellos momentos que hemos vivido juntos: los juegos de niños, las peleas de la adolescencia y los consejos de ahora. Por el enorme cariño que nos tenemos, cada uno con su manera particular de demostrarlo.

A *Carlotto*:

Por tenerle con nosotros y dar alegría a mi corazón con solo una mirada, una sonrisa o una bawesura.

A mis *Abuelitos*:

*Lupita, Jesusita y Fidel*. Por sus sabios consejos.

A mi hermanita *Vicky*:

Por su amistad sincera, por su ayuda incondicional en todos los momentos en que los necesite. Por compartir la misma filosofía de la vida.

A mi amigo *Manuel*:

Por su amistad, por los bellos detalles que ha vivido conmigo, por las veladas en las que siempre terminamos hablando de "comprender y componer el mundo".

A *Diego*:

Mi amiga y compañera de estudios, por las veces en las que me ayudó tanto en el aspecto personal como en el académico.

Si me dijeran pide un deseo  
preferiría un rabe de nube,  
un torbellino en cielo  
y una gran ira que suba,  
un barredor de tristezas,  
un aguacero en venganza,  
que cuanto recampe  
parezca nuestra esperanza.

¿Conque he de irme, cual flores que fenezan?

¿Nada será mi nombre alguna vez?

¿Nada dejaré en pos de mí en la tierra?

¡Al menos flores, al menos cantos!

¿Cómo ha de obrar mi corazón?

¿Acaso en vano venimos a vivir, a brotar en la tierra?

## INDICE

|                                                        | Página |
|--------------------------------------------------------|--------|
| 1. Introducción                                        | 1      |
| 2. Antecedentes de las especies objeto de estudio      | 6      |
| 2.1 Antecedentes de <i>Kohleria deppeana</i>           | 6      |
| 2.2 Antecedentes de <i>Lepidium virginicum</i>         | 8      |
| 2.3 Antecedentes de <i>Metopium brownei</i>            | 9      |
| 2.4 Antecedentes de <i>Galphimia glauca</i>            | 12     |
| 2.5 Antecedentes de <i>Hellianthella quinquenervis</i> | 14     |
| 2.6 Antecedentes de <i>Anredera scandens</i>           | 16     |
| 2.7 Antecedentes de <i>Tournefortia hirsutissima</i>   | 17     |
| 2.8 Antecedentes de <i>Acalypha phleoides</i>          | 18     |
| 2.9 Antecedentes de <i>Pteridium arachnoideum</i>      | 19     |
| 2.10 Antecedentes de <i>Heliopsis longipes</i>         | 19     |
| 2.11 Antecedentes de <i>Bunchosia lindeniana</i>       | 20     |
| 2.12 Antecedentes de <i>Stenorhynchus lanceolatus</i>  | 20     |
| 2.13 Antecedentes de <i>Ilex rubra</i>                 | 21     |
| 2.14 Antecedentes de <i>Elytraria imbricata</i>        | 21     |
| 2.15 Antecedentes de <i>Cardiospermum corindum</i>     | 21     |
| 2.16 Antecedentes de <i>Datura lanosa</i>              | 22     |
| 2.17 Antecedentes de <i>Cigarrilla mexicana</i>        | 24     |
| 2.18 Antecedentes de <i>Ratibida latipaliaris</i>      | 26     |
| 2.19 Antecedentes de <i>Dyssodia papposa</i>           | 28     |
| 2.20 Antecedentes de <i>Plumbago scandens</i>          | 29     |
| 2.21 Antecedentes de <i>Malmea depressa</i>            | 30     |
| 2.22 Antecedentes de <i>Geranium niveum</i>            | 31     |

|                                                                                          | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.23 Antecedentes de <i>Swietenia humilis</i>                                            | 31     |
| 2.24 Antecedentes de <i>Conyza filaginoides</i>                                          | 34     |
| 2.25 Antecedentes de <i>Commelina erecta</i>                                             | 35     |
| 2.26 Antecedentes de <i>Hypstis verticillata</i>                                         | 35     |
| 2.27 Antecedentes de <i>Cnidoscopus herbaceus</i> y <i>Cnidoscopus<br/>tehuacanensis</i> | 40     |
| 2.28 Antecedentes de <i>Penstemon batopilensis</i>                                       | 40     |
| 2.29 Antecedentes de <i>Ptelea trifoliata</i>                                            | 41     |
| 3. Justificación                                                                         | 52     |
| 4. Objetivos                                                                             | 55     |
| 5. Parte experimental                                                                    |        |
| 5.1 Material vegetal y preparación de los extractos vegetales                            | 57     |
| 5.2 Determinación de la actividad antimicrobiana                                         | 57     |
| 5.2.1 Operaciones preliminares a la realización de los bioensayos                        | 57     |
| a) Microorganismos de prueba y medios de cultivo                                         | 57     |
| b) Activación de los microorganismos liofilizados                                        | 62     |
| b.1 Apertura del vial                                                                    | 62     |
| b.2 Rehidratación de los microorganismos liofilizados                                    | 62     |
| c) Caracterización de los microorganismos de prueba                                      | 64     |
| c.1 Características morfológicas y microscópicas de los<br>microorganismos de prueba     | 64     |
| c.2 Pruebas bioquímicas para bacterias                                                   | 64     |
| c.2.1 Utilización de azúcares                                                            | 64     |
|                                                                                          | Página |

|       | Página                                                                                                                                         |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| c.2.2 | Pueba de Hugh y Leifson                                                                                                                        | 65 |
| c.2.3 | Pruebas de rojo de metilo y Vogues Proskauer                                                                                                   | 65 |
| c.2.4 | Pruebas de ácido sulfhídrico, indol y movilidad                                                                                                | 66 |
| c.2.5 | Prueba de citrato de Simmons                                                                                                                   | 66 |
| c.2.6 | Prueba de ureasa                                                                                                                               | 66 |
| c.2.7 | Prueba de nitritos                                                                                                                             | 67 |
| d)    | Determinación del número de células por medio del estándar turbidimétrico de McFarland                                                         | 68 |
| e)    | Determinación de la concentración crítica de antibióticos                                                                                      | 68 |
| e.1   | Preparación de los inóculos                                                                                                                    | 68 |
| e.2   | Preparación de los discos                                                                                                                      | 70 |
| e.3   | Preparación de las placas de agar                                                                                                              | 70 |
| e.4   | Bioensayo                                                                                                                                      | 72 |
| 5.2.2 | Determinación cualitativa preliminar de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar utilizando un gradiente de concentración | 77 |
| a)    | Preparación del inóculo                                                                                                                        | 77 |
| b)    | Preparación de las placas conteniendo las muestras a evaluar                                                                                   | 78 |
| c)    | Bioensayo                                                                                                                                      | 78 |
| 5.2.3 | Determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar utilizando discos de papel filtro como reservorio   | 79 |

|                                                                                             | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 5.2.4 Determinación de la actividad antimicrobiana cuantitativa por el método de dilución   | 79     |
| a) Determinación de la concentración mínima inhibitoria para bacterias                      | 80     |
| a.1 Preparación de inóculo                                                                  | 80     |
| a.2 Bioensayo cuantitativo                                                                  | 80     |
| b) Determinación de la concentración inhibitoria mínima para hongos                         | 81     |
| b.1 Preparación de inóculo                                                                  | 81     |
| b.2 Bioensayo cuantitativo                                                                  | 81     |
| 5.3 Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos objeto de estudio                | 83     |
| 5.3.1 Evaluación de la toxicidad de los extractos contra <i>Artemia salina</i>              | 83     |
| a) Preparación de las muestras                                                              | 83     |
| b) Incubación de los huevos de <i>Artemia salina</i>                                        | 83     |
| c) Bioensayo                                                                                | 83     |
| 5.3.2 Evaluación de la actividad citotóxica                                                 | 83     |
| 5.4 Obtención de la lunidonina y manitol a partir de la corteza de <i>Ptelea trifoliata</i> | 84     |
| 5.5 Caracterización de los compuestos aislados                                              | 85     |
| 5.5.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas                            | 85     |

|                                                                                                                                             | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 6.0 Resultados y discusión                                                                                                                  | 86     |
| 6.1 Determinación de la actividad antimicrobiana                                                                                            | 87     |
| 6.1.1 Caracterización de los microorganismos de prueba                                                                                      | 87     |
| 6.1.2 Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar utilizando un gradiente de concentración               | 88     |
| 6.1.3 Determinación de la actividad antimicrobiana cualitativa por el método de difusión en agar utilizando como reservorio discos de papel | 97     |
| 6.1.4 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por el método de dilución                                                  | 101    |
| 6.2 Determinación de la actividad citotóxica                                                                                                | 104    |
| 6.3 Aislamiento y caracterización de la lunidonina de la corteza de <i>Ptelea trifoliata</i>                                                | 106    |
| 7.0 Conclusiones                                                                                                                            | 116    |
| 8.0 Bibliografía                                                                                                                            | 118    |

## LISTA DE CUADROS

Página

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Cuadro 1. Metabolitos secundarios descritos para <i>Kohleria deppeana</i>             | 7  |
| Cuadro 2. Metabolitos secundarios detectados para <i>Metopium brownei</i>             | 10 |
| Cuadro 3. Nombres comunes de <i>Galphimia glauca</i>                                  | 12 |
| Cuadro 4. Propiedades medicinales de <i>Galphimia glauca</i>                          | 13 |
| Cuadro 5. Usos populares de <i>Helianthella quinquenervis</i>                         | 14 |
| Cuadro 6. Metabolitos secundarios aislados de <i>Helianthella quinquenervis</i>       | 15 |
| Cuadro 7. Metabolitos aislados de <i>Anredera scandens</i>                            | 16 |
| Cuadro 8. Usos populares de <i>Tournefortia hirsutissima</i>                          | 18 |
| Cuadro 9. Alcaloides aislados de <i>Datura lanosa</i>                                 | 23 |
| Cuadro 10. Metabolitos secundarios de <i>Cigarrilla mexicana</i>                      | 24 |
| Cuadro 11. Metabolitos secundarios de <i>Ratibida latipaliaris</i>                    | 27 |
| Cuadro 12. Metabolitos secundarios aislados de <i>Plumbago scandens</i>               | 30 |
| Cuadro 13. Metabolitos secundarios aislados de <i>Swietenia humillis</i>              | 32 |
| Cuadro 14. Metabolitos secundarios aislados de <i>Hyptis verticillata</i>             | 36 |
| Cuadro 15. Metabolitos secundarios aislados de <i>Ptelea trifoliata</i>               | 42 |
| Cuadro 16. Especies vegetales objeto de evaluación                                    | 58 |
| Cuadro 17. Microorganismos de prueba y medios de cultivo                              | 61 |
| Cuadro 18. Estándar turbidimétrico de McFarland                                       | 69 |
| Cuadro 19. Antibióticos a los cuales se determinó la concentración inhibidora crítica | 71 |
| Cuadro 20. Disolventes empleados para la disolución de los antibióticos               | 71 |
| Cuadro 21. Volúmen del inóculo empleado para los ensayos                              | 72 |

|                                                                                                                                                                    | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Cuadro 22. Diámetros promedio de las zonas de inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> con ampicilina                                            | 73     |
| Cuadro 23. Diámetros promedio de las zonas de inhibición del crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> con estreptomycinina                                          | 74     |
| Cuadro 24. Diámetros promedio de las zonas de inhibición del crecimiento de <i>Candida albicans</i> con anfotericina B                                             | 75     |
| Cuadro 25. Diámetros promedio de las zonas de inhibición del crecimiento de <i>Trichopyton mentagrophytes</i> con griseofulvina                                    | 76     |
| Cuadro 26. Concentración de cada uno de los antibióticos de prueba seleccionado como control positivo                                                              | 77     |
| Cuadro 27. Fraccionamiento primario del extracto de <i>Ptelea trifoliata</i>                                                                                       | 85     |
| Cuadro 28. Características microscópicas y coloniales de los microorganismos de prueba                                                                             | 89     |
| Cuadro 29. Resultados de las pruebas bioquímicas                                                                                                                   | 90     |
| Cuadro 30. Resultados obtenidos con el método de difusión en agar para los extractos de las plantas objeto de estudio con los diferentes microorganismos de prueba | 93     |
| Cuadro 31. Diámetro de zona de inhibición (mm) desarrollados por los extractos activos en la prueba de difusión en agar                                            | 98     |

|                                                                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Cuadro 32. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de las especies que resultaron activas en el ensayo de difusión | 101 |
| Cuadro 33. Resultados del bioensayo con <i>Artemia salina</i>                                                                         | 105 |
| Cuadro 34. Resultados de los ensayos de citotoxicidad contra tres líneas celulares                                                    | 106 |
| Cuadro 35. Susceptibilidad de <i>Giardia lamblia</i> y <i>Entamoeba histolytica</i> a la lunidonina                                   | 108 |
| Cuadro 36. Constantes físicas y espectroscópicas de la lunidonina                                                                     | 109 |
| Cuadro 37. Señales observadas en los espectros de <sup>13</sup> C RMN                                                                 | 110 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                     | Página |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1. Apertura del vial conteniendo los microorganismos liofilizados                                            | 63     |
| Figura 2. Gradiente de concentración                                                                                | 78     |
| Figura 3. Bioensayo para determinar la concentración inhibidora mínima para bacterias                               | 82     |
| Figura 4. Tipos de respuestas obtenidas en el bioensayo de difusión en agar empleando un gradiente de concentración | 96     |
| Figura 5. Tipos de respuestas obtenidas en el bioensayo de difusión en disco                                        | 100    |
| Figura 6. Vista estereoscópica generada por rayos X de la lunidonina                                                | 111    |

## LISTA DE ESPECTROS

|                                                                        | Página |
|------------------------------------------------------------------------|--------|
| Espectro 1. Espectro de infrarrojo de la lunidonina                    | 112    |
| Espectro 2. Espectro de RMN $^1\text{H}$ de la lunidonina              | 113    |
| Espectro 3. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de la lunidonina        | 114    |
| Espectro 4. Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ - DEPT de la lunidonina | 115    |

## 1. INTRODUCCION

Desde épocas remotas el hombre ha usado extractos vegetales y productos derivados de los mismos para el tratamiento de numerosas enfermedades incluyendo las infecciosas. Durante mucho tiempo el empleo de esos agentes terapéuticos, otrora efectivos, y la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos de origen vegetal, se ha visto opacado debido a la gran revolución ocasionada por los antibióticos derivados de microorganismos o sus análogos sintéticos y que data desde los primeros ensayos clínicos de la penicilina en 1929 (Mitscher *et al.*, 1987).

Sin embargo, desde la década pasada, ha resurgido notablemente el interés por los agentes antimicrobianos derivados de plantas como lo demuestra la abundante literatura que se ha publicado en relación al tema durante ese período. Es importante mencionar también que en los últimos años como consecuencia de la aparición de micosis oportunistas debido al SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), se ha incrementado el interés por la búsqueda de antifúngicos de origen natural. El uso de técnicas microbiológicas modernas ha permitido demostrar que los extractos de plantas superiores de diversos géneros y familias poseen una actividad significativa en contra de numerosas bacterias y hongos patógenos (Hufford *et al.*, 1975; Ikram y Inamul-Haq, 1980; Gutkind *et al.*, 1982; Karkani y Nair 1982; Farouk *et al.*, 1983; Sigh *et al.*, 1983; Mitscher y Rao, 1984; Hamburger y Cordell, 1987; Mitscher *et al.*, 1987; Ríos *et al.*, 1988; Rojas *et al.*, 1992; Cáceres *et al.*, 1993; Mata, 1993; Pereda-Miranda *et al.*, 1993; Novelo *et al.*, 1993; Olukoya *et al.*, 1993; Taniguchi y Kubo, 1993).

En este reciente interés por los agentes antimicrobianos de origen vegetal, la medicina tradicional ha desempeñado un papel muy importante como criterio para la selección de plantas con principios antisépticos (Ríos *et al.*, 1988,

Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; Mitscher *et al.*, 1987; Taniguchi y Kubo, 1993). Un ejemplo representativo ha sido el estudio sistemático de especies medicinales del género *Erythrina* (leguminosas) el cual ha permitido la obtención de varios metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana (Mitscher *et al.*, 1987).

Se ha observado también que el uso de los antibióticos ha aumentado enormemente en las últimas décadas a la par que la investigación de los mismos en busca de agentes con mayor potencia y eficacia que los de uso terapéutico.

Por otra parte, la alta incidencia de cáncer y la falta de agentes antitumorales eficaces y específicos ha conducido a la búsqueda continua de sustancias con propiedades antitumorales. En este campo las plantas superiores constituyen una importante fuente de sustancias con propiedades antitumorales, y como ejemplo puede citarse a la vincristina, la vinblastina, la podofilotoxina, camptotecina y al taxol, por tan sólo mencionar algunos ejemplos (McLaughlin, 1991).

Las investigaciones conducentes a la obtención de principios activos vegetales se realizan mediante procedimientos biodirigidos y alternativamente mediante métodos convencionales (Geran *et al.*, 1972; Wall y Wani, 1977; Sufness, 1978; Powell y Smith, 1980; Ferrigni *et al.*, 1984; Douros y Spjut, 1985; Mitscher *et al.*, 1987; Rios *et al.*, 1988; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; Rojas *et al.*, 1992; Mata, 1993; Pereda-Miranda *et al.*, 1993). En el caso de los primeros, se emplea un bioensayo conveniente para guiar el aislamiento de los constituyentes bioactivos, sin importar sus propiedades químicas o sus concentraciones relativas en los extractos. En contraste, los métodos convencionales implican el aislamiento del mayor número posible de metabolitos secundarios de las plantas para posteriormente investigar su actividad biológica. Las sustancias obtenidas de esta manera, pueden o no reflejar las propiedades

curativas del extracto crudo de tal forma que aunque estos estudios constituyen una contribución al conocimiento de la medicina tradicional, no siempre cumplen con el propósito de aislar compuestos con actividad biológica. Por el contrario, los estudios biodirigidos, garantizan la obtención de compuestos bioactivos, muchos de los cuales resultan ser estructuralmente novedosos contribuyendo no solamente al campo de la química farmacéutica, sino también a otras áreas más específicas del conocimiento de los productos naturales (Mitscher *et al.*, 1987).

Un paso preliminar importante para la búsqueda de nuevos fármacos a partir de fuentes naturales lo constituye la detección de las materias primas adecuadas. Este proceso implica la selección del material vegetal y la determinación de su actividad biológica. La selección del material vegetal se puede realizar de acuerdo a los siguientes criterios: el uso folklórico de la especie en cuestión, la relación quimiotaxonómica entre diferentes especies, antecedentes ecológicos y el azar (Hamburger y Hostettmann, 1991).

Una vez seleccionado el material vegetal se procede a la determinación preliminar de la actividad biológica y para ello existen numerosas pruebas sencillas, de fácil implementación que permiten detectar en forma inicial actividades biológicas de mayor complejidad, y en algunas ocasiones hasta actividades biológicas específicas.

Para la búsqueda de sustancias anticancerígenas se conocen diversos métodos de detección preliminar y entre ellos destacan por su sencillez la determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982; Anderson *et al.*, 1991; McLaughlin, 1991), la inhibición de las agallas inducidas por *Agrobacterium tumefaciens* en la papa (Zaenne *et al.*, 1974; Chilton *et al.*, 1980; Kahl *et al.*, 1982; Ream *et al.*, 1982; McLaughlin, 1991), la inhibición del desarrollo de huevecillos del erizo de mar (Crimino *et al.*, 1990) y

la determinación de la citotoxicidad mediante un método de difusión en dos capas de agar (Burnes *et al.*, 1989). De los ensayos antes mencionados la toxicidad para *Artemia salina* y la inhibición de las agallas inducidas por *Agrobacterium tumefaciens* han demostrado una muy buena correlación con ensayos más complejos como la determinación de la citotoxicidad tanto *in vivo* como *in vitro* en diversas líneas celulares tales como KB (Carcinoma nasofaríngeo humano), P388 (Leucemia de ratón), A-549 (Carcinoma de pulmón), MCF-7 (Cáncer de mama) y HT-29 (Adenocarcinoma de colon). Por lo tanto el empleo de los mismos para la detección de candidatos idóneos y su posterior investigación fitoquímica está bien justificado (Meyer *et al.*, 1982; Anderson *et al.*, 1991; Novelo *et al.*, 1993).

En el ensayo para determinar la toxicidad contra *Artemia salina*, este crustáceo se expone a diferentes concentraciones del extracto o del compuesto a evaluar durante 24 h. y se determina el porcentaje de mortalidad para calcular la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) (McLaughlin, 1991).

Para la determinación de la actividad antimicrobiana se emplean métodos de dilución y métodos de difusión. En general, los ensayos biológicos se realizan con una serie de microorganismos de prueba que incluyen bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*), Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), levaduras (*Candida albicans*) y hongos (*Aspergillus niger* y *Trichophyton mentagrophytes*). La susceptibilidad de tales microorganismos al agente potencial antimicrobiano se determina en dos fases: en la primera se realiza un ensayo cualitativo primario que permite detectar la presencia o ausencia de actividad. En la segunda, se cuantifica la potencia relativa (Mitscher *et al.*, 1987, Vanden Berghe y Vlietinck, 1991).

Para realizar el ensayo primario se utiliza generalmente, el método de difusión en placa de agar, en el cual las muestras a evaluar (extractos,

fracciones o compuestos puros) contenidas en un reservorio (disco, cilindro o pozo) se ponen en contacto con un medio apropiado previamente inoculado con el microorganismo de prueba. El ensayo se realiza en placas de Petri y después de un período de incubación adecuado, se examina la placa en busca de zonas de inhibición del crecimiento microbiano alrededor del reservorio (Clark *et al.*, 1981; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991). Las zonas de inhibición se comparan con las obtenidas con los antibióticos de referencia previamente establecidos por medio de pruebas de susceptibilidad. Sin embargo, mediante la técnica de difusión, no es recomendable determinar la potencia de los extractos vegetales, debido a que puede desarrollarse una zona de inhibición sumamente evidente causada por una sustancia altamente activa y presente en pequeñas cantidades o de manera alternativa provocada por un compuesto poco activo presente en altas concentraciones.

Mediante el ensayo secundario se cuantifica la actividad antimicrobiana empleando un método de dilución en agar en el caso de los hongos o de dilución en caldo en el caso de las bacterias. Independientemente del método empleado, este ensayo consiste en exponer diferentes concentraciones del extracto o material de prueba a los diferentes microorganismos ensayados. Después de la etapa de incubación, se determina la cantidad mínima del agente requerida para inhibir el desarrollo del microorganismo; a ésta concentración se le conoce con el nombre de concentración inhibidora mínima (CIM) (Sahm y Washington, 1991; Finegold, 1989).

Recientemente se han publicado varias revisiones sobre la metodología empleada para la determinación de la actividad antimicrobiana potencial de extractos vegetales y productos derivados de los mismos (Ríos *et al.*, 1988 y Vanden Berghe y Vlietinck, 1991. *inter alia*).

## 2. ANTECEDENTES DE LAS ESPECIES OBJETO DE ESTUDIO

### 2.1. Antecedentes de *Kohleria deppeana*.

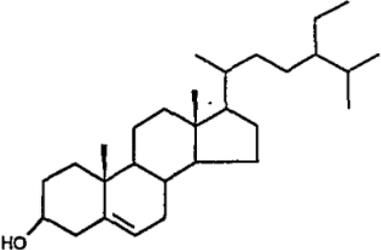
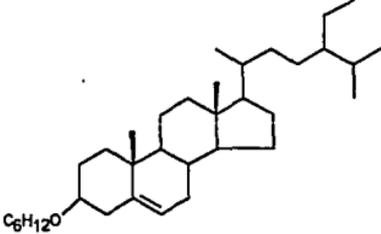
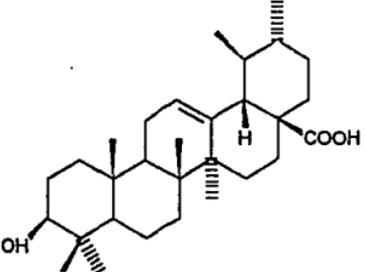
*Kohleria deppeana* (Schl & Cham) Fritch (Gesneriaceae) es una planta originaria de México y Guatemala. En México se encuentra distribuida en los estados de Morelos, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Guerrero y Chiapas. Se le conoce con los nombres comunes de "tochomixóchiti" (flor de pelusa roja), "tlalchichinole", "tochimitillo", "tlachichinoa", "tlanchichinole" y "tochomitl" (Martínez, 1989).

Esta especie se caracteriza por ser una hierba perenne, a veces con tallos lignificados en la base; hojas simples, opuestas, oblongo lanceoladas u oblongo ovadas de 6 a 17 cm. de largo, velosas, ápice acuminado, margen aserrado, base obtusa o aguda, con pecíolo; inflorescencia axilar, de tres o cuatro flores; flores bisexuales, zigomorfas; cáliz sinsepalo, tubular, con cinco lóbulos, adnado a la base del ovario; corola simpétala, tubular con cinco lóbulos desiguales, de color rojo brillante, de 2 a 8 cm. de largo, puberulenta; estambres cuatro; ovario medio ínfero; frutos cápsulas bivalvadas (Linares, 1990).

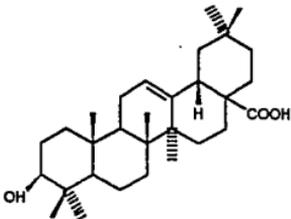
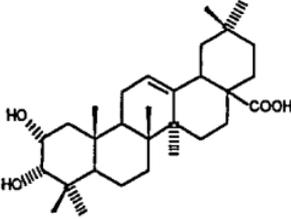
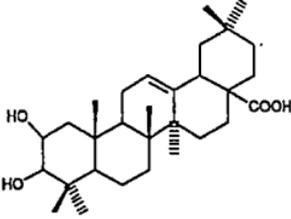
En la actualidad el uso en la medicina tradicional más generalizado que se ha encontrado para esta planta es para tratar afecciones renales. Se prepara un té en combinación con la guazima (*Guazuma ulmifolia*), la pingüica (*Arctostaphylos pungens*), el tejocote (*Crataegus pubescens*), la cola de caballo (*Equisetum myriochaetum*), el azocopatle (*Gautheria acuminata*) y se bebe como agua de uso. Otro empleo común es para lavar heridas y para las hemorroides: en combinación con el árnica (*Heterotheca inuloides*), el cuachalate (*Amphipterygium astringens*) y el toloache (*Datura spp.*), se prepara una infusión, la cual se aplica localmente (Linares, 1990).

Un estudio fitoquímico reciente sobre esta especie permitió el aislamiento y la caracterización de los metabolitos secundarios que se presentan en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Metabolitos secundarios descritos para *Kohleria deppeana*.**

| Metabolito y referencia                                       | Estructura                                                                          |
|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| $\beta$ sitosterol<br>(Noguera <i>et al.</i> , 1994)          |    |
| $\beta$ -D-Glucositolsterol<br>(Noguera <i>et al.</i> , 1994) |    |
| Acido ursólico<br>(Noguera <i>et al.</i> , 1994)              |  |

**Cuadro 1. Metabolitos secundarios descritos para *Kohleria deppeana*.  
(Continuación).**

| Metabolito y referencia                                                                         | Estructura                                                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Acido oleanoico<br>(Noguera <i>et al.</i> , 1994)                                               |  |
| Acido 2 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihidroxi-olean-12-en-28-oico.<br>(Noguera <i>et al.</i> , 1994) |  |
| Acido 2 $\beta$ , 3 $\beta$ -dihidroxi-olean-12-en-28-oico<br>(Noguera <i>et al.</i> , 1994)    |  |

**2.2. Antecedentes de *Lepidium virginicum*.**

*Lepidium virginicum* L (Cruciferae) es una planta originaria de Europa, pero naturalizada en varios lugares de México. Es una planta herbácea de unos 40 a 80 cm, ramosa, hojas interiores sésiles, lanceoladas, aserrado-dentadas y ligeramente pubescentes. Las inflorescencias son muy abundantes, en racimos

compuestos situados en la extremidad de las ramas, flores crucíferas, pequeñas y blancas, el fruto es una silicua arredondada y florece casi todo el año (Martínez, 1989).

La especie se conoce con los nombres vulgares de comida de pajarito (Jal.), cupapayo, lentejilla (México, D.F.), mastuerzo, "mixixi" (Puebla), "xixinda" (Mex.), "meix-quilitl" (azteca). También se conoce con los nombres mayas de "kabalput", "putkan", "putxiw" y "xputkan".

En la medicina popular de México se ha empleado como antiinflamatorio, contra el dolor e infecciones estomacales, contra el escorbuto y contra la enteritis (Martínez, 1989). En Yucatán, se le considera como diurética y suele emplearse en el tratamiento de enfermedades renales. Las partes de esta planta que comúnmente se utilizan son las flores y las hojas.

Desde el punto de vista fitoquímico, en las semillas de esta especie se han encontrado los siguientes ácidos grasos: palmítico, esteárico, oleico, linoleico, eicosanoico y eicosenoico (kolodziejski, 1969).

Recientemente, Avila y colaboradores (1993) demostraron que el extracto acuoso de la especie presentaba propiedades antimicrobianas en contra de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Shigella boydii*.

### **2.3. Antecedentes de *Metopium brownei*.**

*Metopium brownei* (Jacq.) Urban (Anacardiaceae) es un árbol que se distribuye exclusivamente en la vertiente del Golfo de México, de Veracruz a Quintana Roo, donde es muy abundante (Cabrera et al., 1982).

La especie se conoce comúnmente con los nombres de "chechen", "kabal chechen", "box chechen" y madera negra venenosa (Cabrera et al., 1982;

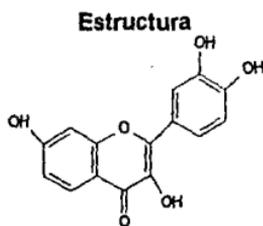
Martínez, 1989). Se caracteriza por ser un árbol de 8 a 25 m de altura, con el tronco recto, las ramas ascendentes y de copa irregular; corteza escamosa con lenticelas protuberantes, gris-parduzcas y madera color crema, presenta un exudado blanco-acuoso sumamente cáustico, que ennegrece al contacto con el aire; hojas con 5 a 7 folíolos generalmente manchados con puntos negros; los árboles de esta especie pierden las hojas entre abril y mayo, casi simultáneamente con la floración; las flores son pequeñas de color amarillo, inconspicuas, los frutos son drupas de 1 cm, ovales, de color rojo y con una semilla (Cabrera *et al.*, 1982). Desde el punto de vista medicinal, se le atribuyen propiedades antireúmaticas, sedantes, diaforéticas y purgantes (Cabrera *et al.*, 1982; Martínez, 1989).

La madera ha sido estudiada desde el punto de vista químico. La investigación permitió determinar mediante la cromatografía de papel la presencia de los flavonoides que se presentan en el Cuadro 2.

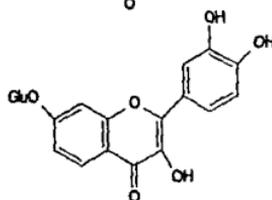
**Cuadro 2. Metabolitos secundarios detectados en el *Metopium brownii*.**

**Metabolito y referencia**

Fisetina  
(Young, 1979)



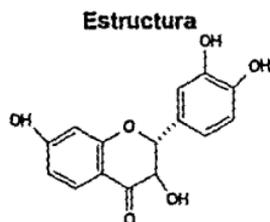
Glucofisetina.  
(Young, 1979).



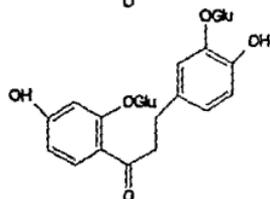
**Cuadro 2. Metabolitos secundarios detectados en el *Metopium brownei*.  
(Continuación).**

**Metabolito y referencia**

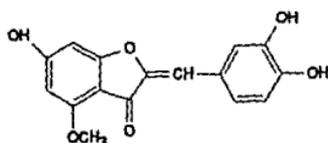
Fustina.  
(Young, 1979).



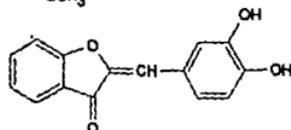
2',3-O-β-Diglucobutena.  
(Young, 1979).



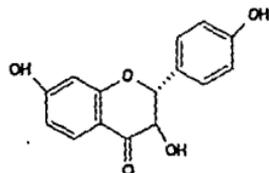
Rengasina.  
(Young, 1979).



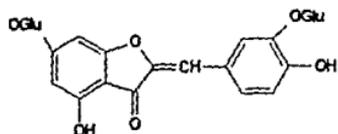
Sulfuretina.  
(Young, 1979).



7,3,4'-trihidroxi flavanona.  
(Young, 1979).



6,3'-O-β-Diglicosulfuretina.  
(Young, 1979).



Glu: β-D-glucopiranosil.

#### 2.4. Antecedentes de *Galphimia glauca*.

*Galphimia glauca* Cav. (Malpighiaceae), se localiza principalmente en la región boscosa de pino-encino del Suroeste de México, así como en la selva baja caducifolia de Chihuahua y Sonora. Se caracteriza por ser un arbusto hasta de 5 m con hojas opuestas, ovadas con pequeñas glándulas en la base de la lámina o en el ápice del pecíolo; flores amarillas, estrelladas en grandes racimos (Martínez, 1979).

Esta especie se conoce con diferentes nombres comunes dependiendo del Estado de la República, como se muestra en el Cuadro 3

**Cuadro 3. Nombres comunes de *Galphimia glauca*.**

| Nombre común                                                                                                                                                                 | Distribución    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| cahal ch'ihl, nancin (tzetzal), petajoyo (zoque), flor de chin-che, flor de Rosario.                                                                                         | Chiapas         |
| ciruelo del campo, consulita, fumete, humete.                                                                                                                                | Chihuahua       |
| corpiochi, cortinchi, flor de nochebuena, calderona amarilla, flor de diciembre, huachata.                                                                                   | Guerrero        |
| flor de caballo, flor de muellas, flor de panal, flor de vela, ghandela, ita kit lta quite (mixteco).                                                                        | Oaxaca          |
| leichi, leychi (guajiro), garbancillo, garbansilla.                                                                                                                          | Sonora          |
| huachata, nachacata, calderona amarilla, mazorquitas, flor de diciembre, vachacata totancapalli, shanin-tzitziki, shanin-tzitzuec (purepecha), xanin-tzintziki, xaxaxacotic. | Michoacán       |
| palo de San Vicente, hierba del venado.                                                                                                                                      | Sinaloa         |
| ramo de oro, palo de muerto, San Vicente.                                                                                                                                    | Jalisco         |
| tsalaam kubí, tzalam-cubic, hierba de hormiga, hierba del piojo.                                                                                                             | San Luis Potosí |
| xaxaxaoti, palo de muerto.                                                                                                                                                   | Morelos         |
| calderona amarilla.                                                                                                                                                          | Guanajuato      |

Las propiedades medicinales que se atribuyen a esta especie se enumeran en el Cuadro 4. Los estudios químicos realizados sobre esta especie han permitido el aislamiento de galatos del ácido quínico incluyendo al ácido tetra-galoilquínico. Desde el punto de vista biológico, se estudió el ácido tetra-galoilquínico aislado de esta especie y se encontró que posee actividad antialérgica en afecciones bronquiales (Wagner, 1992).

**Cuadro 4. Propiedades medicinales de *Galphimia glauca*.**

| Parte del vegetal | Vía de admon. | Uso popular                                                         | Estado                                                |
|-------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| Flores            | Oral          | Empacho, bilis, corazón, nervios                                    | Guerrero                                              |
|                   | Local         | Hongos<br>Emoliente                                                 | San Luis Potosí<br>Guanajuato                         |
| Hojas             | Oral          | Antidiarreico<br>Embarazadas que sufren de "flores blancas".        | Chihuahua<br>Morelos                                  |
|                   | Local         | Enfermedades mentales<br>Heridas                                    | Guanajuato.<br>Chihuahua,<br>Sinaloa y<br>Guanajuato. |
| Raíz              | Oral          | Obstrucción de orina                                                | Sonora                                                |
|                   | Varios        | Antiblenorreico, antidisentérico,<br>antipalúdico, gastroenteritis. |                                                       |

## 2.5. Antecedentes de *Helianthella quinquenervis*.

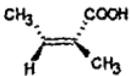
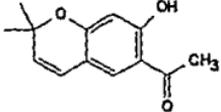
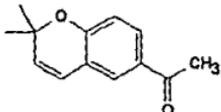
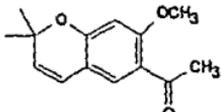
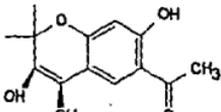
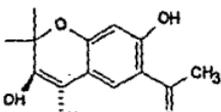
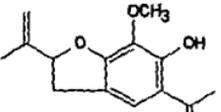
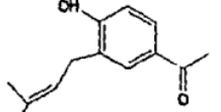
*Helianthella quinquenervis* (Hook.) A. Gray (Asteraceae) es conocida popularmente con los nombres de álamo temblón y flor de sol (Inouye, 1980). Se encuentra distribuida al Oeste de Estados Unidos, Cánada y México (Herz, et al., 1984). En el caso particular de México, su distribución se localiza en el Estado de Chihuahua, donde se emplea como antiparasitario y para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, en ambos casos se utiliza la infusión de las raíces. Un resúmen de los usos populares de esta especie se presenta en el Cuadro 5.

Entre los metabolitos secundarios aislados de esta especie se encuentran el ácido angélico y los compuestos aromáticos cuyas estructuras se muestran en el Cuadro 6.

**Cuadro 5. Usos populares de *Helianthella quinquenervis*.**

| Parte del vegetal | Vía de admon. | Usos populares                                                                                                                         |
|-------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Raíz              | oral          | Antiescorbútico, para la comezón de pústulas, vermífugo.                                                                               |
| Hojas             | oral          | Diurético, pasmo, para la inflamación de las rodillas.                                                                                 |
| Planta entera     | oral          | Antitusivo, para irregularidades de la menstruación, emenagogo, mal de madre, para el trabajo de parto, pelagra e infecciones renales. |
| Semillas          | oral          | Carminativo.                                                                                                                           |

**Cuadro 6. Metabolitos secundarios aislados de *Helianthella quinquenervis*.**

| Metabolito y referencia                                                                    | Estructura                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Acido angélico.<br>(Gómez, 1992)                                                           |    |
| 6-acetil-7-hidroxi-2,2-dimetilcromeno<br>(Herz y Kulanthaivel, 1984)                       |    |
| 6-acetil-2,2-dimetilcromeno<br>(Herz y Kulanthaivel, 1984)                                 |    |
| 6-acetil-2,2-dimetil-7-metoxicromeno<br>(Herz y Kulanthaivel, 1984)                        |    |
| <i>cis</i> -6-acetil-3,4,7-trihidroxi-2,2-dimetilcromeno.<br>(Herz y Kulanthaivel, 1984)   |    |
| <i>trans</i> -6-acetil-3,4,7-trihidroxi-2,2-dimetilcromeno.<br>(Herz y Kulanthaivel, 1984) |    |
| Benzofuranencecalina<br>(Herz y Kulanthaivel, 1984)                                        |  |
| 3-prenil-4-hidroxifenona<br>(Herz y Kulanthaivel, 1984)                                    |  |

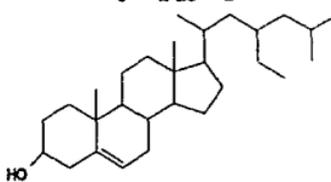
## 2.6. Antecedentes de *Anredera scandens*.

*Anredera scandens* (L) Mocq. (Basellaceae), se encuentra distribuida en los Estados de Sinaloa, Hidalgo, Durango y Guerrero, y se conoce con los nombres vulgares de sacasil y raíz de sacasil. "La raíz machacada de la planta mezclada con azúcar se envuelve con papel y después se coloca la venda, se utiliza para el tratamiento de las fracturas y para el lavado de heridas" (Bye, comunicación personal, 1994).

Martínez (1979) proporciona la siguiente descripción de esta planta, "Especie trepadora provista de un rizoma alargado y grueso, tallo carnoso, hojas ovadas; floras blancas en espigas axilares, dos pétalos, alados, pétalos y cinco estambres, con los filamentos aplanados".

Los metabolitos aislados de *Anredera scandens* se resumen en el Cuadro 7.

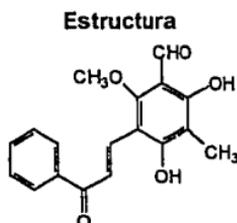
**Cuadro 7. Metabolitos aislados de *Anredera scandens*.**

| Nombre y Referencia                                     | Estructura                                                                          |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Acido octaeicosanoico<br>(Calzada <i>et al.</i> , 1990) | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{26}\text{COOH}$                                          |
| Octaeicosanol<br>(Calzada <i>et al.</i> , 1990)         | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{26}\text{CH}_2\text{OH}$                                 |
| $\beta$ -sitosterol<br>(Calzada <i>et al.</i> , 1990)   |  |

**Cuadro 7. Metabolitos secundarios aislados *Anredera scandens*  
(Continuación)**

**Nombre y Referencia**

2,4-dihidro-6-metoxi-5-formil-3-  
metilchalcona.  
(Calzada *et al.*, 1990)



**2.7. Antecedentes de *Tournefortia hirsutissima***

*Tournefortia hirsutissima* L. (Boraginaceae) es una planta originaria de Yucatán. Se conoce con los nombres vulgares de frutilla, hierba rasposa, ortiguilla, perlas y ampa hasta (Sinaloa), tlachichinoa (Puebla, Morelos y Oaxaca), niguo (sureste de S.L.P), tepalli y "patlahuac-tzitzi-cazlli" (lengua azteca), lágrimas de San Pedro y palo Santo (Puebla) donde la usan para la diabetes y enfermedades renales (Martínez, 1979, 1989; Díaz, 1976). Esta planta es un arbusto trepador hirsuto; hojas lanceoladooblongas a elípticas u ovado-ovales, de 8-15 cm., acuminadas, ásperas arriba; flores monopétalas, blancas con el tubo de 4-5 mm., en inflorescencia escorpiordea; fruto drupáceo con 4 nuececillas.

En el Cuadro 8 describe los usos populares de la especie, así como la parte de la planta empleada y su vía de administración. Otras propiedades que se le atribuyen a esta planta son las siguientes: antiespasmódico, carminativo y pectoral (Martínez, 1979).

## Cuadro 8. Usos populares de *Tournefortia hirsutissima*

| Parte del vegetal | Vía de admon. | Usos populares                     |
|-------------------|---------------|------------------------------------|
| Raíz              | local         | Antiescrotuloso, pústula maligna.  |
|                   | oral          | Diurético, analgésico.             |
| Hoja              | local         | Astringente, dermatosis, gangrena. |
| Tallo             | oral          | Afecciones gastrointestinales.     |
| Jugo              | oral          | Favorece la fecundidad.            |

### 2.8. Antecedentes de *Acalypha phleoides*.

*Acalypha phleoides* Cav. (Euphorbiaceae) se encuentra distribuida principalmente en Jalisco, Veracruz, Oaxaca, San Luis Potosí y el Valle de México, (Martínez, 1989). Se conoce con los nombres vulgares de hierba del cáncer, yerba del pastor y hierba del pastor (Martínez, 1989; Díaz, 1976).

Esta especie ha sido empleada en la medicina popular como anticrotático, antiséptico, y para el tratamiento de úlceras del aparato digestivo.

La especie relacionada *Acalypha guatemalensis* es también utilizada como agente antiséptico y recientemente se demostró su actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pyogenes* (Cacéres, 1993).

Martínez la describe de la siguiente forma: "Planta herbácea, casi tendida, vellosa, con hojas ovadas y aserradas; flores en amentos y sin corola, las femeninas con los estilos rojos" (Martínez, 1979).

## 2.9. Antecedentes de *Pteridium arachnoideum*

*Pteridium arachnoideum* (Kaulf) Maxon (Dennstaedtiaceae) se encuentra distribuida en los Estados de México, Veracruz, Guerrero y Oaxaca. No se conoce ningún uso medicinal. Se caracteriza por ser un helecho provisto de rizoma subterráneo; frondas de 2 m o más, divididos y subdivididos en segmentos angostos; los soros en las filas continuas en el margen de los segmentos (Martínez, 1979). Una descripción más detallada de la planta la realizó Smith (1981).

## 2.10. Antecedentes de *Heliopsis longipes*

*Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake (Asteraceae) se encuentra distribuida en Guanajuato, San Luis Potosí y Queretaro.

Es una planta herbácea, perenne, de 20 a 70 cm, hojas opuestas, ovadas, de 2 a 4 cm, aserradas y con pecíolos cortos, cabezuelas amarillas con largo pedúnculo. Raíces de 15 a 30 cm de largo por 2 mm de ancho, con corteza morena que cubre a un eje leñoso y amarillento. Nace en lugares húmedos, cálidos o templados de las tierras de los chichimecas y es muy apreciada por los indígenas de estas regiones.

Se conoce con los nombres vulgares de cuilcuán, chilcuague, chincuague, pelitre, peritre, en lengua azteca se le llama "chilmecatli" (de chili, chile y mecatli, hilo) aludiendo a las raíces filiformes y al sabor picante de éstas. En la época colonial se le nombró como "chimecatli seu ychcha". (Martínez, 1989; Bye, comunicación personal, 1994).

La parte de la planta empleada es la raíz, que al masticarse produce un sabor picante, adormece la lengua y provoca abundante secreción de saliva, suele utilizarse como analgésico para combatir el dolor de muelas (Martínez, 1989), la gastritis y la úlcera (Bye, comunicación personal, 1994). También se utiliza como estimulante, como anestésico y para contrarrestar el veneno de los animales ponzoñosos aplicándolo sobre las picaduras. Por último, cabe destacar que la planta se emplea como condimento en alimentos y bebidas (Martínez, 1989).

Romero y colaboradores (1989) demostraron que el extracto alcohólico de la raíz presenta actividad antibacteriana en contra de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. También, presenta actividad insecticida en contra de las larvas de *Gasterophilus spp.* y de *Oestrus ovis*.

### **2.11. Antecedentes de *Bunchosia lindeniana***

*Bunchosia lindeniana* Juss. (Malpighiaceae) se conoce con el nombre vulgar de coyotomate. El uso común de esta planta es para lavar la piel y para los granos (Bye, comunicación personal, 1994).

### **2.12. Antecedentes de *Stenorrhynchus lanceolatus***

*Stenorrhynchus lanceolatus* (Aubl.) (Orchidaceae) se le conoce en Yucatán con los nombres comunes de hulté-K'-aaknta y terciopelo. Se caracteriza por ser una orquídea de raíces gruesas; hojas arrosetadas; tallo floral central y flores tubulosas amarillas. Popularmente, se emplea la planta entera mezclada con otras especies para el tratamiento de llagas cancerosas (Martínez, 1979; Anaya, comunicación personal).

### **2.13. Antecedentes de *Ilex rubra***

*Ilex rubra* S. Wats. (Aquifoliaceae) es un arbusto que crece en el estado de Chihuahua donde se emplea como un agente purgante (Bye, comunicación personal, 1994). Esta especie medicinal no ha sido objeto de ningún estudio fitoquímico.

### **2.14. Antecedentes de *Elytraria imbricata*.**

*Elytraria imbricata* (Vahl) Pers. (Acanthaceae) es una planta endémica del estado de Chihuahua. Se le conoce con los nombres comunes de cordoncillo o "kiri". Se utiliza como purgante y como agente antiséptico ya que es ampliamente empleada para el lavado de heridas (Bye, comunicación personal, 1994). Por otra parte, Pennington (1963) reportó que las hojas de esta especie son empleadas para la fiebre y la diarrea. Desde el punto de vista fitoquímico la especie no ha sido objeto de estudio, por lo que se desconoce su contenido metabólico secundario.

### **2.15. Antecedentes de *Cardiospermum corindum*.**

*Cardiospermum corindum* L. fma. villosum (Mill.) Radlk. (Sapindaceae) es una planta que crece en el estado de Chihuahua. El fruto de la planta se emplea para el tratamiento de afecciones gastrointestinales. Desde el punto de vista fitoquímico la especie no ha sido objeto de estudio por lo que se desconoce su contenido metabólico secundario.

## 2.16. Antecedentes de *Datura lanosa*.

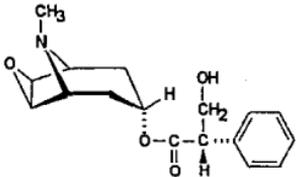
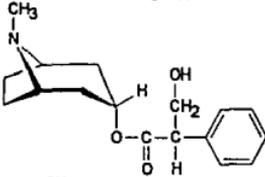
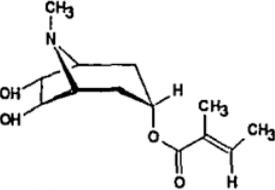
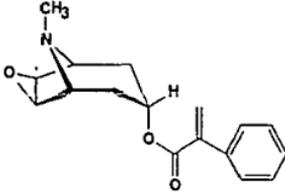
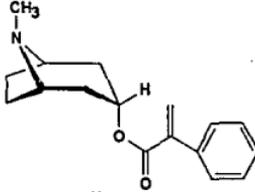
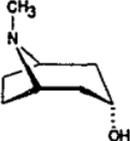
*Datura lanosa* (Solanaceae) es una especie endémica de México y que posee propiedades medicinales y tóxicas. Se conoce con el nombre común de toloache, derivado de los términos nahuatl "toloa" (para inclinar la cabeza) y "toloatzin", "toloachi", "toloache manso" y "toloache bruta" (Santamaría, 1978). Se encuentra distribuida en los estados de Sonora, Chihuahua, Durango, Sinaloa, Nayarit, Zacatecas, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Aguascalientes y México (Bye *et al.*, 1991).

Se caracteriza por tener raíces perennes gruesas, hojas planas ovadas con ápice agudo y base irregular, flores largas, con corola en forma de embudo con 5 dientes en la corola (acumen) y 5 lobulos inter-acuminales y subglobulosos, capsula torcida con dehiscencia irregular. Aunque la densidad de los tricomas puede variar, la pubescencia se encuentra en la superficie plana de la hoja, a lo largo de las venas de las hojas y corolas, en los tallos y en el pericarpio del fruto (Bye *et al.*, 1991).

Las preparaciones a base de las hojas, las raíces y las semillas aplicadas localmente se han utilizado para aliviar los padecimientos de la piel y los dolores del cuerpo. La ingestión de la planta causa delirio y otras reacciones tóxicas. Los grupos étnicos que viven dentro de su área de distribución temen y respetan esta hierba perenne, utilizándola en algunas ocasiones con fines ceremoniales (mágico-religiosos).

Los alcaloides aislados de esta especie se muestran en el Cuadro 9.

**Cuadro 9. Alcaloides aislados de *Datura lanosa*.**

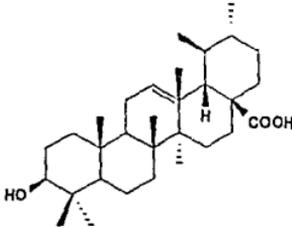
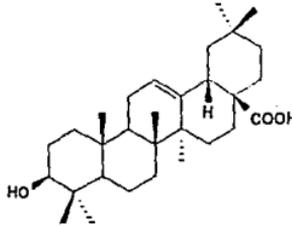
| Metabolito y referencia                   | Estructura                                                                          |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Hioscina<br>(Bye <i>et al.</i> , 1991)    |    |
| Atropina<br>(Bye <i>et al.</i> , 1991)    |    |
| Meteloidina<br>(Bye <i>et al.</i> , 1991) |    |
| Aphioscina<br>(Bye <i>et al.</i> , 1991)  |    |
| Apoatropina<br>(Bye <i>et al.</i> , 1991) |   |
| Tropina<br>(Bye <i>et al.</i> , 1991)     |  |

## 2.17. Antecedentes de *Cigarrilla mexicana*.

*Cigarrilla mexicana* (Rubiaceae) es una planta endémica de México. Se encuentra distribuida principalmente en los estados de Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí y Nuevo León. Popularmente se le conoce con los nombres de cigarra, cigarrilla, cacaloxochiltl, flor de San Pedro (Hidalgo), flor de cuervo (San Luis Potosí) y hoja de Jalapa (Chihuahua), sus hojas y corteza son extremadamente amargas y se emplean en la medicina tradicional como emético y antiparasitario.

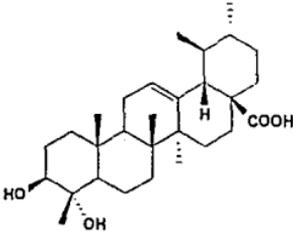
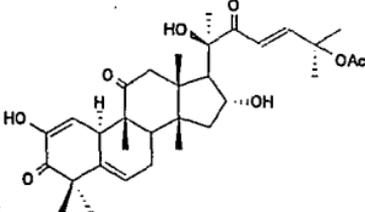
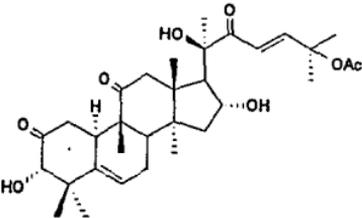
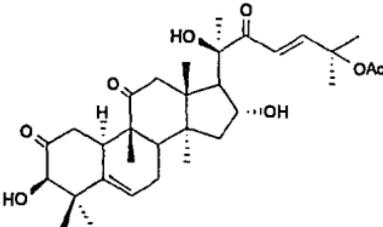
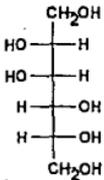
Los metabolitos secundarios aislados de esta especie se muestran en el Cuadro 10.

**Cuadro 10. Metabolitos secundarios aislados de *Cigarrilla mexicana***

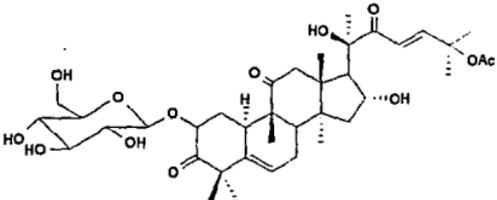
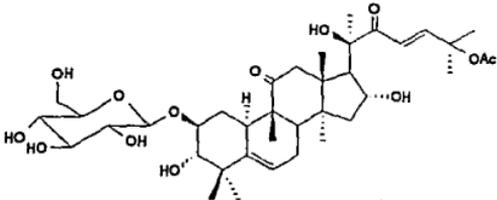
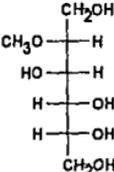
| Nombre y Referencia                             | Estructura                                                                          |
|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Acido ursólico<br>(Mata <i>et al.</i> , 1988)   |   |
| Acido oleanólico<br>(Mata <i>et al.</i> , 1988) |  |

## Cuadro 10. Metabolitos secundarios aislados de *Cigarrilla mexicana*

(Continuación).

| Nombre y Referencia                                                            | Estructura                                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Acido 3 $\beta$ -2,3-dihidro-usr-12-en-28-oico.<br>(Mata <i>et al.</i> , 1988) |    |
| Cucurbitacina E<br>(Mata <i>et al.</i> , 1988)                                 |    |
| Isocucurbitacina B.<br>(Mata <i>et al.</i> , 1988)                             |    |
| Epi-isocucurbitacina<br>(Mata <i>et al.</i> , 1988)                            |   |
| Manitol<br>(Camacho y Rios, 1988)                                              |  |

**Cuadro 10. Metabolitos secundarios aislados de *Cigarrilla mexicana* (Continuación).**

| Nombre y Referencia                                                      | Estructura                                                                        |
|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 2-β-D-glucocucurbitacina<br>B<br>(Mata <i>et al.</i> , 1988b)            |  |
| 2-β-D-glucocucurbitacina<br>F-25-Acetato<br>(Mata <i>et al.</i> , 1988b) |  |
| 2-O-metil-D-manitol<br>(Jiménez, 1992)                                   |  |

**2.18. Antecedentes de *Ratibida latipaliaris*.**

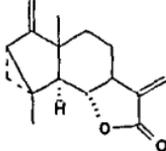
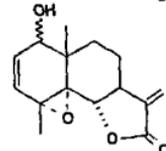
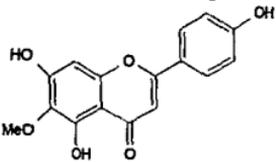
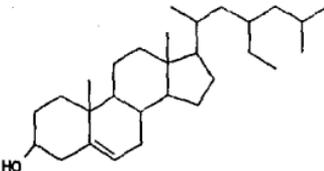
*Ratibida latipaliaris* (Asteraceae) es conocida comúnmente como "chi punuwa" o cojoyó por los indios tarahumaras. Se utiliza en el tratamiento de heridas e inflamaciones de la piel y dolores de cabeza (Richards, 1969). Es una hierba perenne, de tallo simple o ramificado que mide de 55 a 117 cm de altura, posee hojas alternas, espinosas y moteadas en ambas superficies, sus flores son amarillas y miden de 0.8 a 3.1 cm. de largo. Cabe hacer notar que esta planta es endémica del estado de Chihuahua (Richards, 1969).

Rojas y colaboradores (1992) reportaron que el extracto metanólico de esta especie posee actividad antimicrobiana contra *Candida. albicans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 20 mg/ml.

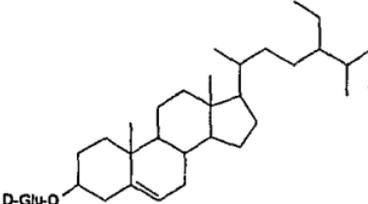
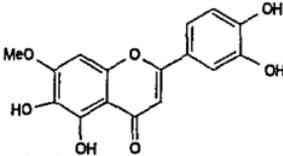
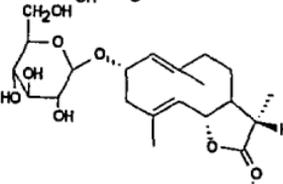
Es importante mencionar que el extracto de esta especie se empleó para la estandarización de la técnica empleada en este estudio.

Los metabolitos aislados de *Ratibida latipaliaris* se presentan en el Cuadro 11.

**Cuadro 11. Metabolitos secundarios aislados de *Ratibida latipaliaris*.**

| Metabolito y referencia                            | Estructura                                                                          |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Ratibidinolida I<br>(Mata <i>et al.</i> , 1990)    |    |
| Ratibidinolida II<br>(Rojas <i>et al.</i> , 1991)  |    |
| Hispidulina<br>(Rojas <i>et al.</i> , 1990)        |   |
| $\beta$ Sitosterol<br>(Rojas <i>et al.</i> , 1991) |  |

**Cuadro 11. Metabolitos secundarios aislados de *Ratibida latipaliaris* (Continuación).**

| Nombre y Referencia                                                                                                                                                                                                        | Estructura                                                                        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| <p><math>\beta</math>-D-glucositosterol<br/>(Jiménez, 1992)</p>                                                                                                                                                            |  |
| <p>Pedalitina.<br/>(Jiménez, 1992)</p>                                                                                                                                                                                     |  |
| <p>2-<math>\alpha</math>-<math>\beta</math>-D-glucopiranosil-<math>\Delta^{1(10),4(5)}</math>-<br/>germacradien-6<math>\alpha</math>,7<math>\beta</math>,11<math>\beta</math>-olida.<br/>(Jiménez <i>et al.</i>, 1992)</p> |  |

**2.19. Antecedentes de *Dyssodia papposa*.**

*Dyssodia papposa* (Asteraceae) es una planta conocida en el Estado de Chihuahua con el nombre común de hierba del arriero. Se ha empleado como antiséptico y como un agente antidiarreico (Bye, comunicación personal, 1994).

Desde el punto de vista fitoquímico, la especie no ha sido objeto de estudio por lo que se desconoce su contenido metabólico secundario.

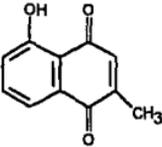
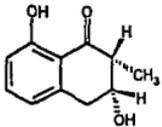
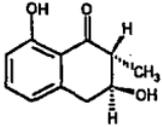
## 2.20. Antecedentes de *Plumbago scandens*.

*Plumbago scandens* (Plumbaginaceae) se conoce vulgarmente con los nombres de canutillo (Sinaloa); hierba del alacrán (Sinaloa, Jalisco, Oaxaca, San Luis Potosí, Guanajuato), hierba del negro y dentelaria (Oaxaca), lagaña de perro (Morelos), Chapak, embeles, jazmín azul (Yucatán), turicua (Tamaulipas), tlepatli (lengua azteca), pegajoso (Tamaulipas y Sinaloa), belesa (Chiapas) (Martínez, 1989). Es una planta subarborescente y subtrepadora de 1-3 m., presenta hojas alternas, oblongas a ovadas, acuminadas y con la base aguda. La inflorescencia glandular y en espigas. Las flores son blancas y tubulosas. (Martínez, 1979). La raíz y las partes aéreas de especie es usada en Chihuahua por los indios tarahumaras para el tratamiento de desordenes gastrointestinales y para el reumatismo.

Recientemente, se demostró la actividad antimicrobiana del extracto contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Candida albicans* (Hoffman *et al.*, 1993).

Los metabolitos secundarios aislados de esta especie se presentan en el Cuadro 12. De los componentes aislados de la especie, la plumbagina presenta propiedades bactericida y fungicida (Gonçalves *et al.*, 1968). Por otra parte, este compuesto fué empleado tópicamente en pacientes con cáncer de piel mostrando una completa recuperación (Melo *et al.*, 1974).

## Cuadro 12. Metabolitos secundarios aislados de *Plumbago scandens*.

| Nombre y referencia                                        | Estructura                                                                        |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Plumbagina<br>(Gonçalves <i>et al.</i> , 1968)             |  |
| Isoshinanolona<br>(Bhattacharyya <i>et al.</i> , 1986)     |  |
| Epi-isoshinanolona<br>(Bhattacharyya <i>et al.</i> , 1986) |  |

### 2.21. Antecedentes de *Malmea depressa*.

*Malmea depressa* (Stanley y Steyermark, 1946) (Annonaceae) se conoce con los nombres comunes de elemuy (Veracruz), nazareno prieto (Oaxaca), elemuy-box (Yucatán), boxe'lemuy, chicharón, eklemuy o sufricaya (Quintana Roo). Los frutos se consumen por los pájaros y algunas veces por la gente. La madera es aromática. Crece en la selva húmeda o ligeramente abajo del nivel del mar. Se encuentra en Petén, Izabal, América Central y el Caribe. En México crece desde Veracruz hasta la Península de Yucatán. Se caracteriza por ser un árbol de aproximadamente 10 m de alto, con corteza grisacea, tiene aproximadamente 20 cm de diámetro, posee hojas pecioladas, lanceoladas,

aelípticas; inflorescencias terminales y hojas opuestas. La decocción de la corteza y de las hojas de la especie se ingieren para destruir los cálculos hepáticos, renales y vesicales. Los machacados acuosos en forma de baño se aplican externamente para el tratamiento de la gonorrea, leucorrea y para la pelagra (Martínez, 1989).

Desde el punto de vista fitoquímico la especie no ha sido objeto de estudio por lo que desconoce su composición química.

### **2.22. Antecedentes de *Geranium niveum*.**

*Geranium niveum* S. Wats. (Geraniaceae) es una planta que crece en el estado de Chihuahua. La raíz del *Geranium niveum* se utiliza como purgante (Bye, comunicación personal, 1994). Desde el punto de vista fitoquímico la especie no ha sido objeto de estudio.

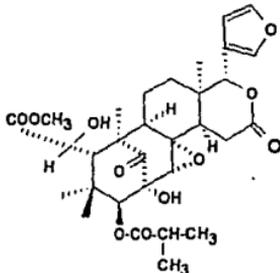
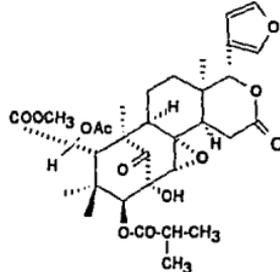
### **2.23. Antecedentes de *Swietenia humilis*.**

*Swietenia humilis* Zucc. (Meliaceae) en Guerrero se conoce con los nombres comunes de zopilote y cobano, en Sinaloa y Nayarit con el nombre de flor de venadillo en Oaxaca con los nombres de palo de zopilote, mova y ma-hu en Puebla como guayacach, en Veracruz como cóbanu y en la lengua Azteca como "tzopilotlsontecómali". Es un árbol que mide de 10-25 m. con hojas compuestas de 2-5 pares de hojuelas de 5-9 cm. y elíptico-lanceolados, acuminadas, lisas; flores blancas de 5 mm.; fruto cápsula leñosa de 15-20 cm. con semillas aladas de 6-9 (Martínez, 1979). Crece comúnmente en la zona

tropical de México, en los estados de Guerrero, Michoacán, Colima, Sinaloa y Chiapas, donde los árboles se encuentran generalmente dispersos. Las semillas de este árbol son muy valiosas en algunas regiones de México por sus propiedades medicinales. La infusión de las semillas es usada como antihelmíntico y para curar la amibiasis. También se consideran efectivas para el tratamiento del dolor de pecho, tos y cáncer.

Los metabolitos secundarios aislados de *Swietenia humilis* se presentan en el Cuadro13

**Cuadro 13. Metabolitos secundarios de *Swietenia humilis*.**

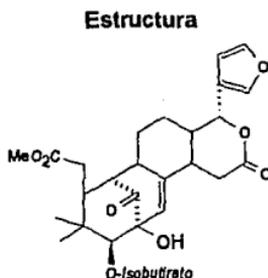
| Nombre y referencia                                    | Estructura                                                                         |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Humilinolida A<br>(Segura-Correa <i>et al.</i> , 1993) |   |
| Humilinolida B<br>(Segura-Correa <i>et al.</i> , 1993) |  |

**Cuadro 13. Metabolitos secundarios aislados de *Swietenia humillis*  
(Continuación).**

| Nombre y referencia                                                             | Estructura |
|---------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Humilinglida C<br>(Segura-Correa <i>et al.</i> , 1993)                          |            |
| Humilinolida D<br>(Segura-Correa <i>et al.</i> , 1993)                          |            |
| Humilina B<br>(Okorie y Taylor, 1971)                                           |            |
| Metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-<br>3-tiglato<br>(Okorie y Taylor, 1971) |            |

**Cuadro 13. Metabolitos secundarios aislados de *Swietenia humillis* (Continuación).**

**Nombre y referencia**  
Metil-2,3-dihidroxi-meliac-8(30)-enato-  
3-isobutirato  
(Okorie y Taylor, 1971)



**2.24. Antecedentes de *Conyza filaginoides*.**

*Conyza filaginoides* (D.C.) Hienon (Asteraceae) se conoce con los nombres comunes de simonillo, zacatechichi (hierba amarga) y zacatechichic. Se localiza principalmente en el Valle de México, Morelos, Michoacán, Hidalgo y Oaxaca. La planta completa se utiliza para trastornos gastrointestinales como el meteorismo (acumulación de gases en el intestino) y la constipación (estreñimiento), también se emplea para mitigar los dolores de vesícula biliar. Es una planta herbácea de 30-40 cm., de hojas alternas, lanosas, elípticas, dentadas de 3-4 cm., con inflorescencias terminales y flores en cazuelas. Esta planta tiene un sabor muy amargo.

Los metabolitos secundarios aislados de *Conyza filaginoides* incluyen el triacontano,  $\beta$ -spinasterol y la  $\beta$ -amirina (Dominguez *et al.*, 1972).

## **2.25. Antecedentes de *Commelina erecta*.**

*Commelina erecta* c.f. (Commelinaceae) es una planta conocida con el nombre común de hierba del pollo, en Coahuila como espuelitas, en Tabasco como mataliste y mataliz, en la lengua Maya en Yucatán se conoce como "pah-tsé", "x-habul-ha" y "ya'ax-ha-xiu". La planta se emplea como agente antiinflamatorio. Se administra sola o mezclada con la sanguinaria y el cuachalalate (Bye, comunicación personal, 1994). Esta planta es herbácea, anual, de 40 cm. a 1.2 m. de hojas lanceoladas, oval-lanceoladas, acuminadas, de base redondeada, envainantes, de 4-6 cm. y con flores azules de 1-2.5 cm. Planta común en todo el país.

Desde el punto de vista fitoquímico la especie no ha sido objeto de estudio por lo que se desconoce su composición química.

## **2.26. Antecedentes de *Hyptis verticillata*.**

*Hyptis verticillata* Jacq. (Lamiaceae) comúnmente llamada hierba martina (Oaxaca) o hierba negra (Veracruz), es una planta que se caracteriza por ser un arbusto perenne de 1 a 3 m de alto, sus ramas son delgadas, alargadas, puberulentas, a veces revestidas con pelos extendidos más largos; láminas foliares elípticas u oblongolanceoladas, de 3 a 10 cm de largo, agudas en el ápice, estrechadas en la base, semicuneiformes, agudamente aserradas, ambas superficies delicadamente pubescentes, peciolos de 5 a 10 mm. de largo, las hojas más superiores subsésiles; flores en verticilios, apretadas en glomérulos globulosos, que son en generales monoliformes y comunmente apanojadas; tubo de caliz en la flor de 1 mm de largo, caso glabro; corola blanca o violeta claro, su tubo de 2 m de largo; núculas oblongas, de 1.3 mm de largo, redondo

truncadas en el ápice, menudamente reticuladas. En México se encuentra distribuida en los estados de Veracruz, Puebla, San Luis Potosí y Oaxaca.

Se emplea popularmente en infusiones o como cataplasma en los casos de dolor de cabeza y de estómago, para aliviar la sarna, los piquetes de mosco, la mordedura de víbora, enfermedades del aparato respiratorio, malestares de las articulaciones; hemostático, antiparasitario, antihelmíntico, diurético y carminativo (Gascón-Figueroa, 1989; Heinrich, 1992).

Desde el punto de vista biológico el extracto metanólico de esta especie demostró actividad antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 20 mg/ml. Es importante mencionar que esta especie se utilizó para la estandarización de la técnica empleada en este estudio.

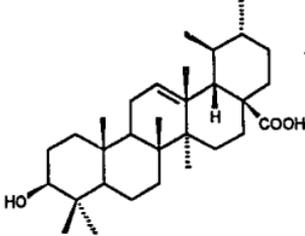
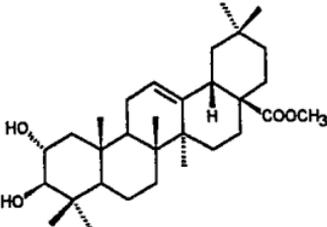
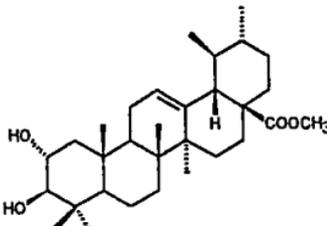
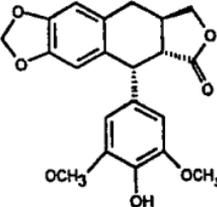
El estudio fitoquímico de esta especie permitió el aislamiento de los metabolitos que se describen en el Cuadro 14.

#### Cuadro 14. Metabolitos secundarios aislados de *Hyptis verticillata*.

| Metabolito y referencia                                     | Estructura. |
|-------------------------------------------------------------|-------------|
| 5,3',4',-trihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona<br>(Cruz, 1991). |             |
| Acido oleanólico<br>(Cruz, 1991).                           |             |

**Cuadro 14. Metabolitos secundarios aislados de *Hyptis verticillata*.**

**(Continuación).**

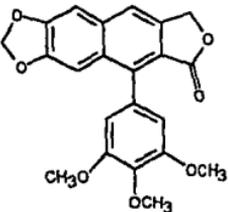
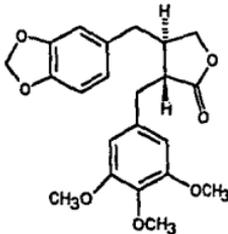
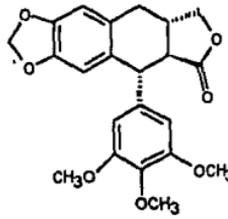
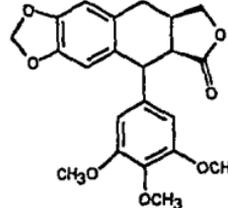
| <b>Metabolito y referencia</b>                                               | <b>Estructura.</b>                                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Acido ursólico<br>(Cruz, 1991)                                               |    |
| Acido maslínico<br>(Cruz, 1991)                                              |    |
| Acido 2 $\alpha$ -hidroxiursólico<br>(Cruz, 1991)                            |   |
| 4'-desmetildesoxipodofiloxina<br>(German, 1971; Novelo <i>et al.</i> , 1993) |  |

**Cuadro 14. Metabolitos secundarios aislados de *Hyptis verticillata*.  
(Continuación).**

| Metabolito y referencia                                          | Estructura. |
|------------------------------------------------------------------|-------------|
| 5-metoxideshidropodofilotoxina<br>(Novelo <i>et al.</i> , 1993). |             |
| β-pellantina                                                     |             |
| Deshidro-β-pellantina<br>(Novelo <i>et al.</i> , 1993).          |             |
| Deshidropodofilotoxina<br>(Novelo <i>et al.</i> , 1993).         |             |

**Cuadro 14. Metabolitos secundarios aislados de *Hyptis verticillata*.**

**(Continuación).**

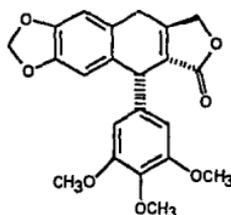
| Metabolito y referencia                                        | Estructura.                                                                         |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Deshidròdesoxipodofilotoxina<br>(Novelo <i>et al.</i> , 1993). |    |
| (-) Yateína<br>(Novelo <i>et al.</i> , 1993).                  |    |
| Isodesoxipodofilotoxina<br>(Novelo <i>et al.</i> , 1993).      |   |
| Desoxipicropodofilotoxina<br>(Novelo <i>et al.</i> , 1993).    |  |

**Cuadro 14. Metabolitos secundarios aislados de *Hyptis verticillata*.  
(Continuación).**

**Metabolito y referencia**

$\beta$ -Apopicropodofilotoxina  
(Novelo *et al.*, 1993).

**Estructura.**



**2.27. Antecedentes de *Cnidosculus herbaceus* y *Cnidosculus tehuacanensis*.**

*Cnidosculus herbaceus* y *Cnidosculus tehuacanensis* (Euphorbiaceae), son especies endémicas de Tehuacan Puebla, conocidas con el nombre vulgar de mala mujer y no se les conoce ninguna propiedad medicinal (Rico-Gray, 1994, comunicación personal).

**2.28. Antecedentes de *Perityle batopilensis*.**

*Perityle batopilensis* Powel (Asteraceae) conocida en el estado de Chihuahua como manzanilla del campo, es una planta que se utiliza para curar los granos y otras afecciones de la piel (Bye, comunicación personal 1994).

## **Antecedentes de *Ptelea trifoliata*.**

*Ptelea trifoliata* L. (Rutaceae), se encuentra distribuida en los estados de Sonora a Tamaulipas y en Oaxaca. Se caracteriza por ser un arbusto o arbolillo hasta de 1 m, de olor desagradable, hojas alternas con tres hojuelas trifoliadas, flores blanco-verdosas, fruto una sámara de 1-2.5 cm. Se conoce con los nombres comunes de vara de zorro, cola de zorrillo, "upaga" (Chihuahua), pinacatillo (Coahuila) y zorrillo (Barranca de Tolantongo, Hidalgo). En México la corteza se emplea como remedio para la dispepsia, dolores de cabeza, el reumatismo y catarro. También se ha descrito su uso como antiséptico, y antiparasitario. Por otra parte, Mulvey y Zalewski (1969) reportaron que esta especie se emplea como anticonvulsivante, antipirético, antiasmático, expectorante, descongestionante y estómaquico en las formas de tintura, trituración, infusión y polvo.

Desde el punto de vista biológico, Mitscher y colaboradores (1975) encontraron que el extracto etanólico de las partes aéreas de *Ptelea trifoliata* posee actividad antimicrobiana contra *Mycobacterium smegmatis* y contra *Candida albicans*. El subsecuente fraccionamiento permitió demostrar que el alcaloide quinolínicu cuaternario cloruro de pteleatinio es el agente responsable de la actividad antimicrobiana.

Desde el punto de vista fitoquímico, la especie ha sido ampliamente estudiada y en el Cuadro 15 se muestran los metabolitos secundarios aislados en el cual se indica la parte del vegetal estudiada. Estos compuestos incluyen principalmente alcaloides quinolínicos y algunas cumarinas.

**Cuadro 15. Metabolitos secundarios aislados de *Ptelea trifoliata*.**

| Metabolito y referencia.                               | Estructura |
|--------------------------------------------------------|------------|
| Kukosaginina (Hojas)<br>(Kowalska and Borkowski, 1966) |            |
| Skimmianina (Hojas)<br>(Kowalska and Borkowski, 1966). |            |
| Dictamina (Raíz)<br>(Kowalska and Borkowski, 1966).    |            |
| Hidroxilunina (Flor)<br>(Reisch <i>et al.</i> , 1969)  |            |
| Ptelefolina (Flor)<br>(Reisch <i>et al.</i> , 1969).   |            |
| Ptelefolidina<br>(Reisch <i>et al.</i> , 1970a)        |            |

**Cuadro 15. Metabolitos secundarios aislados de *Ptelea trifoliata*.**

**(Continuación).**

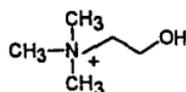
| <b>Metabolito y referencia.</b>                                           | <b>Estructura</b> |
|---------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Ptelefolona (flor)<br>(Reisch <i>et al.</i> , 1970)                       |                   |
| Ptelefructina<br>(Reisch <i>et al.</i> , 1970)                            |                   |
| Aurapteno (Hojas, flores y frutos)<br>(Novak <i>et al.</i> , 1970).       |                   |
| Hiperoside (Hojas, flores y frutos)<br>(Novak <i>et al.</i> , 1970).      |                   |
| Hidroxilunidina (Hojas, flores y frutos)<br>(Novak <i>et al.</i> , 1970). |                   |

**Cuadro 15. Metabolitos secundarios aislados de *Ptelea trifoliata*  
(Continuación).**

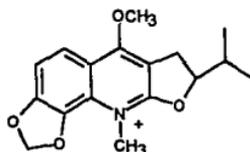
**Metabolito y referencia.**

**Estructura**

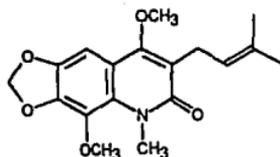
Colina (Hojas, flores y frutos)  
(Novak *et al.*, 1970).



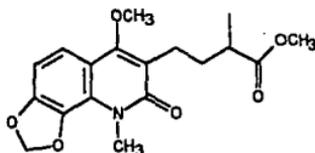
O-metiluninio (Hojas, flores y frutos)  
(Novak *et al.*, 1970).



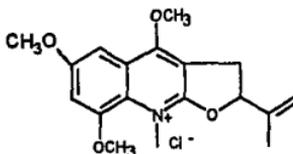
Ptelecortina (Corteza)  
(Reish *et al.*, 1972)



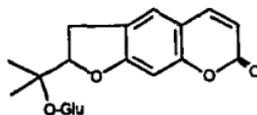
Pteleolina (Corteza)  
(Reish *et al.*, 1972)



O-Metiltelefolonio (Corteza)  
(Reisch *et al.*, 1973)



Nodakenina (Corteza)  
(Reisch *et al.*, 1973)



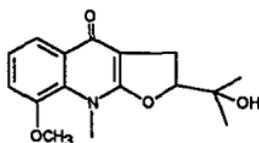
**Cuadro 15. Metabolitos secundarios aislados de *Ptelea trifoliata***

**(Continuación).**

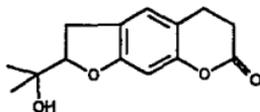
**Metabolito y referencia.**

**Estructura**

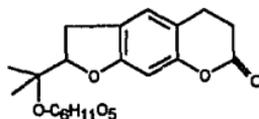
Balfourođina (Hojas)  
(Szendrei *et al.*, 1973)



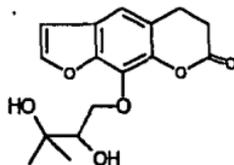
Marmesina (Hojas)  
(Szendrei *et al.*, 1973)



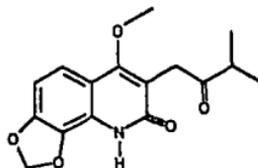
Marmesinina (Hojas)  
(Szendrei *et al.*, 1973)



Biakangelicina (Hojas)  
(Szendrei *et al.*, 1973)



N-demetillunidonina (Hojas)  
(Szendrei *et al.*, 1974)



**Cuadro 15. Metabolitos secundarios aislados de *Ptelea trifoliata***

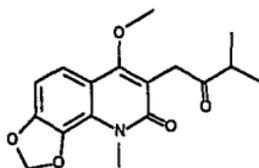
**(Continuación).**

**Metabolito y referencia.**

Lunidonina (Hojas)

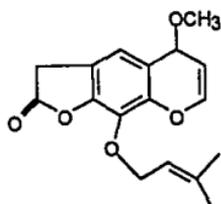
(Szendrei *et al.*, 1974)

**Estructura**



Felopterina (Hojas)

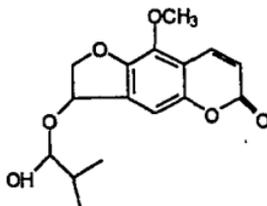
(Szendrei *et al.*, 1974)



5-metoxi-8-(2'-hidroxi-3'-metilbuten-3'-

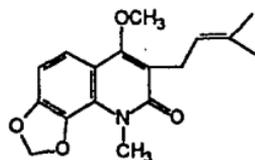
iloxi)furocumarina (Hojas)

(Szendrei *et al.*, 1974)



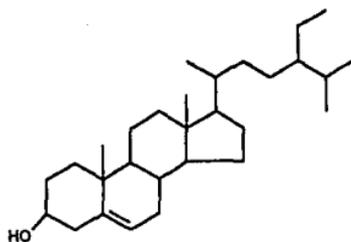
Pteleprenina

(Korosi *et al.*, 1974)



$\beta$ -sitosterol (corteza)

(Mitscher *et al.*, 1975)



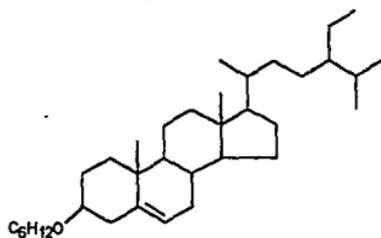
**Cuadro 15. Metabolitos secundarios aislados de *Ptelea trifoliata*  
(Continuación).**

**Metabolito y referencia.**

$\beta$ -D-Glucositolsterol (corteza)

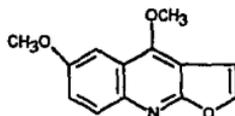
(Mitscher *et al.*, 1975)

**Estructura**



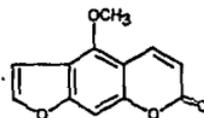
Pteleina (corteza)

(Mitscher *et al.*, 1975)



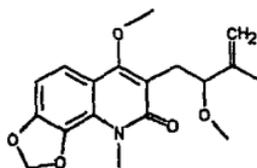
Bergapteno (corteza)

(Mitscher *et al.*, 1975)



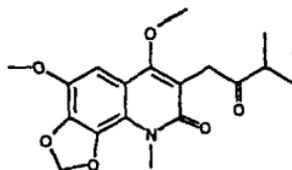
Ptelefolina metil eter (corteza)

(Mitscher *et al.*, 1975)



6-metoxi-lunidonina (corteza)

(Mitscher *et al.*, 1975)



**Cuadro 15. Metabolitos secundarios aislados de *Ptelea trifoliata*.**

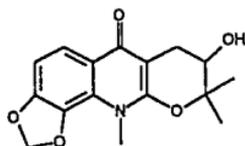
**(Continuación).**

**Metabolito y Referencia**

**Estructura**

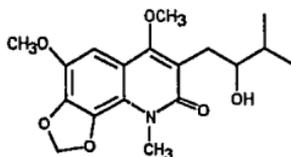
Neo-hidroxilunina (corteza)

(Mitscher *et al.*, 1975)



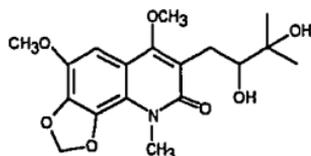
6-metoxi-lunidina (corteza)

(Mitscher *et al.*, 1975)



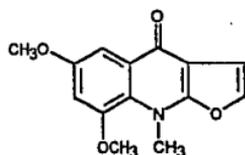
6-metoxi-hidroxilunidina (corteza)

(Mitscher *et al.*, 1975)



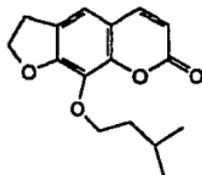
Isomaculasidina (corteza)

(Mitscher *et al.* 1975)



Imperatorina (corteza)

(Reish *et al.*, 1975)



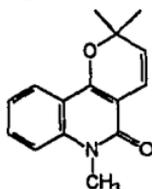
**Cuadro 15. Metabolitos secundarios aislados de *Ptelea trifoliata*  
(Continuación).**

**Metabolito y referencia.**

**Estructura**

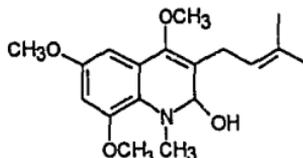
N-metilflindersina (corteza)

(Reish *et al.*, 1975)



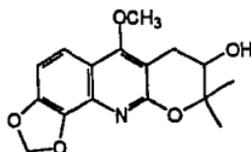
4,6,8-trimetoxi-3-(3,3-dimetilalil-N-  
metilquinolin-2-ol. (corteza)

(Reish *et al.*, 1975).



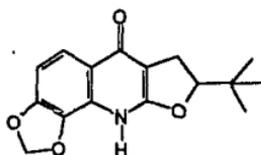
Pteleflorina (Flor)

(Reisch *et al.*, 1975)



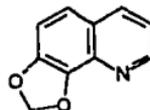
Ptelefolidona (Flor)

(Reisch *et al.*, 1975)



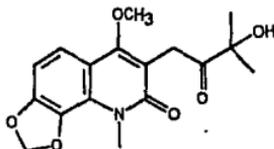
7,8-metilendioxiquinolina

(Reisch *et al.*, 1975)



Hidroxilunidonina (Flor)

(Reisch *et al.*, 1975)



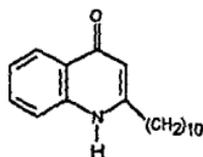
**Cuadro 15. Metabolitos secundarios aislados de *Ptelea trifoliata*  
(Continuación).**

**Metabolito y referencia.**

2-n-Undecil-4-quinolinona (Flor)

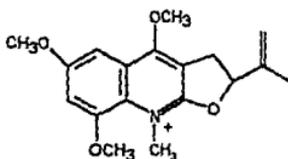
(Szendrei *et al.*, 1975)

**Estructura**



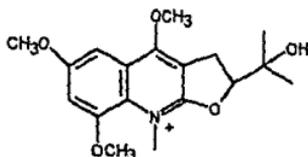
O-Metilptelefolonio (Corteza)

(Korosi *et al.*, 1976)



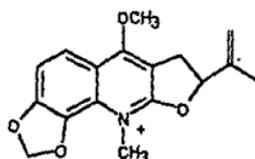
O-metilhidroxiptelefolonio (Corteza)

(Korosi *et al.*, 1976)



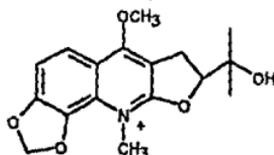
O-metilptelefolidonio (corteza)

(Korosi *et al.*, 1976)



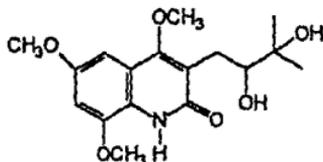
O-metilhidroxiluninio (corteza)

(Korosi *et al.*, 1976)



Ptelefolinol

(Korosi *et al.*, 1976)

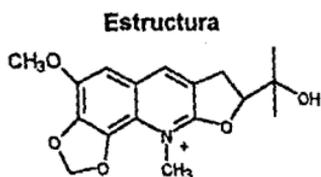


**Cuadro 15. Metabolitos secundarios aislados de *Ptelea trifoliata*.**

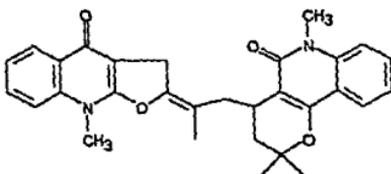
**(Continuación).**

**Metabolito y referencia.**

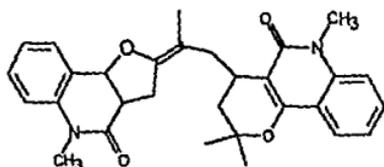
6-metoxihidroxilunidinio(corteza)  
(Korosi *et al.*, 1976)



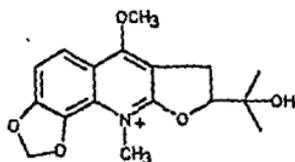
Pteledimerina (corteza)  
(Reisch *et al.*, 1978)



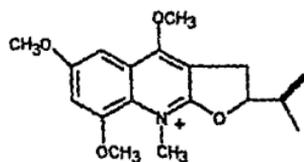
Pteledimeridina (corteza)  
(Mester *et al.*, 1979)



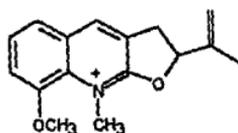
(-) (s) Hidroxilunidinio (corteza)  
(Rideau *et al.*, 1979)



(+) Ptelefolonio (corteza)  
(Rideau *et al.*, 1979)



Cloruro de ptelecultinio (corteza)  
(Petit-Paly *et al.*, 1989)



## Cuadro 15. Metabolitos secundarios aislados de *Ptelea trifoliata*

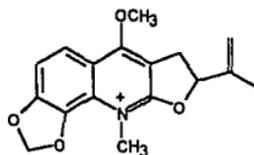
(Continuación).

### Metabolito y referencia.

Ptelefolidonium (corteza)

(Petit-Paly *et al.*, 1989)

### Estructura



Algunos de los metabolitos incluidos en el Cuadro 15 han sido objeto de estudio biológico. Chêneaux y colaboradores (1976) describieron que los alcaloides dihidrofuroquinoleínicos cuaternarios, cloruro de balfouridinio y cloruro de ptelefolonio presentaban actividad antimitótica a muy bajas concentraciones sobre células animales y vegetales. Por otra parte, Rideau y colaboradores (1979) describieron que los extractos acuosos de las sales de cloruro de ptelefolonio y cloruro de balfouridinio exhiben una prominente acción citotóxica contra células tumorales de plantas y presentaban actividades inhibitorias del crecimiento de plantas a concentraciones del orden de  $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  M.

El cloruro de ptelefolonio posee actividad citotóxica marcada comparable a las del 5-fluorouracilo, metil- $\beta$ -nitrostireno y a la de la ciclohexamida, contra células renales de monos, células tumorales KB ( $DE_{50}$ :  $10^{-5}$  M) y células diploides humanas Wi 38 ( $DE_{50}$ :  $3.1 \times 10^{-5}$  M). Este compuesto posee también actividad antimicrobiana considerable sobre las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus*, a concentraciones de  $10^{-4}$  a  $10^{-3}$  M, rango de concentraciones en las cuales la inhibición del crecimiento bacteriano es total (Rideau, 1979).

### 3. JUSTIFICACION.

En México existen cientos de plantas que son utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas infecciones o para afecciones asociadas con el padecimiento del cáncer. Sin embargo, la proporción de éstas que ha sido objeto de estudios biológicos es muy pequeña. En consecuencia y considerando también los antecedentes mencionados, se planteó un proyecto de investigación de carácter multidisciplinario con miras a la búsqueda de agentes antimicrobianos y citotóxicos a partir de plantas utilizadas en la medicina tradicional. Muchas de estas especies constituyen fuentes potenciales de agentes antimicrobianos y citotóxicos como lo han demostrado los estudios recientes realizados en los laboratorios de Fitoquímica del departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM. (Rojas *et al.*, 1992; Mata, 1993; Novelo *et al.*, 1993; Pereda-Miranda *et al.*, 1993). Estas investigaciones han permitido no sólo la validación del uso popular como agentes antisépticos de varias especies sino también el hallazgo de principios activos con propiedades antimicrobianas y citotóxicas.

La presente investigación contempla la valoración de las propiedades antimicrobianas de los extractos metanólicos derivados de algunas especies utilizadas como agentes antisépticos en la medicina popular. También se evaluará el potencial tóxico para *Artemia salina* y se determinará la citotoxicidad de cada uno de los extractos que resulten más activos en este ensayo. Mediante estas evaluaciones preliminares se detectarán los candidatos idóneos para posteriores estudios químicos biodirigidos conducentes al aislamiento de los principios activos.

#### HIPOTESIS.

Las plantas utilizadas en la medicina tradicional como agentes antisépticos y para el tratamiento de afecciones asociadas con el padecimiento del cáncer presentan actividades antibacterianas, antifúngicas o citotóxicas potenciales demostrables farmacológicamente.

#### 4. OBJETIVOS.

El objetivo fundamental de este trabajo es realizar una evaluación del potencial antimicrobiano y citotóxico de especies vegetales seleccionadas para la detección de productos naturales antimicrobianos y antitumorales.

Para el cumplimiento del objetivo general se contemplan los siguientes objetivos específicos:

1. Seleccionar algunas especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional con propiedades antisépticas y anticancerígenas potenciales con base en su uso popular.

2. Recopilar la información botánica, etnobotánica y química de cada una de las especies seleccionadas.

3. Preparar los extractos vegetales de las plantas seleccionadas mediante un proceso de maceración y utilizando de manera general metanol como disolvente.

4. Determinar la actividad antimicrobiana cualitativa de los extractos vegetales preparados a partir de las especies seleccionadas.

5. Determinar la actividad antimicrobiana cuantitativa de los extractos que resultasen activos en las evaluaciones cualitativas.

6. Determinar la toxicidad para *Artemia salina* de los extractos derivados de cada una de las especies seleccionadas.

7. Determinar la actividad citotóxica en diferentes líneas celulares derivadas de tumores humanos de los extractos que resultasen activos en el ensayo contra *Artemia salina*.

8. Detectar los candidatos idóneos para futuras investigaciones fitoquímicas encaminadas a la obtención de productos naturales antimicrobianos y antitumorales.

9. Contribuir al conocimiento de los elementos constitutivos de la flora medicinal mexicana.

10. Correlacionar en lo posible los resultados obtenidos en la información previamente descrita en la literatura con la información etnobotánica y la actividad biológica de cada una de las especies estudiadas.

11. Fomentar la investigación multidisciplinaria en México.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. Material vegetal y preparación de los extractos vegetales.

Las especies objeto de estudio y su procedencia se indican en el Cuadro 16. Una muestra de referencia de cada una de ellas se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (MEXU), Instituto de Biología, UNAM o el Herbario del Instituto de Ecología (XAL) Jalapa, Veracruz.

Las plantas se secaron a temperatura ambiente y se pulverizaron en un molino de cuchillos modelo Willey N 4. Para preparar el extracto, 100 g de material vegetal desecado y molido se extrajo con metanol mediante un proceso de maceración y en casos particulares se utilizó también cloroformo como disolvente de extracción. Por último, todos los extractos se concentraron a sequedad mediante un rotaevaporador.

### 5.2. Determinación de la actividad antimicrobiana.

#### 5.2.1. Operaciones preliminares a la realización de los bioensayos.

##### a) Microorganismos de prueba y medios de cultivo.

El estudio se llevó a cabo utilizando cepas de microorganismos ATCC (American Type Culture Collection) que incluyen bacterias (Gram positivas y Gram negativas), una levadura y dos hongos. El Cuadro 17 se indican los microorganismos de prueba y se menciona también las condiciones de incubación y los medios de reactivación y de conservación apropiados para cada uno de ellos.

**Cuadro 16. Especies vegetales objeto de evaluación.**

| Voucher<br>Bye y<br>Linares. | Especie vegetal<br>(Familia)                                                             | Procedencia                           | Parte<br>utilizada  |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| 18004                        | <i>Ilex rubra</i> S. Wats.<br>(Aquifoliaceae)                                            | Mpio. Urique,<br>Chihuahua            | Planta<br>entera    |
| 18015                        | <i>Elytraria imbricata</i> (Vahl) Pers.<br>(Acanteceae)                                  | Mpio. Batopilas,<br>Chihuahua         | Planta<br>entera    |
| 18016                        | <i>Cardiospermum corindum</i> L.<br>fma. <i>villosum</i> (Mill.) Radlk.<br>(Sapindaceae) | Mpio. Batopilas,<br>Chihuahua         | Fruto               |
| 18029                        | <i>Ptelea trifoliata</i> L.<br>(Rutaceae)                                                | Mpio. Batopilas,<br>Chihuahua         | Corteza y<br>Madera |
| 18030                        | <i>Perityle batopilensis</i> Powel<br>(Asteraceae)                                       | Mpio. Batopilas,<br>Chihuahua         | Planta<br>entera    |
| 15620                        | <i>Datura lanosa</i><br>(Solanaceae)                                                     | La Bufa,<br>Chihuahua                 | Hoja                |
| 19782                        | <i>Cigarrilla mexicana</i><br>(Rubiaceae)                                                | Rio verde,<br>S.L.P.                  | Hoja                |
| 18335                        | <i>Ratibida latipaliaris</i> Richards<br>(Asteraceae)                                    | Mpio. Guacho-<br>chic, Chihuahua      | Raiz                |
| 18238                        | <i>Dyssodia papposa</i> (Vent)<br>Hitc.<br>(Asteraceae)                                  | Mpio. Chihua-<br>hua, Chihuahua.      | Planta<br>entera    |
| 18054                        | <i>Geranium niveum</i> S Wats.<br>(Geraniaceae)                                          | Mpio. Batopilas,<br>Chihuahua         | Raiz                |
| 18865                        | <i>Conyza filaginoides</i> (DC.)<br>Hienon<br>(Asteraceae)                               | Región de Ju-<br>chitepec,<br>México  | Planta<br>entera    |
| 18177                        | <i>Anredera Cf. scandens</i> (L.) Moq.<br>(Basellaceae)                                  | Desconocida,<br>puede ser<br>Veracruz | Rizoma              |

Cuadro 16. Especies objeto de evaluación (Continuación).

| Voucher Bye y Linares. | Especie vegetal (Familia)                                               | Procedencia                         | Parte utilizada |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| 17847                  | <i>Commelina cf. erecta</i><br>(Commelinaceae)                          | Apizaco rumbo a Tlaxcala            | Planta entera   |
| 18105                  | <i>Galphimia glauca</i> Cav.<br>(Malpighiaceae)                         | Ayutla, Guerrero.                   | Flor            |
| 18872                  | <i>Lepidium virginicum</i> L.<br>(Cruciferaeae)                         | Mpio. Coacalco, México              | Planta completa |
| 17743                  | <i>Kohleria deppeana</i><br>(Schlecht & Cham) Fritsch<br>(Gesneriaceae) | Pahuatlán, Puebla                   | Hojas y flores  |
| 18824                  | <i>Swietenia humillis</i><br>(Meliaceae)                                | Quintana Roo                        | Semillas        |
| 17744                  | <i>Tournefortia hirsutissima</i> L.<br>(Boraginaceae)                   | Pahuatlán, Puebla                   | Tallo           |
| 18780                  | <i>Acalypha phleoides</i><br>(Euphorbiaceae)                            | Mpio Atlautla, San Juan Tepecoculco | Planta completa |
| 18058                  | <i>Helianthella quinquenervis</i><br>(Asteraceae)                       | Mpio Bocoyna, Chihuahua             | Raíz            |
| 18938                  | <i>Heliopsis longipes</i><br>(Asteraceae)                               | Mpio Rio Verde Chihuahua            | Raíz            |
| 18677                  | <i>Bunchosia lindeniana</i><br>(Malpighiaceae)                          | Chihuahua                           | Tallo y hoja    |
| 18013                  | <i>Plumbago scandens</i> L.<br>(Plumbaginaceae)                         | Mpio. Batopilas, Chihuahua          | Corteza y hojas |
| 431167                 | <i>Hyptis verticillata</i> (Jacq).<br>(Lamiaceae)                       | San Juan Guichicovi, Oaxaca         | Partes aereas   |

Cuadro 16. Especies objeto de evaluación (Continuación).

| Voucher Anaya.                      | Especie vegetal (Familia)                           | Procedencia           | Parte utilizada  |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------|------------------|
| 1993-2                              | <i>Malmea depressa</i><br>(Annonaceae)              | Quintana Roo          | Corteza y Madera |
| 1993-1                              | <i>Metopium brownei</i><br>(Anacardiaceae)          | Quintana Roo          | Madera y corteza |
| 1993-3                              | <i>Stenorrhynchus lanceolatus</i><br>(Orchidaceae)  | Quintana Roo          | Planta entera    |
| Voucher Palacios-Rios y V.Rico-Gray | Especie vegetal (Familia)                           | Procedencia           | Parte utilizada  |
| 3503-Xal                            | <i>Pteridium arachnoideum</i><br>(Dennstaedtiaceae) | Mpio Xalapa, Veracruz | Planta entera    |
| Voucher J.I. Calzada.               | Especie vegetal (Familia)                           | Procedencia           | Parte utilizada  |
| 366-7 Xal                           | <i>Cnidosculus herbaceus</i><br>(Euphorbiaceae)     | Veracruz              | Planta entera    |
| Voucher J.A. Zavala.                | Especie vegetal (Familia)                           | Procedencia           | Parte utilizada  |
| 63-Xal                              | <i>Cnidosculus tehuacanensis</i><br>(Euphorbiaceae) | Puebla                | Planta entera    |

**CUADRO 17. Microorganismos de prueba y medios de cultivo.**

| Grupo de microorganismo |                | Microorganismo                                    | Condiciones de incubación | Medio de reactivación *             | Medio de conservación*           |
|-------------------------|----------------|---------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| Bacterias               | Gram positivo  | <i>Staphylococcus aureus</i><br>(ATCC 25923)      | 37 °C,<br>aerobio         | Agar tripticasa soya                | Agar tripticasa soya o Nutritivo |
|                         |                | <i>Bacillus subtilis</i><br>(ATCC 6633)           | 37 °C,<br>aerobio         | Agar Nutritivo                      | Agar tripticasa soya o Nutritivo |
|                         | Gram negativo  | <i>Escherichia coli</i><br>(ATCC 10536)           | 37 °C,<br>aerobio         | Agar Nutritivo                      | Agar tripticasa soya o Nutritivo |
|                         |                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>(ATCC 27853)     | 37 °C,<br>aerobio         | Agar Nutritivo                      | Agar tripticasa soya o Nutritivo |
| Hongos                  | Levaduriformes | <i>Candida albicans</i><br>(ATCC 10231)           | 37 °C,<br>aerobio         | Agar YM                             | Agar dextrosa Sabouraud          |
|                         | Filamentosos   | <i>Aspergillus niger</i><br>(ATCC 16888)          | 28°C,<br>aerobio          | Agar Dextrosa Sabouraud             | Agar dextrosa Sabouraud          |
|                         |                | <i>Trichophyton mentagrophytes</i><br>(ATCC 9129) | 28 °C,<br>aerobio         | Agar Sabouraud modificado por Emmon | Agar dextrosa Sabouraud          |

\* Según recomendación de ATCC (American Type Culture Collection).

Los medios de cultivo se rehidrataron de acuerdo con las indicaciones de la casa comercial; algunos se prepararon a partir de sus componentes individuales. Los medios resultantes se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 15 lb/cm<sup>2</sup>, durante 15 min.

## **b) Activación de los microorganismos liofilizados.**

Para la realización del estudio se utilizaron cepas de microorganismos liofilizados contenidos en viales, adquiridos comercialmente de ATCC. La activación de los microorganismos se efectuó de acuerdo a los procedimientos recomendados por la compañía manufacturera, mismos que se describen a continuación.

### **b.1 Apertura del vial.**

Este procedimiento se realizó considerando los procedimientos ilustrados en la Figura 1.

### **b.2 Rehidratación de los microorganismos liofilizados.**

Al vial conteniendo las bacterias o levaduras se adicionó 0.4 ml del caldo nutritivo apropiado. En el caso de hongos se agregó solamente 0.4 ml de agua estéril. Las suspensiones resultantes se agitaron cuidadosamente evitando la formación de espuma.

Cada una de las suspensiones primarias se resuspendieron en 5 ml del líquido utilizado para la hidratación preliminar. De esta última suspensión, en el caso de las bacterias y levaduras, se sembraron tres tubos conteniendo los medios sólidos de cultivo apropiados (ver Cuadro 17). El remanente de la suspensión y los cultivos sólidos se incubaron a 37 °C por 24 h. Las suspensiones acuosas de los hongos se sembraron en el medio sólido adecuado de acuerdo a lo indicado en el Cuadro 17. Los cultivos resultantes se denominaron cultivos primarios.



- 1** CALENTAR LA PUNTA DEL VIAL EN LA FLAMA



- 2** ADICIONAR GOTAS DE AGUA SOBRE LA PUNTA CALIENTE PARA ROMPER EL VIDRIO



- 3** GOLPEAR CON UNA LIMA PARA ELIMINAR LA PUNTA



- 4** REMOVER EL AISLANTE Y EXTRAER EL VIAL INTERNO



- 5** QUITAR LENTAMENTE EL TAPON DE ALGODON CON UNAS PIZAS



Figura 1. Apertura del vial conteniendo los microorganismos liofilizados

c). Caracterización de los microorganismos de prueba.

c.1 Características morfológicas y microscópicas de los microorganismos de prueba.

Para la identificación microscópica de las bacterias se realizó una tinción de Gram y para el caso de los hongos filamentosos y la levadura se utilizó una tinción simple con azul de lactofenol y azul de metileno, respectivamente (Koneman *et al.*, 1991).

c.2 Pruebas bioquímicas para bacterias.

Para la realización de las pruebas bioquímicas de bacterias se emplearon los medios de cultivo apropiados preparados para su rehidratación. En algunos casos estos medios de cultivo se modificaron mediante la adición de algún componente con la finalidad de obtener los medios especificados en la bibliografía para cada microorganismo. En todas las pruebas, los medios de cultivo correspondientes se inocularon con cultivos de 24 h. en condiciones asépticas.

c.2.1. Utilización de azúcares.

La utilización de azúcares se determinó en el medio de rojo de fenol adicionando al medio de cultivo el azúcar correspondiente a una concentración final de 1% (manitol, lactosa, glucosa, maltosa, sacarosa y galactosa). Para la realización de la prueba, el microorganismo se sembró con una asa estéril en el medio de cultivo y se incubó a 37 °C durante 48 h. Al cabo de este tiempo, se procedió a determinar la utilización de azúcares que se manifiesta por la producción de ácidos que ocasionan el viraje del indicador rojo de fenol de un color rojo a amarillo (Mac Faddin, 1984; Koneman *et al.*, 1988).

### c.2.2. Prueba de Hugh y Leifson.

El objetivo de la prueba de Hugh y Leifson es determinar el tipo de metabolismo que lleva a cabo el microorganismo. El microorganismo de prueba se sembró por picadura en dos tubos conteniendo el medio apropiado de color verde y conteniendo el indicador azul de bromotimol. Un tubo se incubó en condiciones aeróbicas y el otro en condiciones anaeróbicas, en el último caso se adicionó 1 ml de parafina estéril.

Los tubos se incubaron durante 48 h a 37 °C. Al cabo de este tiempo, se observó el cambio de coloración del medio de cultivo. La aparición de un color amarillo debido al viraje del indicador contenido en el medio de cultivo es indicativo de la biosíntesis del ácido pirúvico y, en consecuencia, de la capacidad de realizar metabolismo oxidativo o fermentativo dependiendo de las condiciones de cultivo, es decir, aeróbicas o anaeróbicas (Mac Faddin, 1984; Koneman *et al.*, 1988).

### c.2.3. Pruebas de Vogues Proskauer y rojo de metilo.

Se prepararon dos tubos de ensayo conteniendo el medio de cultivo apropiado y el microorganismo de prueba. El primero de ellos se incubó durante 48 h (tubo 1) y el segundo durante 72 h (tubo 2). Después del período de incubación, la mitad del contenido del tubo 1 se transfirió a otro tubo estéril. Al primer tubo se adicionaron unas gotas de rojo de metilo. El cambio del indicador a rojo indica la acidificación del medio y la prueba de rojo de metilo se considera positiva. Al segundo tubo se agregaron 0.6 ml de  $\alpha$ -naftol y 0.2 ml de KOH 40%, la mezcla se dejó reposar durante aproximadamente 10 min. La aparición de una coloración roja en la superficie del medio de cultivo indica la producción de

acetoina lo cual se consideró como una prueba de Vogues Proskauer positiva (Mac Faddin, 1984; Koneman *et al.*, 1988).

#### c.2.4 Pruebas de ácido sulfhídrico, indol y movilidad (SIM).

En un tubo conteniendo el medio de cultivo semisólido SIM (sulfídrico, indol, movilidad) se inoculó el microorganismo por picadura. Después de la incubación se determinó la presencia de ácido sulfhídrico que se caracteriza por la aparición de un color negro. Además, se verificó la movilidad del microorganismo la cual se manifiesta por el crecimiento del microorganismo hacia los extremos de la inoculación. Por último, para determinar la producción del indol se adicionó a la superficie del medio unas gotas del reactivo de Erlich. La aparición de un anillo rojo en la superficie indica una reacción positiva (Mac Faddin, 1984; Koneman *et al.*, 1988).

#### c.2.5. Prueba de citrato de Simmons.

El microorganismo se sembró por picadura en el medio de cultivo apropiado (conteniendo el citrato) y después del período de incubación se observa si el indicador contenido en el medio de cultivo (azul de bromotimol) cambia del color verde al azul. El vire del indicador indica que el microorganismo utiliza citrato (Mac Faddin, 1984; Koneman *et al.*, 1988).

#### c.2.6. Prueba de ureasa.

Para esta prueba se empleó el medio sarraco, el cual fue inoculado con el microorganismo con ayuda de una asa estéril. Después de la incubación se

observó si el indicador cambió de color rojo al magenta. El viraje del indicador indica prueba positiva para ureasa (Mac Faddin, 1984; Koneman *et al.*, 1988).

#### c.2.7 Prueba de nitritos.

En un tubo conteniendo el medio de cultivo apropiado y una campana invertida se inoculó con el microorganismo mediante una asa estéril. Después del período de incubación se adicionó 1 ml de un reactivo denominado A (ácido sulfánilico 0.8% en ácido acético) y 1 ml de un segundo reactivo denominado B ( $\alpha$ -naftilamina 0.5% en ácido acético). Después de 5 min, se observó la aparición de una coloración roja, indicando la reducción de los nitratos contenidos en el medio de cultivo a nitritos (prueba positiva) por el microorganismo. Por otra parte, la aparición de gas en la campana indica la reducción de los nitratos hasta nitrógeno gaseoso.

En los casos en que no se observó coloración roja y con la finalidad de confirmar el resultado negativo se realizó la siguiente reacción. En el tubo que se practicó la reacción anterior, se adicionó zinc metálico (20 mg) y la aparición inmediata de una coloración roja debido a la reducción de los nitratos confirmó la prueba negativa. En el caso de la levadura se realizaron algunas de las pruebas bioquímicas que se describieron anteriormente, y en el caso de los hongos sólo se realizó la identificación microscópica. De manera adicional, en el caso de *Trichophyton mentagrophytes* se realizó la prueba de nitritos.

Todos los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas se compararon con los datos descritos en la bibliografía (Mac Faddin, 1984; Koneman *et al.*, 1988; Bergey's Manual).

d) Determinación del número de células por medio del estándar turbidimétrico de McFarland.

El número de bacterias en un medio líquido puede ser determinado por la comparación visual de su turbidez con la de un estándar turbidimétrico que representa un número conocido de bacterias en suspensión.

En el Cuadro 18 se enumeran los reactivos y las cantidades necesarias de las soluciones requeridas para la preparación del estándar turbidimétrico de McFarland. Así mismo, se indica la correspondencia entre la turbidez generada por la mezcla de los reactivos a una determinada proporción; el número de células bacterianas es su turbidez equivalente.

e) Determinación de la Concentración Crítica de antibióticos.

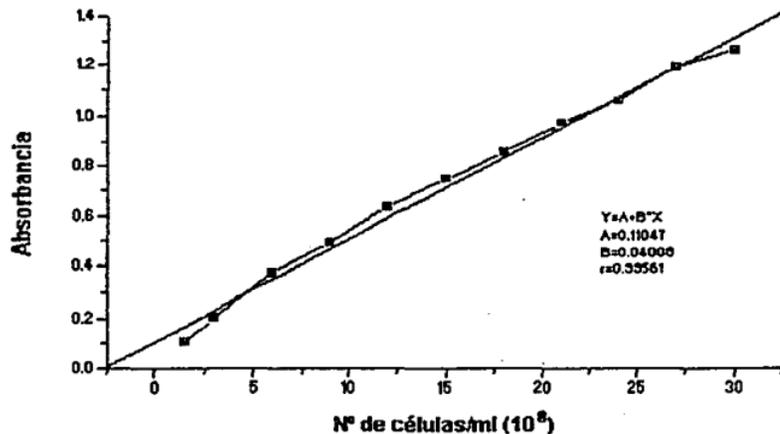
Antes de llevar a cabo la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos, se realizó la determinación de la concentración inhibidora crítica de los antibióticos seleccionados de acuerdo a las especificaciones de la literatura (Catalogo ATCC). Para ello se utilizó el método de difusión en agar empleando discos de papel filtro como reservorio y diferentes concentraciones del antibiótico a ensayar. Estas pruebas permitieron determinar las concentraciones apropiadas de los antibióticos utilizados como controles positivos para los ensayos posteriores. Para *Staphylococcus aureus* se empleó ampicilina, para *Bacillus subtilis* estreptomina, para *Candida albicans* anfotericina B y para *Trichophyton mentagrophytes* se empleó griseofulvina.

e.1. Preparación de los inóculos

Las bacterias se sembraron en agar antibiótico N° 1, la levadura en agar dextrosa sabouraud y el dermatófito en agar sabouraud modificado por Emmon. En todos los casos se utilizó el medio de cultivo inclinado. Las condiciones de incubación se indicaron anteriormente en el Cuadro 17.

**CUADRO 18. Estándar turbidimétrico de Mc Farland.**

| N° Tubo                                 | 0.5   | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |
|-----------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| ml de BaCl <sub>2</sub> 1%              | 0.05  | 0.1   | 0.2   | 0.3   | 0.4   | 0.5   | 0.6   | 0.7   | 0.8   | 0.9   | 1.0   |
| ml de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1% | 9.95  | 9.9   | 9.8   | 9.7   | 9.6   | 9.5   | 9.4   | 9.3   | 9.2   | 9.1   | 9.0   |
| N° Cel x10 <sup>8</sup>                 | 1.5   | 3     | 6     | 9     | 12    | 15    | 18    | 21    | 24    | 27    |       |
| Absorbancia                             | 0.104 | 0.202 | 0.374 | 0.494 | 0.632 | 0.748 | 0.855 | 0.975 | 1.055 | 1.190 | 1.260 |



El cultivo anterior se cosechó con 3 ml de solución salina isotónica (SSI) estéril; 1 ml de esta última suspensión se sembró en un matraz Erlenmeyer que contenía 50 ml del mismo medio sólido utilizado en el tubo inclinado. En el caso de *Trichophyton mentagrophytes* se utilizó agar dextrosa sabouraud.

El último cultivo se cosechó con 10 ml de SSI estéril. Es importante mencionar que en el caso particular de *Bacillus subtilis* se adicionaron perlas de vidrio estériles para favorecer el desprendimiento del microorganismo y en el caso de *Trichophyton mentagrophytes* se utilizó una asa micológica para este fin. Del concentrado anterior se realizó una dilución 1:19 y se ajustó visualmente el número de microorganismos a la turbidez correspondiente al estándar 0.5 de McFarland (Cuadro 18).

#### e.2. Preparación de los discos.

Los antibióticos y sus concentraciones empleadas para la determinación de la concentración inhibidora crítica se muestran en el Cuadro 19. En el Cuadro 20 se indican los disolventes adecuados para la realización de la solución stock y para la preparación de las soluciones de los antibióticos. La preparación de los discos se realizó de la siguiente manera. En cada caso, a los discos estériles se adicionó 100 µl de la solución del antibiótico conteniendo la concentración apropiada. Los discos impregnados con el antibiótico se dejaron secar a temperatura ambiente.

#### e.3. Preparación de las placas de agar.

Las placas con doble capa de agar se prepararon colocando una capa de siembra con la cantidad del inóculo requerida (Cuadro 21), sobre otra capa de agar sólido preparada a partir de 10 ml de un agar nutritivo sin inocular.

**CUADRO 19. Antibióticos a los cuales se determinó la concentración inhibidora crítica.**

| Microorganismo                     | Antibiótico    | Concentración en el disco.<br>( $\mu\text{g}$ ) |
|------------------------------------|----------------|-------------------------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | Ampicilina     | 10, 7.5, 5, 2.5, 1, 0.5, 0.1                    |
| <i>Bacillus subtilis</i>           | Estreptomicina | 10, 7.5, 5.0, 2.5, 1                            |
| <i>Candida albicans</i>            | Anfotericina B | 30, 25, 20, 15, 10                              |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | Griseofulvina  | 30, 25, 20, 15, 10                              |

**Cuadro 20. Disolventes empleados para la disolución de los antibióticos.**

| Antibiótico    | Disolvente para la solución<br>stock (estéril) | Disolvente para<br>diluciones (estéril) |
|----------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Ampicilina     | Buffer de pH 8                                 | Agua                                    |
| Espreptomicina | Buffer de pH 8                                 | Buffer de pH 8                          |
| Anfotericina B | Dimetilformamida *                             | Buffer de pH 10.5                       |
| Griseofulvina  | Dimetilformamida *                             | Buffer de pH 8                          |

\* Disolvente que se emplea sin esterilizar.

**CUADRO 21. Volúmen de Inóculo empleado para los ensayos.**

| Microorganismo                     | Inóculo por 100ml de agar |
|------------------------------------|---------------------------|
| <i>Bacillus subtilis</i>           | 0.2 ml                    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | 0.2 ml                    |
| <i>Candida albicans</i>            | 2.0 ml                    |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 1.5 ml                    |

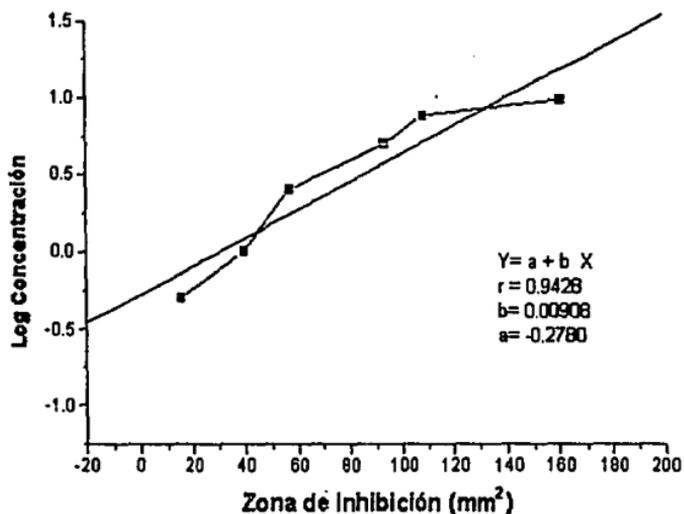
#### e.4. Bioensayo

Una vez solidificadas las placas de agar se colocaron tres discos en forma equidistantes, dos con una concentración diferente del antibiótico a ensayar y el último con una concentración estándar del mismo. Se preincubaron las cajas a 4 °C durante 4 h. Posteriormente se incubaron, en las condiciones apropiadas para el crecimiento de los microorganismos utilizados en el estudio (Cuadro 17) (Linton, 1983). El bioensayo se realizó por triplicado. Los resultados promedio obtenidos para cada antibiótico se presentan en los Cuadros 22 a 25 y en sus gráficas correspondientes.

**CUADRO 22. Diámetros promedio de las zonas de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* con ampicilina.**

| Concentración del antibiótico ( $\mu\text{g}$ ) | Log C   | Zona de inhibición de la conc. a ensayar. (mm) | Zona de inhibición de la conc. estándar. (mm) | Zona de inhibición corregida. (mm) | Zona de inhibición $(x-13/2)^2$ ( $\text{mm}^2$ ) |
|-------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 0.5                                             | -0.3010 | 20.50                                          | 25.50                                         | 20.8570                            | 15.43                                             |
| 1.0                                             | 0.0000  | 25.00                                          | 25.30                                         | 25.5700                            | 39.50                                             |
| 2.5                                             | 0.3979  | 27.20                                          | 25.00                                         | 28.0970                            | 56.98                                             |
| 5.0                                             | 0.6990  | 31.50                                          | 25.00                                         | 32.3600                            | 93.70                                             |
| 7.5                                             | 0.8751  | 35.00                                          | 27.00                                         | 33.8570                            | 108.75                                            |
| 10                                              | 1       | 38.50                                          | 25.70                                         | 38.66                              | 160.91                                            |
|                                                 |         |                                                | promedio: 25.86                               |                                    |                                                   |

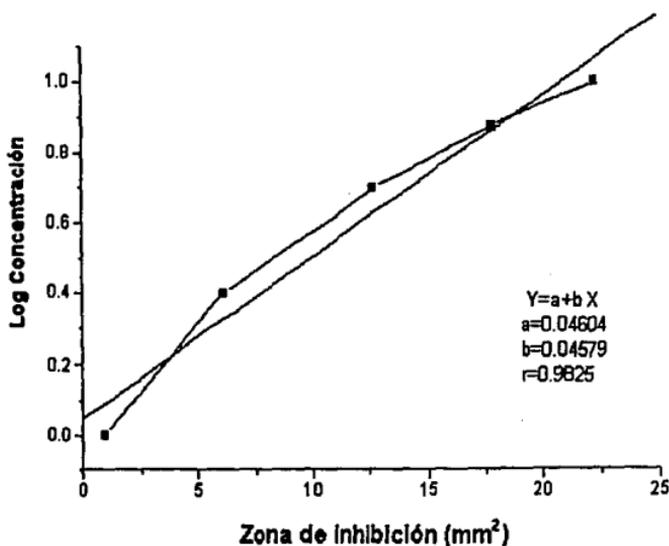
Concentración inhibidora crítica: 0.5272  $\mu\text{g}$ .



CUADRO 23. Diámetros promedio de las zonas de inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis* con estreptomicina.

| Concentración del antibiótico ( $\mu\text{g}$ ) | Log C  | Zona de inhibición de la conc. a ensayar. (mm) | Zona de inhibición de la conc. estándar. (mm) | Zona de inhibición corregida. (mm) | Zona de inhibición $(x-13/2)^2$ ( $\text{mm}^2$ ) |
|-------------------------------------------------|--------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------|
| 10.0                                            | 1.0000 | 22.30                                          | 22.00                                         | 22.44                              | 22.28                                             |
| 7.50                                            | 0.8751 | 21.00                                          | 21.70                                         | 21.44                              | 17.81                                             |
| 5.00                                            | 0.6990 | 19.98                                          | 22.00                                         | 20.12                              | 12.69                                             |
| 2.50                                            | 0.3979 | 17.80                                          | 22.00                                         | 17.94                              | 6.10                                              |
| 1.00                                            | 0.0000 | 15.09                                          | 22.30                                         | 14.93                              | 0.93                                              |
|                                                 |        |                                                | promedio: 22.14                               |                                    |                                                   |

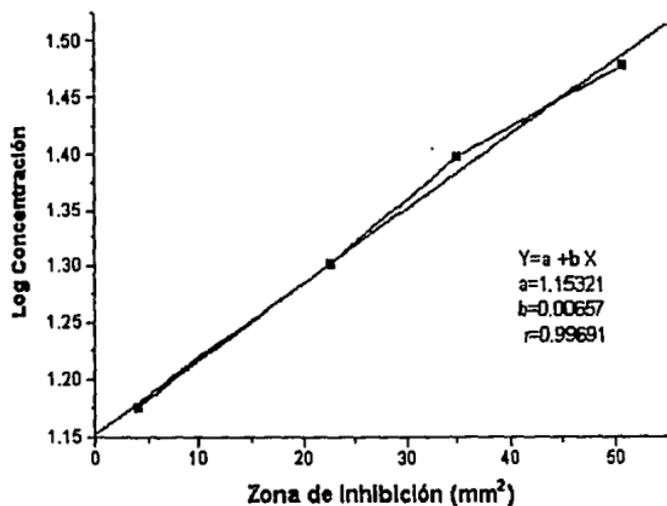
Concentración inhibidora crítica: 1.1118  $\mu\text{g}$ .



**CUADRO 24.** Diámetros promedio de las zonas de inhibición del crecimiento de *Candida albicans* con anfotericina B.

| Concentración del antibiótico (µg) | Log C  | Zona de inhibición de la conc. a ensayar. (mm) | Zona de inhibición de la conc. estándar. (mm) | Zona de inhibición corregido (mm) | Zona de inhibición $(x-13/2)^2$ (mm <sup>2</sup> ) |
|------------------------------------|--------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------|
| 15.0                               | 1.1761 | 20.70                                          | 18.20                                         | 17.04                             | 4.08                                               |
| 20.0                               | 1.3010 | 20.00                                          | 23.00                                         | 22.54                             | 22.75                                              |
| 25.0                               | 1.3979 | 19.70                                          | 25.00                                         | 24.84                             | 35.05                                              |
| 30.0                               | 1.4771 | 19.30                                          | 27.00                                         | 27.24                             | 50.89                                              |
|                                    |        | promedio: 19.54                                |                                               |                                   |                                                    |

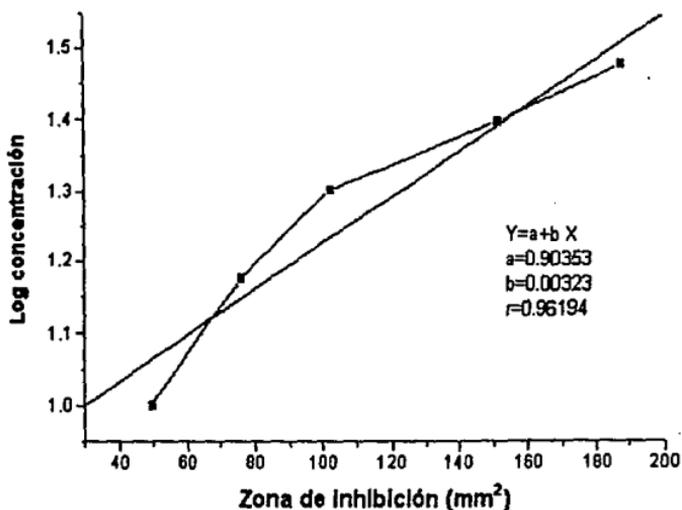
Concentración inhibitoria crítica: 14.2301 µg.



**CUADRO 25.** Diámetros promedio de las zonas de inhibición del crecimiento de *Trichophyton mentagrophytes* con griseofulvina.

| Concentración del antibiótico (µg) | Log C  | Zona de inhibición de la conc. a ensayar. (mm) | Zona de inhibición de la conc. estándar. (mm) | Zona de inhibición corregido. (mm) | Zona de inhibición $(x-13/2)^2$ (mm <sup>2</sup> ) |
|------------------------------------|--------|------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 10.0                               | 1.0000 | 29.20                                          | 34.00                                         | 27.14                              | 49.98                                              |
| 15.0                               | 1.1761 | 31.50                                          | 33.00                                         | 30.44                              | 76.04                                              |
| 20.0                               | 1.3010 | 33.00                                          | 31.7                                          | 33.24                              | 102.41                                             |
| 25.0                               | 1.3979 | 36.00                                          | 30.3                                          | 37.64                              | 151.78                                             |
| 30.0                               | 1.4771 | 39.20                                          | 30.7                                          | 40.44                              | 188.24                                             |
|                                    |        |                                                | promedio: 31.94                               |                                    |                                                    |

Concentración inhibidora crítica: 8.00 µg.



La concentración de cada uno de los antibióticos de prueba seleccionados para su empleo como el control positivo se presentan en el Cuadro 26.

**CUADRO 26. Concentración de cada uno de los antibióticos de prueba seleccionada como control positivo.**

| Microorganismo                     | Antibiótico    | Concentración ( $\mu\text{g}$ ) |
|------------------------------------|----------------|---------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | Ampicilina     | 1.0                             |
| <i>Bacillus subtilis</i>           | Estreptomicina | 10.0                            |
| <i>Candida albicans</i>            | Anfotericina B | 25.0                            |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | Griseofulvina  | 8.0                             |

5.2.2. Determinación cualitativa preliminar de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar utilizando un gradiente de concentración

a) Preparación del inóculo

En el caso de las bacterias se preparó un inóculo de 24 h. utilizando agar triplicasa soya. Para los hongos se preparó un inóculo de 7 días. Por último, en el caso de la levadura, se utilizó un inóculo de 24 h. Los dos últimos en agar dextrosa sabouraud.

Para las bacterias y la levadura se realizó una suspensión del cultivo anterior en 5 ml SSI. Cuando la suspensión primaria era muy concentrada se realizó una segunda dilución. En el caso de los hongos se preparó una suspensión de esporas en 5 ml de SSI.

b) Preparación de las placas conteniendo la muestra a evaluar.

La cantidad de extracto necesaria para obtener la concentración de 1mg/ml de agar se disolvió en una mínima cantidad de metanol (como máximo 0.5 ml).

La solución anterior se vertió sobre un tubo que contenía 10 ml de agar caseína soya el cual se fundió previamente y se mantuvo a 45 °C. Se agitó perfectamente para lograr la homogeneización de la mezcla, misma que se vertió sobre una caja Petri y se dejó solidificar sobre una superficie inclinada, con la finalidad de generar un gradiente de concentración. Una vez solidificada esta capa se adicionaron aproximadamente 10 ml de agar caseína soya y se dejó solidificar en forma horizontal (Ver Figura 2).

Mediante el mismo procedimiento se preparó una placa conteniendo únicamente el disolvente utilizado para la disolución de los extractos de prueba (blanco de disolvente).

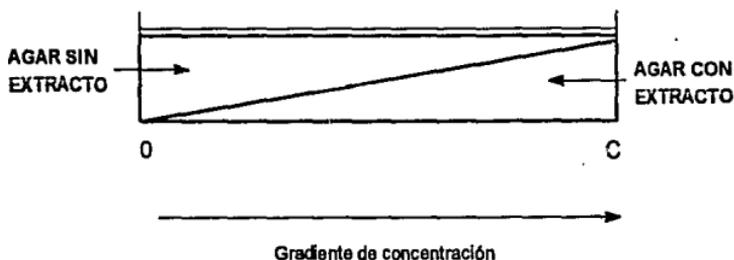


Figura 2. Gradiente de concentración.

c) Bioensayo.

Se tomó una asada del inóculo y se sembró sobre la superficie del agar por estria recta en el sentido de mayor a menor concentración del extracto. Se

prepararon los controles de crecimiento para cada uno de los microorganismos sembrando dos estrias en cajas que contenían el medio de cultivo sin extracto.

De manera adicional, mediante el mismo procedimiento se inocularon las cajas que contenían el disolvente empleado para asegurarse que la cantidad de disolvente utilizado no afectaba el desarrollo del microorganismo. Las placas conteniendo las bacterias y la levadura se incubaron a 37 °C por 24 h. y los hongos se incubaron a 28 °C por 7 días.

#### 5.2.3. Determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar utilizando discos de papel filtro como reservorio.

Para la determinación de la actividad potencial antimicrobiana de los extractos se siguió el mismo procedimiento empleado para la determinación de la concentración inhibidora crítica de los antibióticos con la única variante de que los discos se impregnaron con soluciones metanólicas conteniendo 1000 y 500 µg del extracto. Además se utilizó el control positivo del antibiótico adecuado, dependiendo del microorganismo de prueba, a una concentración mayor a la concentración inhibidora crítica determinada previamente.

#### 5.2.4. Determinación de la actividad antimicrobiana cuantitativa por el método de dilución.

Con la finalidad de cuantificar la actividad antimicrobiana de los extractos que demostraron una actividad significativa en la prueba de difusión en agar, se determinó la concentración inhibidora mínima (CIM) mediante el método de dilución en caldo; en el caso de las bacterias y el método de dilución en agar en el caso de los hongos.

## a) Determinación de la concentración inhibidora mínima para bacterias.

### a.1. Preparación del inóculo.

Para la determinación de la concentración inhibidora mínima se recomienda un inóculo de  $5 \times 10^5$  cel/ml (Sahm y Washington, 1991; Finegold y Baron, 1989). Se preparó una suspensión con SSI con una turbidez comparable a la del tubo 0.5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  cel/ml) a partir de un cultivo de 24 h. del microorganismo a ensayar. De esta suspensión se realizó una dilución 1:100 en caldo tripticasa soya estéril para generar un inóculo conteniendo  $1 \times 10^6$  cel/ml.

### a.2. Bioensayo cuantitativo.

2 ml de la suspensión del microorganismo conteniendo  $1 \times 10^6$  cel/ml se adicionó a una serie de tubos que contenían 2 ml de caldo tripticasa soya y diferentes concentraciones del extracto de prueba. Además, se realizó un blanco para cada concentración del extracto de 50 a 500  $\mu\text{g/ml}$ , el cual se preparó de la misma manera que los demás tubos pero sin el inóculo. Un tubo (tubo cero) que contenía únicamente el inóculo. De éste último, se realizó una dilución 1:1000, 1 ml de ésta se sembró en una placa con agar tripticasa soya por vertido. Los tubos y las placas inoculadas (por triplicado) se incubaron a 37 °C durante 24 h.

Después del período de incubación, se observó visual e instrumentalmente la turbidez de cada uno de los tubos ajustando el espectrofotómetro con el blanco correspondiente. Con la finalidad de determinar si el efecto inhibitorio del extracto es de tipo bacteriostático o bactericida se tomó 0.1 ml del medio de cultivo donde no hubo desarrollo y se sembró en placas con agar tripticasa soya mediante la técnica de vertido. De nueva cuenta, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después de este tiempo, se contó

el número de unidades formadoras de colonias y se calculó el porcentaje de microorganismos desarrollados. En la Figura 3 se resume el bioensayo cuantitativo.

## b) Determinación de la Concentración Inhibidora Mínima para hongos.

### b.1.Preparación del inóculo.

A un tubo de cultivo de *Trichophyton mentagrophytes* en agar modificado por Emmon de 7 días se agregó 3 ml de SSI estéril, con ayuda de una asa micológica se desprendió el cultivo, para preparar una suspensión, la cual se virtió sobre una superficie de agar dextrosa sabouraud contenida en un matraz, este se incubó a 28 °C durante 7 días. Transcurrido este período, el cultivo se desprendió con una asa micológica y 20 ml de SSI estéril para hacer una suspensión homogénea con una turbidez comparable con el tubo 0.5 de MacFarland. Se empleó 0.5 ml de un inóculo de la suspensión del microorganismo en 40 ml de agar dextrosa sabouraud.

### b.2. Bioensayo cuantitativo.

Se ensayaron 7 concentraciones de extracto (100, 200, 400, 500, 600, 800, 1000 µg/ml) en diferentes matraces Erlenmeyer. Cada matraz contenía 40 ml de agar dextrosa sabouraud fundido a 45 °C, la cantidad de extracto a evaluar y el inóculo. La mezcla anterior se virtió (10 ml) en placas Petri por triplicado. Cada una de estas cajas contenía como capa base 10 ml de agar dextrosa sabouraud sin inocular y sin extracto.

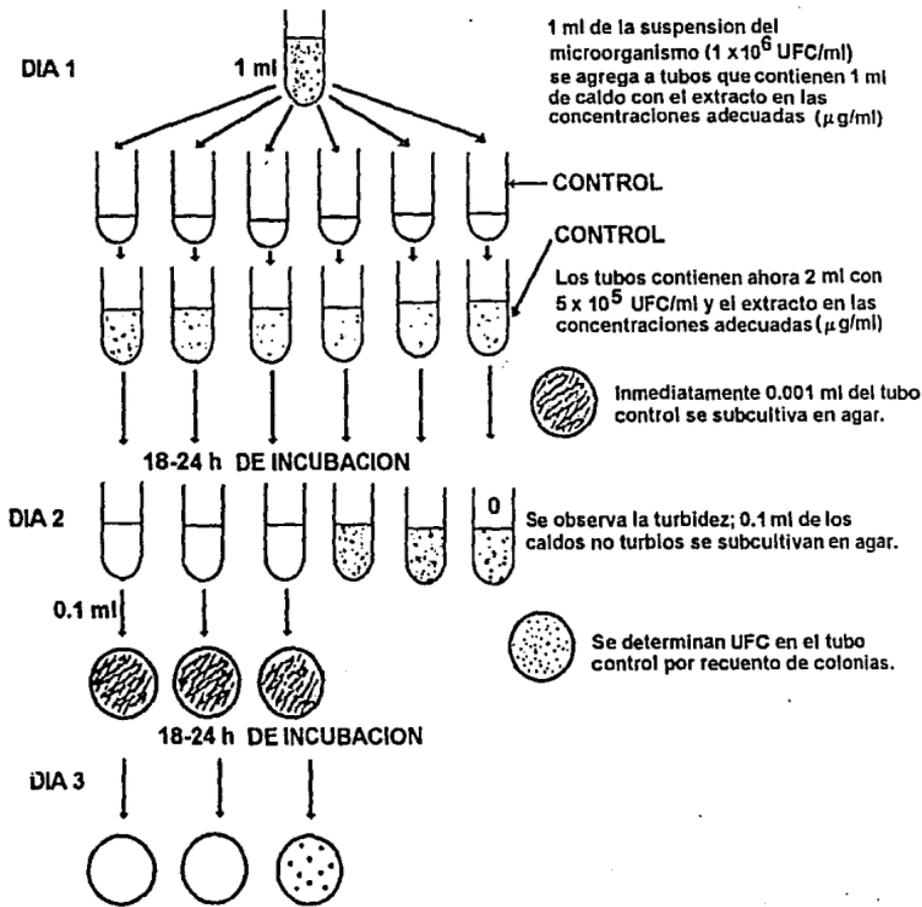


Figura 3. Bioensayo para determinar la Concentración Inhibidora Mínima para bacterias y levaduras.

### 5.3. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos objeto de estudio.

#### 5.3.1. Evaluación de la toxicidad de los extractos contra *Artemia salina* L.

##### a) Preparación de las muestras.

20 mg de extracto seco se disolvieron en 2 ml del disolvente adecuado. De esta solución se transfirieron por separado a tres viales 500, 50 y 5  $\mu$ l para obtener concentraciones de 1000, 100, y 10  $\mu$ l/ml, respectivamente. Cada concentración se preparó por triplicado y se dejó evaporar el disolvente a temperatura ambiente o al vacío.

##### b) Incubación de los huevos de *Artemia salina*.

Los huevos de *Artemia salina* se incubaron en salmuera durante un periodo de 24 h. después del cual, los camarones fototrópicos fueron colectados con una pipeta Pasteur.

##### c) Bioensayo.

Se transfirieron diez crustáceos a cada uno de los viales que contenían las muestras a evaluar y 5 ml de salmuera. Los viales se mantuvieron con iluminación artificial durante 24 h. y transcurrido el tiempo, se contó el número de individuos sobrevivientes para el calculo de la concentración letal media ( $CL_{50}$ ), para ello se utilizó el programa de análisis de probabilidad de Finney.

#### 5.3.2. Evaluación de la actividad citotóxica

La actividad citotóxica de los extractos se determino de acuerdo a los procedimientos establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos y fueron realizados en el Purdue Cancer Center, Universidad de Purdue, Estados Unidos. Las líneas celulares empleadas fueron adenocarcinoma de colon (HT-29), carcinoma de pecho (MCF-7) y carcinoma de pulmón (A-549). Los resultados se expresan en términos de  $DE_{50}$  (Anderson *et al.*, 1991).

#### 5.4. Obtención de la lunidonina y manitol a partir de la corteza de *Ptelea trifoliata*.

El material vegetal seco (200 g) se extrajo con metanol mediante un proceso de maceración. El volumen de extracción se redujo por concentración al vacío. Como el extracto original (30 g) presentó toxicidad para *Artemia salina* (LC<sub>50</sub> 66.54 µg/ml) se realizó el fraccionamiento biodirigido del mismo mediante una cromatografía preparativa en columna, utilizando como adsorbente gel de sílice (296 g, sílice gel G Merck 35-70 mallas). El proceso de elución se llevó a cabo con hexano, cloroformo y metanol en diferentes proporciones. Se recogieron un total de 129 fracciones de 100 ml cada una. Las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina y se combinaron aquellas que resultaron similares, para tener un total de ocho fracciones combinadas (I-VIII). A cada una de las fracciones combinadas se les determinó la toxicidad para *Artemia salina*.

En el Cuadro 27 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas. También se indican las fracciones que resultaron activas contra *Artemia salina*.

La fracción activa (III) presentó un compuesto mayoritario y fue purificado mediante cromatografía preparativa en gel de sílice, utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo-metanol 98:2. Como resultado de este proceso se obtuvieron 996 mg de lunidonina con *pf* 108 °C.

De la fracción VIII inactiva (Cuadro 26) cristalizó un sólido muy abundante, *pf* 185-187 °C, el cual fue caracterizado como el manitol por comparación con una muestra auténtica.

**Cuadro 27. Fraccionamiento primario del extracto de *Ptelea trifoliata*.**

| Eluyente                             | Proporción   | Fraciones combinadas | Actividad biológica<br>CL <sub>50</sub><br>(µg/ml) |
|--------------------------------------|--------------|----------------------|----------------------------------------------------|
| Hexano-cloroformo                    | 1:1<br>3:7   | 1-28 (I)             | >1000                                              |
| Cloroformo                           |              | 29-39 (II)           | 223.29                                             |
| Cloroformo                           |              | 40-50 (III)          | 33.59                                              |
| Cloroformo<br>Cloroformo-<br>metanol | 99:1         | 51-79 (IV)           | >1000                                              |
| Cloroformo-<br>metanol               | 99:1<br>97:3 | 80-106 (V)           | 693.3                                              |
| Cloroformo-<br>metanol               | 97:3<br>9:1  | 107-118 (VI)         | >1000                                              |
| Cloroformo-<br>metanol               | 6:4          | 119-126 (VII)        | >1000                                              |
| Metanol                              |              | 127-129 (VIII)       | >1000                                              |

## 5.5. Caracterización de los compuestos aislados.

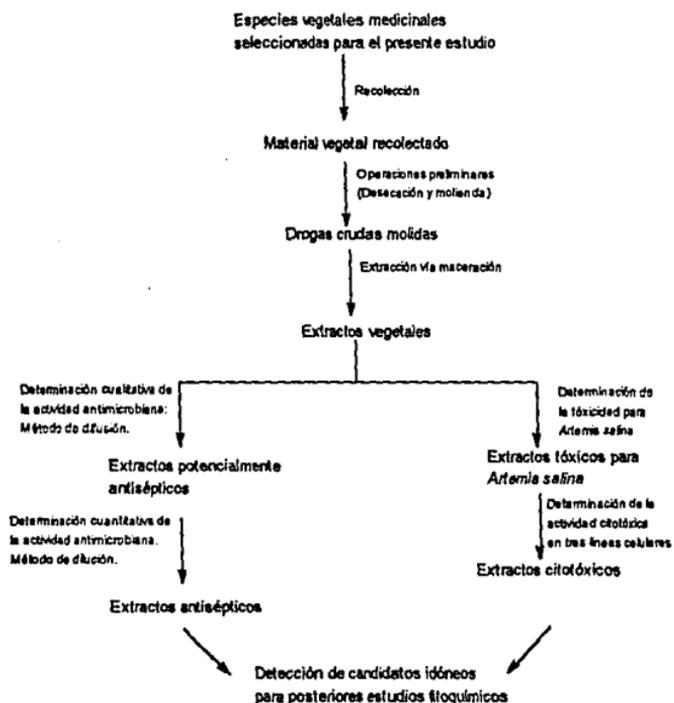
### 5.5.1. Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

- Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Jones.
- Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer 599 B.
- Los espectros de <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN se determinaron en espectrofotómetros Varian VXR-300S (Instituto de Química, UNAM) utilizando como disolventes metanol deuterado y como referencia interna TMS.
- El estudio de difracción de rayos X se efectuó en un difractómetro Nicolet R3m (Instituto de Química, UNAM).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSION.

En el presente estudio se determinó la actividad antimicrobiana y citotóxica potencial de 38 extractos derivados de 30 especies vegetales recolectadas en la República Mexicana. La estrategia metodológica empleada para la realización del presente trabajo se resume en el siguiente esquema.

Esquema 1. Estrategia metodológica empleada en el presente estudio.



La selección del material vegetal objeto de estudio se realizó principalmente con base en su uso popular medicinal. En menor grado algunas especies se seleccionaron al azar. Es importante hacer notar que estos criterios de selección están bien documentados en la literatura (Hamburger y Hostettmann, 1991) y la realización estuvo a cargo de expertos etnobotánicos.

En todos los casos el material vegetal recolectado se desecó y se fragmentó para obtener las drogas crudas molidas.

Posteriormente, las drogas crudas se extrajeron mediante un proceso de maceración empleando como disolvente metanol. De manera adicional en los casos particulares de *Dyssodia papposa*, *Malmea depressa*, *Tournefortia hirsutissima* y *Perityle batopilensis* se preparó también un extracto clorofórmico.

#### 6.1. Determinación de la actividad antimicrobiana.

La evaluación de la actividad antimicrobiana potencial se efectuó en dos etapas, la primera fase cualitativa se realizó con la finalidad de detectar los extractos con actividad potencial antiséptica. Posteriormente, en una segunda fase se cuantificó la actividad antimicrobiana de los extractos.

Tal como se indicó en la sección experimental, para el cumplimiento de la fase inicial se utilizaron dos métodos de difusión en agar. Para realizar la cuantificación de la actividad antimicrobiana se utilizó el método de dilución en caldo en el caso de las bacterias y el método de dilución en agar para hongos.

##### 6.1.1. Caracterización de los microorganismos de prueba.

Los microorganismos de prueba seleccionados para la determinación de la actividad antimicrobiana incluyen dos bacterias Gram positivo, dos bacterias Gram negativo, tres hongos, dos filamentosos y una levadura.

Las características microscópicas, bioquímicas y la morfología colonial de cada uno de los cultivos de microorganismos empleados en los bioensayos se presentan en los Cuadro 28 y Cuadro 29, las cuales correspondieron a las descritas en la bibliografía (Mac Faddin, 1984; Koneman *et al.*, 1988; Bergey's manual).

#### 6.1.2. Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar utilizando un gradiente de concentración.

Para la determinación cualitativa preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos se empleó el método de difusión en agar utilizando un gradiente de concentración. Las placas se sembraron mediante la técnica de estría de un punto de mayor concentración de extracto hacia un punto de menor concentración, con la finalidad de observar el rango de concentraciones a las cuales un determinado extracto inhibe el desarrollo de cada uno de los microorganismos de prueba. Este método tiene la ventaja de proporcionar información de la actividad antimicrobiana de manera semicuantitativa, pues dependiendo de la longitud de la inhibición de la estría generada por el crecimiento del microorganismo, se pudo deducir aproximadamente la potencia del extracto de prueba. De manera adicional, esta técnica proporcionó una idea aproximada acerca de las concentraciones apropiadas para la evaluación posterior por el método de difusión en agar utilizando discos de papel.

Las respuestas observadas mediante este ensayo en el presente estudio se clasificaron en cinco grupos de acuerdo a la magnitud de la inhibición del crecimiento en estría del microorganismo de prueba respecto a un control de crecimiento en ausencia del extracto. El primer grupo incluye al tipo de

**CUADRO 28. Características microscópicas y coloniales de los microorganismos de prueba.**

| Microorganismo                     | Características                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                           |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                    | Microscópicas                                                                                                                                                                                 | Coloniales                                                                                                                                                                                |
| <i>Staphylococcus aureus</i>       | Cocos G (+) agrupados en racimos                                                                                                                                                              | Colonia convexa, borde entero, de 2 a 3 mm, cremosa y amarilla.                                                                                                                           |
| <i>Bacillus subtilis</i>           | Bacilos G (+) agrupados en cadenas cortas                                                                                                                                                     | Elevación plana, forma irregular a rizoide, seca, margen rizado.                                                                                                                          |
| <i>Escherichia coli</i>            | Bacilos G (-) sin agrupación característica                                                                                                                                                   | Elevación pulvinada, semiopaca, gris y húmeda.                                                                                                                                            |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>      | Bacilos G (-) sin agrupación característica                                                                                                                                                   | Plana, opaca, gris-verdosa, margenes lacerados a diseminados. Pigmento verde en el medio de cultivo hasta la tercera resiembra.                                                           |
| <i>Candida albicans</i>            | Células ovales, sin tubo germinal, presenta clamidosporas, nacidas individualmente o en cúmulos.                                                                                              | Colonias cremosas de olor característico y desarrollan a las 24 h a 37°C.                                                                                                                 |
| <i>Aspergillus niger</i>           | Hifas hialinas y con tabiques netos. Los conidoforos son largos y no se observan las vesículas porque están cubiertas con una bola gruesa de esporas negras que surgen de toda la superficie. | Inicialmente las colonias están cubiertas con un micelio aéreo blanco, vellosa. Cuando la colonia madura se cubre con esporas negras, el reverso de la colonia presenta un color tostado. |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | Presenta microaleuriosporas, son globulosas dispuestas en cúmulos o en forma de racimo.                                                                                                       | Desarrollo blanco y algodonoso, el reverso es rojizo marrón.                                                                                                                              |

**CUADRO 29. Resultados de las pruebas bioquímicas.**

| microorganismo           | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> |
|--------------------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------|
| <b>Prueba bioquímica</b> |                  |                    |                |                      |                    |
| Sacarosa                 | +                | +                  | +              | -                    | +                  |
| Galactosa                | +                | +                  | +              | -                    | +                  |
| Glucosa                  | +                | +                  | +              |                      | +                  |
| Manitol                  | +                | +                  | +              | -                    | -                  |
| Lactosa                  | +                | -                  | +              | -                    | -                  |
| Maltosa                  | +                | -                  |                | -                    | +                  |
| Inositol                 |                  |                    |                |                      | -                  |
| Hugh y Leifson           | F                | O                  | F              | O                    | F                  |
| Voges proskauer          | -                | +                  | -              | -                    | -                  |
| Rojo de metilo           | +                | -                  | +              | -                    | -                  |
| Ac.Sulfhídrico           | -                | -                  | -              | -                    | -                  |
| Indol                    | -                | -                  | +              | -                    | -                  |
| Movilidad                | +                | +                  | +              | +                    | -                  |
| Citrato de Simmons       | -                | -                  | -              | +                    | -                  |
| Ureasa                   | +                | -                  | -              | +                    | -                  |
| Reducción de Nitratos    | +                | +                  | +              | +                    | -                  |

F: Microorganismo Fermentativo

O: Microorganismo Oxidativo

respuesta en el que no se observó crecimiento alguno del microorganismo y se representará en la presente discusión con cuatro cruces (++++). Los extractos que desarrollaron esta potencia inhibidora del crecimiento microbiano se consideraron como los más activos en este estudio. En el segundo tipo de respuesta, se observó una inhibición del crecimiento en estría del 75% y se codificó con tres cruces (+++). El tercer y cuarto grupo correspondieron a una inhibición de un 50% y 25 % del crecimiento en estría del microorganismo y se representaron con dos cruces (++) y una cruz (+), respectivamente. (Figura 4). Por último el quinto grupo corresponde a aquellos extractos que mostraron una inhibición del crecimiento de estría menor del 25%. Es importante destacar que cuando la inhibición es menor del 25% se consideró como negativa (-).

Los resultados obtenidos mediante el método de difusión en agar utilizando un gradiente de concentración se presentan en el Cuadro 30. Mediante este método se observó que ninguna de las especies estudiadas demostró actividad contra las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* a las concentraciones de prueba. Nueve extractos presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus*, siendo los más activos los extractos metanólicos de *Heliopsis longipes*, *Stenorhynchus lanceolatus* e *Hyptis verticillata* (primera colecta). Los extractos metanólicos de *Datura lanosa* y *Metopium brownei* (madera) y el extracto clorofórmico de *Malmea depressa* (corteza) resultaron moderadamente activos. Por último los menos activos fueron los extractos metanólicos de *Geranium niveum*, *Hyptis verticillata* (segunda colecta) y *Malmea depressa* (corteza). En el caso de *Bacillus subtilis* sólo cinco especies presentaron actividad, siendo las más activas *Hyptis verticillata* (primera colecta), *Datura lanosa* y *Stenorhynchus lanceolatus*. Los extractos medianamente activos fueron los metanólicos de *Ratibida latipaliaris* y

el clorofórmico de *Malmea depressa* (corteza) y el menos activo el extracto de *Malmea depressa* (corteza).

Solamente el extracto metanólico de *Hyptis verticillata* (primera colecta) demostró actividad contra el hongo *Aspergillus niger*. 17 extractos presentaron actividad contra *Trichophyton mentagrophytes* de los cuales los más activos fueron el extracto de *Hyptis verticillata* (primera colecta), *Ptelea trifoliata* (corteza) y el de *Helianthella quinquenervis*, así como los extractos clorofórmicos de *Malmea depressa* (corteza y madera). Los moderadamente activos fueron los extractos metanólicos de *Geranium niveum*, *Dyssodia papposa*, *Ratibida latipalmaris* y *Heliopsis longipes* y los extractos clorofórmico de *Tournefortia hirsutissima* y *Dyssodia papposa*. Los menos activos fueron los extractos metanólicos de *Ptelea trifoliata* (madera), *Datura lanosa*, *Cnidoscopus tehuacanensis*, *Hyptis verticillata* (segunda colecta), *Malmea depressa* (corteza) y *Stenorhynchus lanceolatus*. Únicamente tres extractos demostraron actividad contra *Candida albicans* aunque bastante moderada. Estos incluyeron los extractos clorofórmicos de *Stenorhynchus lanceolatus* y *Malmea depressa* (corteza) y el extracto metanólico de *Helianthella quinquenervis*. Todas las especies que demostraron actividad en este ensayo se evaluaron posteriormente mediante el método de difusión en agar empleando como reservorio discos de papel filtro (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991).

**Cuadro 30. Resultados obtenidos con el método de difusión en agar para los extractos de las plantas objeto de estudio con los diferentes microorganismos de prueba.**

| Extracto                                            | Microorganismo | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>A. niger</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>C. albicans</i> |
|-----------------------------------------------------|----------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|-----------------|--------------------------|--------------------|
| <i>Acalypha phleoides</i> (Euphorbiaceae)           |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Anredera scandens</i> (Basellaceae)              |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Bunchosia lindeniana</i> (hoja) (Malpighiaceae)  |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Bunchosia lindeniana</i> (tallo) (Malpighiaceae) |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Cardiospermum corindum</i> (Sapindaceae)         |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Cigarrilla mexicana</i> (Rubiaceae)              |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Cnidosculus herbaceus</i> . (Euphorbiaceae)      |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Cnidosculus tehuacanensis</i> (Euphorbiaceae)    |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | +                        | -                  |
| <i>Commelina erecta</i> (Commelinaceae)             |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Conyza filaginoides</i> (Asteraceae)             |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Datura lanosa</i> (Solanaceae)                   |                | ++               | +++                | -              | -                    | -               | +                        | -                  |
| <i>Dysodia papposa</i> (Asteraceae)                 |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | ++                       | -                  |
| <i>Dysodia papposa</i> (Asteraceae)*                |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | ++                       | -                  |
| <i>Elytraria imbricata</i> (Acanthaceae)            |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Galphimia glauca</i> (Malpighiaceae)             |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Geranium niveum</i> (Geraniaceae)                |                | +                | -                  | -              | -                    | -               | ++                       | -                  |
| <i>Heliopsis longipes</i> (Asteraceae)*             |                | +++              | -                  | -              | -                    | -               | ++                       | -                  |

**Cuadro 30. Resultados obtenidos con el método de difusión en agar para los extractos de las plantas objeto de estudio con los diferentes microorganismos de prueba (Continuación).**

| Extracto                                             | Microorganismo | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>A. niger</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>C. albicans</i> |
|------------------------------------------------------|----------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|-----------------|--------------------------|--------------------|
| <i>Hyptis verticillata</i> (Lamiaceae) (1ª colecta). |                | ++++             | ++++               | -              | -                    | +++             | ++++                     | ++                 |
| <i>Hyptis verticillata</i> (Lamiaceae) (2ª colecta). |                | +                | -                  | -              | -                    | -               | +                        | -                  |
| <i>Ilex rubra</i> (Aquifoliaceae)                    |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Kohleria deppeana</i> (Gesneriaceae)              |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Lepidium virginicum</i> (Cruciferaeae)            |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Malmea depressa</i> (corteza) (Annonaceae)        |                | +                | +                  | -              | -                    | -               | +                        | -                  |
| <i>Malmea depressa</i> (corteza) (Annonaceae)*       |                | ++               | ++                 | -              | -                    | -               | +++                      | +                  |
| <i>Malmea depressa</i> (madera) (Annonaceae)         |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Malmea depressa</i> (madera) (Annonaceae)*        |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | +++                      | -                  |
| <i>Metopium brownei</i> (madera) (Anacardiaceae)     |                | ++               | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Metopium brownei</i> (Corteza) (Anacardiaceae)    |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Perityle batopilensis</i> (Asteraceae)            |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Perityle batopilensis</i> (Asteraceae)*           |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Plumbago scandens</i> (Plumbaginaceae)            |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Ptelea trifoliata</i> (corteza) (Rutaceae)        |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | +++                      | -                  |
| <i>Ptelea trifoliata</i> (madera) (Rutaceae)         |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | +                        | -                  |
| <i>Pteridium arachnoideum</i> (Dennstaedtiaceae)     |                | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |

**Cuadro 30. Resultados obtenidos con el método de difusión en agar para los extractos de las plantas objeto de estudio con los diferentes microorganismos de prueba (Continuación).**

| Extracto \ Microorganismo                        | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>A. niger</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>C. albicans</i> |
|--------------------------------------------------|------------------|--------------------|----------------|----------------------|-----------------|--------------------------|--------------------|
| <i>Ratibida latipaliaris</i> (Asteraceae)        | -                | ++                 | -              | -                    | -               | ++                       | -Γ                 |
| <i>Stenorhynchus lanceolatus</i> (Orchidaceae)   | +++              | +++                | -              | -                    | -               | +                        | +                  |
| <i>Swietenia humilis</i> (Meliaceae)             | -                | -                  | -              | -                    | -               | -                        | -                  |
| <i>Tournefortia hirsutissima</i> (Boraginaceae)* | -                | -                  | -              | -                    | -               | ++                       | -                  |

95

\*Extracto Clorofórmico

- + Poco activo (inhibición en 25% de la placa)
- ++ Medianamente activo (inhibición en 50% de la placa)
- +++ Activo (inhibición en 75% de la placa)
- ++++ Muy activo (inhibición en el 100% de la caja)

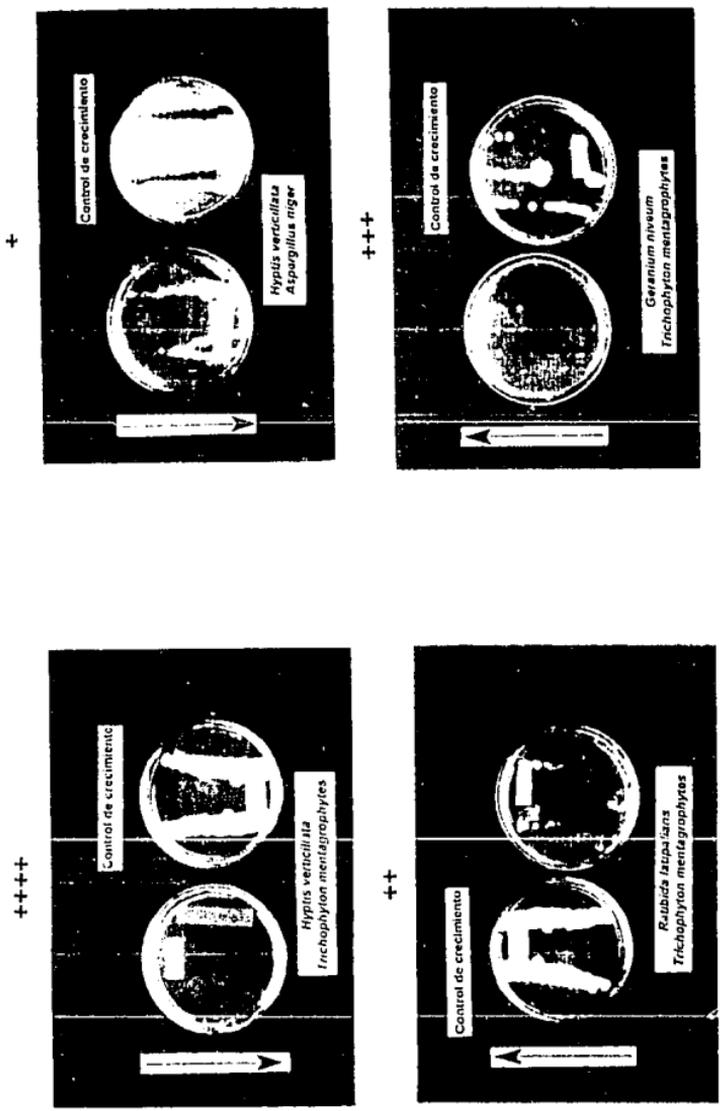


Figura 4. Tipos de respuestas obtenidas en el bioensayo de difusión en agar empleando un gradiente de concentración.

6.1.3. Determinación de la actividad antimicrobiana cualitativa por el método de difusión en agar utilizando como reservorio discos de papel.

Los extractos que demostraron actividad en el método de difusión en gradiente se evaluaron posteriormente mediante el método de difusión en agar utilizando discos de papel como reservorio y los antibióticos apropiados como control positivo.

Se midieron los halos de inhibición generados por el extracto sobre el crecimiento de cada uno de los microorganismos de prueba (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Trichophyton mentagrophytes*) comparando estos con los halos de inhibición generados por el control positivo seleccionado a partir de la determinación de la concentración inhibidora crítica (Figura 5). La concentración del antibiótico empleada fue mayor a la concentración inhibidora crítica. A fin de garantizar la difusión de la cantidad de antibiótico que cause un halo de inhibición significativo y que sea similar a la concentración inhibidora mínima (CIM) (Linton, 1983).

Las concentraciones del extracto evaluadas fueron de 500 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ , considerando que en el ensayo preliminar se empleó una concentración de 1mg/ml de agar y que un extracto se considera activo a concentraciones menores de 1mg/ml (Ríos, et al., 1988). Las respuestas generadas se compararon con el control respectivo adecuado. Los resultados se presentan en el Cuadro 31.

Al comparar los resultados de los Cuadros 30 y 31 se encuentra que de los seis extractos que presentaron actividad contra *Bacillus subtilis* por el método de difusión en agar utilizando un gradiente de concentración, sólo dos de ellos mostraron actividad considerable en el método de difusión en disco. Estos dos extractos activos son el extracto metanólico de *Datura lanosa* y el extracto clorofórmico de la corteza de *Malmea depressa*.

En el caso de *Staphylococcus aureus*, de los nueve extractos que presentaron resultados positivos en la prueba cualitativa preliminar sólo tres especies presentaron actividad significativa en el método de difusión en disco. Estos incluyen el extracto clorofórmico de la corteza de *Malmea depressa* y los extractos metanólicos de *Heliopsis longipes* y *Datura lanosa*.

En el caso de *Trichophyton mentagrophytes*, de los 17 extractos que mostraron actividad en la prueba preliminar sólo cinco mostraron buena actividad en el método de disco en papel. Estos extractos incluyen el extracto clorofórmico de *Malmea depressa* (corteza), los extractos metanólicos de *Datura lanosa*, *Helianthella quinquenervis*, *Heliopsis longipes* e *Hyptis verticillata*.

**Cuadro 31. Diámetros de la zona de inhibición (mm) desarrollados por los extractos activos en la prueba de difusión en agar**

Microorganismo de prueba: *Staphylococcus aureus*.

| Extracto                                 | Conc. del extracto<br>1000 µg | Conc. del extracto<br>500 µg | Control positivo |
|------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------|
| <i>Hyptis verticillata</i> (2a. colecta) | 15                            | 13                           | 29               |
| <i>Heliopsis longipes</i>                | 26                            | 22                           | 30               |
| <i>Metopium brownei</i> (madera)         | 13                            | 13                           | 29               |
| <i>Stenorhynchus lanceolatus</i>         | 13                            | 13                           | 32               |
| <i>Geranium niveum</i>                   | 14                            | 13                           | 31               |
| <i>Malmea depressa</i> (Corteza)*        | 19                            | 15                           | 31               |
| <i>Malmea depressa</i> (Corteza)         | 13                            | 13                           | 33               |
| <i>Datura lanosa</i>                     | 23                            | 20                           | 32               |

Control positivo: ampicilina (1 µg) (Diámetro del disco 13 mm).

**Cuadro 31. Diámetros de la zona de inhibición (mm) desarrollados por los extractos activos en la prueba de difusión en agar (Continuación)**

Microorganismo de prueba: *Bacillus subtilis*.

| Extracto                          | Conc. del extracto 1000µg | Conc. del extracto 500µg | Control positivo |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------|
| <i>Stenorrynchus lanceolatus</i>  | 15                        | 13                       | 25               |
| <i>Datura lanosa</i>              | 26                        | 20                       | 30               |
| <i>Ratibida latipalearis</i>      | 16                        | 14                       | 25               |
| <i>Malmea depressa</i> (corteza)  | 16                        | 13                       | 26               |
| <i>Malmea depressa</i> (corteza)* | 21                        | 19                       | 25               |

Control positivo: Estreptomicina (10 µg)

Microorganismo de prueba: *Trichophyton mentagrophytes*.

| Extracto                                 | Conc. del extracto 1000µg | Conc. del extracto 500 µg | Control positivo |
|------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------|
| <i>Ptelea trifoliata</i> (madera)        | 17                        | 13                        | 21               |
| <i>Ptelea trifoliata</i> (corteza)       | 15                        | 13                        | 21               |
| <i>Stenorrynchus lanceolatum</i>         | 13                        | 13                        | 21               |
| <i>Dysodia papposa</i>                   | 16                        | 13                        | 19               |
| <i>Dysodia papposa</i> *                 | 16                        | 14                        | 20               |
| <i>Malmea depressa</i> (corteza)         | 15                        | 13                        | 23               |
| <i>Malmea depressa</i> (corteza)*        | 33                        | 22                        | 22               |
| <i>Malmea depressa</i> (madera)*         | 16                        | 13                        | 18               |
| <i>Datura lanosa</i>                     | 18                        | 16                        | 19               |
| <i>Tournefortia hirsutissima</i> *       | 17                        | 15                        | 17               |
| <i>Helianthella quinquenervis</i>        | 33                        | 22                        | 22               |
| <i>Heliopsis longipes</i>                | 22                        | 16                        | 22               |
| <i>Geranium niveum</i>                   | 13                        | 13                        | 18               |
| <i>Ratibida latipalearis</i>             | 16                        | 14                        | 21               |
| <i>Cnidosculus tehuacanensis</i>         | 16                        | 14                        | 18               |
| <i>Hyptis verticillata</i> (2a. colecta) | 18                        | 13                        | 17               |

Control positivo Griseofulvina (8 µg)

(Diámetro del disco 13 mm). \*Extracto clorofórmico.

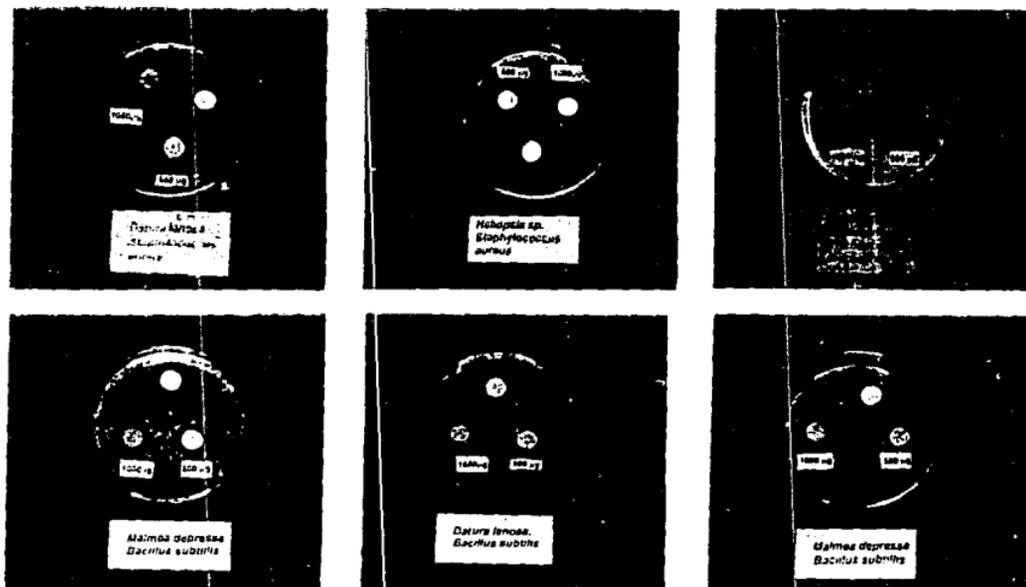


Figura 5. Diámetros de las zonas de inhibición (mm) desarrollados por los extractos activos en la prueba de difusión en agar.

6.1.4. Determinación de la Concentración Inhibidora Mínima (CIM) por el método de dilución.

Con la finalidad de cuantificar la actividad antimicrobiana de los extractos que demostraron una actividad significativa en la prueba de difusión en agar, se determinó la concentración inhibidora mínima (CIM) mediante el método de dilución en caldo, en el caso de las bacterias y el método de dilución en agar, en el caso de *Trichophyton mentagrophytes*. De manera adicional, en el método de dilución en caldo se determinó si la concentración inhibitoria mínima del extracto evaluado presentaba un efecto bactericida o bacteriostático. Los resultados obtenidos en este procedimiento se muestran en el Cuadro 32.

**Cuadro 32. Determinación de la Concentración Inhibidora Mínima (CIM) de las especies que resultaron activas en el ensayo de difusión.**

| MICROORGANISMO<br>EXTRACTO         | <i>B. subtilis</i>     | <i>S. aureus</i>   | <i>T. mentagrophytes</i> |
|------------------------------------|------------------------|--------------------|--------------------------|
| <i>Ptelea trifoliata</i> (madera)  | -                      | -                  | 750                      |
| <i>Ptelea trifoliata</i> (corteza) | -                      | -                  | 750                      |
| <i>Stenorrhynchus lanceolatus</i>  | 1000                   | >1000              | >1000                    |
| <i>Dysodia papposa</i>             | -                      | -                  | 1000                     |
| <i>Malmea depressa</i> (corteza)   | 450                    | -                  | 1000                     |
| <i>Malmea depressa</i> (corteza)*  | 160<br>Bacteriostático | 400                | 300                      |
| <i>Malmea depressa</i> (madera)*   | -                      | -                  | 1000                     |
| <i>Datura lanosa</i>               | 80<br>Bactericida      | 230<br>Bactericida | >1000                    |
| <i>Tournefortia hirsutissima</i> * | -                      | -                  | 750                      |
| <i>Heliantella quinquenervis</i>   | ?                      | ?                  | 300                      |
| <i>Heliopsis longipes</i>          | -                      | 400                | 80                       |
| <i>Geranium niveum</i>             | -                      | >1000              | >1000                    |
| <i>Ratibida latipalariis</i>       | 900                    | -                  | 900                      |
| <i>Cnidoscylus tehuacanensis</i>   | -                      | -                  | 400                      |
| <i>Hyptis verticillata</i>         | -                      | -                  | 700                      |

\*Extracto clorofómico.

El extracto de *Datura lanosa* presenta una actividad selectiva contra las bacterias gram positivas estudiadas. Por otra parte, los extractos de *Hyptis verticillata* y *Cnidocolus tehuacanensis* y *Helianthella quinquenervis* presentaron una actividad específica contra *Trichophyton mentagrophytes*. *Malmea depressa* presentó actividad contra las bacterias gram positivas y contra el dermatófito. Por último el extracto de *Heliopsis longipes* demostro actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Trichophyton mentagrophytes*. Por lo tanto se puede concluir que estas seis especies constituyen candidatos idóneos para la obtención de agentes antisépticos de origen vegetal mediante estudios fitoquímicos biodirigidos.

En el presente trabajo se encontraron ciertas discrepancias entre los resultados de la actividad antimicrobiana obtenidos para las especies *Lepidium virginicum* (Avila et al.,1993), *Heliopsis longipes* (Romero et al., 1989), *Ptelea trifoliata* (Mitscher et al., 1975), *Ratibida latipaliaris* y *Hyptis verticillata* (Rojas et al., 1992) y los descritos con anterioridad para las mismas. Asi el extracto de *Lepidium virginicum* demostró previamente actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* (Avila et al.,1993) misma que no fué posible reproducir en el presente trabajo. Por otra parte, Romero y colaboradores (1989) evaluaron el extracto alcohólico de *Heliopsis longipes*, el cual presentó actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En la presente investigación solamente se encontró actividad contra la bacteria Gram positiva. Hoffman y colaboradores. (1993) estudiaron la actividad antimicrobiana de *Plumbago scandens* y describieron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, y *Candida albicans*. Sin embargo, en el presente trabajo no se encontró actividad antimicrobiana contra ninguna de estos microorganismos.

En el caso de los extractos de *Ratibida latipaliaris* Rojas y colaboradores (1992) encontraron actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, en el presente trabajo *Ratibida latipaliaris* demostró actividad solamente contra *Bacillus subtilis*. En el caso del extracto de *Hyptis verticillata* se encontró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* y *Candida albicans* confirmandose la actividad antimicrobiana solo en las bacterias gram positivas y en la levadura. Es altamente factible que las diferencias encontradas para estas dos especies se deban a que en las investigaciones previas, los extractos se evaluaron a concentraciones mayores (20 mg/ml) que las ensayadas en este trabajo (1000 y 500 µg/ml).

El extracto etanólico de las partes aéreas de *Ptelea trifoliata* fue evaluado por Mitscher y colaboradores (1975) quienes demostraron que el extracto posee actividad antimicrobiana contra *Mycobacterium smegmatis* y contra *Candida albicans*, en este trabajo se evaluó el extracto metanólico de la corteza de esta especie y no se encontró actividad contra la levadura, en cambio se encontró actividad antimicrobiana contra *Trichophyton mentagrophytes*.

En general, las diferencias de actividad antimicrobiana encontradas para las especies *Lepidium virginicum*, *Heliopsis longipes*, *Ptelea trifoliata*, *Plumbago scandens*, *Hyptis verticillata* y *Ratibida latipaliaris* pueden ser debidas a las variaciones del habitat y del período de recolección de las plantas. Por lo tanto, es posible esperar una diferencia en el contenido de los metabolitos secundarios activos y en consecuencia, un cambio en las actividades biológicas ensayadas en el presente estudio (actividad antimicrobiana).

## 6.2. Determinación de la actividad citotóxica.

La determinación de la actividad citotóxica potencial se realizó también en dos etapas. En la primera, se determinó el efecto larvicida sobre el crustáceo *Artemia salina* (Anderson *et al.*, 1991). En la segunda etapa los extractos más tóxicos para *Artemia salina* se evaluaron como citotóxicos en contra de las líneas celulares HT-29 (adenocarcinoma de colon), MCF-7 (carcinoma de pecho) y A-549 (carcinoma de pulmón).

Los resultados del ensayo de toxicidad contra *Artemia salina* se indican en el Cuadro 33. Diez de los extractos ensayados demostraron buena actividad debido a que las  $CL_{50}$  eran menor de 200  $\mu\text{g/ml}$  (Anderson *et al.*, 1991). Los extractos activos incluyen los metanólicos de *Ilex rubra*, *Ptelea trifoliata* (corteza), *Datura lanosa*, *Geranium niveum*, *Conyza filaginoides*, *Hyptis verticillata*, *Heliopsis longipes*, *Helianthella quinquenervis* y *Malmea depressa* (corteza), y el extracto clorofórmico de *Malmea depressa* (corteza).

Considerando que el ensayo de *Artemia salina* se ha empleado en diversas ocasiones para detectar extractos citotóxicos y para monitorear estudios biodirigidos conducentes a la obtención de compuestos potencialmente antitumorales (Anderson *et al.*, 1991; McLauhlin *et al.*, 1991; Wah, 1993.), se decidió evaluar la actividad citotóxica de los extractos de *Ilex rubra*, *Geranium niveum*, *Dyssodia papposa*, *Malmea depressa* (corteza, extracto clorofórmico), *Heliantella quinquenervis*, *Datura lanosa* y *Heliopsis longipes*. Los resultados se presentan en el Cuadro 34. Se puede concluir que la especie de *Heliantella quinquenervis* presenta una buena actividad en contra de las células MCF-7 y las especies de *Ilex rubra* y de *Geranium niveum* muestran actividad marginal contra las líneas celulares de HT-29 y A-549, ya que los valores de  $DE_{50}$  fueron cercanos a 20  $\mu\text{g/ml}$  (Anderson *et al.*, 1992; Suffness y Pezzuto, 1991).

**Cuadro 33. Resultados del bioensayo con *Artemia salina***

| Especie vegetal                     | LC <sub>50</sub> (µg/ml) |
|-------------------------------------|--------------------------|
| <i>Elytraria imbricata</i>          | >1000                    |
| <i>Perityle batopilensis</i>        | >1000                    |
| <i>Plumbago scandens</i>            | >1000                    |
| <i>Ilex rubra</i>                   | 40.63                    |
| <i>Cardiospermum corindum</i>       | >1000                    |
| <i>Ptelea trifoliata</i> (Corteza)  | 63.06                    |
| <i>Datura lanosa</i>                | 68.86                    |
| <i>Cigarrilla mexicana</i>          | >1000                    |
| <i>Dysodia papposa</i>              | 50.12                    |
| <i>Dysodia papposa</i> *            | 40.01                    |
| <i>Geranium niveum</i>              | 88.46                    |
| <i>Perityle batopilensis</i> *      | 815.21                   |
| <i>Anredera scandens</i>            | 430.82                   |
| <i>Galphimia glauca</i>             | >1000                    |
| <i>Kohleria deppeana</i>            | >1000                    |
| <i>Swietenia humillis</i>           | >1000                    |
| <i>Ptelea trifoliata</i> (madera)   | >1000                    |
| <i>Toumefortia hirsutissima</i>     | >1000                    |
| <i>Acalypha phleoides</i>           | >1000                    |
| <i>Bunchosia lindeniana</i> (hoja)  | >1000                    |
| <i>Bunchosia lindeniana</i> (tallo) | >1000                    |
| <i>Toumefortia hirsutissima</i> *   | >1000                    |
| <i>Conyza filaginoides</i>          | 342.05                   |
| <i>Lepidium virginicum</i>          | >1000                    |
| <i>Commelina erecta</i>             | >1000                    |
| <i>Cnidosculus herbaceus</i>        | >1000                    |
| <i>Cnidosculus tehuacanensis</i>    | 662.53                   |
| <i>Hyptis verticillata</i>          | 81.69                    |
| <i>Helipopsis longipes</i>          | 58.65                    |
| <i>Pteridium arachnoideum</i>       | >1000                    |
| <i>Helliantela quinquenervis</i>    | 6.90                     |
| <i>Metopium brownei</i> (madera)    | 214.00                   |
| <i>Metopium brownei</i> (corteza)   | 104.00                   |
| <i>Malmea depressa</i> (corteza)    | >1000                    |
| <i>Malmea depressa</i> (corteza) *  | 62.46                    |
| <i>Malmea depressa</i> (madera)     | >1000                    |
| <i>Malmea depressa</i> (madera) *   | 235                      |
| <i>Stenorynchus lanceolatum</i>     | >1000                    |

\*Extracto clorofórmico.

**Cuadro 34. Resultados de los ensayos de citotoxicidad contra tres líneas celulares.**

| Extracto                           | DE <sub>50</sub> (µg/ml)<br>Línea celular |                    |                    |
|------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------|--------------------|
|                                    | HT-29 <sup>a</sup>                        | MCF-7 <sup>b</sup> | A-549 <sup>c</sup> |
| <i>Ilex rubra</i>                  | 29.33                                     | 49.13              | 31.28              |
| <i>Geranium niveum</i>             | 29.33                                     | 84.65              | 49.89              |
| <i>Malmea depressa</i> (Corteza) * | 20.96                                     | 20.86              | 20.57              |
| <i>Helianthella quinquenervis</i>  | >100                                      | 13.10              | 36.46              |
| <i>Dysodia papposa</i>             | 30.25                                     | 46.24              | 50.46              |
| <i>Datura lanosa</i>               | **                                        | **                 | **                 |
| <i>Heliopsis longipes</i> .        | **                                        | **                 | **                 |
| Lunidonina                         | 48.57                                     | 50.49              | 47.25              |

DE<sub>50</sub> Dosis efectiva 50.

<sup>a</sup>Adenocarcinoma de colon humano, <sup>b</sup>Carcinoma humano de pecho, <sup>c</sup>Carcinoma de pulmón humano

\*Extracto clorofórmico.

\*\*En espera de resultados.

### 6.3 Aislamiento y Caracterización de la lunidonina de la corteza de *Ptelea trifoliata*.

A partir del extracto metanólico de la corteza de *Ptelea trifoliata* se obtuvieron 984.4 mg de un sólido cristalino que se caracterizó como la lunidonina, alcaloide quinolínicico obtenido previamente de esta especie (Szendrei *et al.*, 1974).

Como el extracto demostró toxicidad para *Artemia salina* (CL<sub>50</sub> 63.06 µg/ml), se realizó un estudio biodirigido del extracto preparado a partir de 200 g del material vegetal, (Cuadro 24, Sección experimental). En esta ocasión, se empleó la toxicidad contra *Artemia salina* para monitorear el estudio. Como método de fraccionamiento inicial se escogió la cromatografía en columna

abierta sobre gel de sílice y como resultado de este proceso se obtuvo una fracción activa con una  $CL_{50}$  de 33.59  $\mu\text{g/ml}$  (Fracción III, Cuadro 24, sección experimental), la cual contenía a la lunidonina ( $CL_{50}$  de 33.81  $\mu\text{g/ml}$ ) como el único producto mayoritario. Para su aislamiento se utilizó una cromatografía preparativa en capa delgada siguiendo los procedimientos especificados en la sección experimental.

La caracterización del alcaloide se realizó por comparación de sus constantes físicas y de los datos derivados de los espectros de IR y de  $^1\text{H}$  RMN con las previamente descritas (Szendrei *et al.*, 1974).

Los datos de RMN de  $^{13}\text{C}$  para este producto no están descritos en la literatura. Sin embargo, el análisis detallado del mismo permitió comprobar la designación estructural previamente realizado por el grupo de Szendrei (1974). El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 3) mostró señales para 17 carbonos, indicando que dos de ellos son coincidentes de acuerdo con el número de carbonos requeridos por la fórmula molecular. El análisis del espectro DEPT (totalmente desacoplado), así como consideraciones de la teoría del desplazamiento químico, permitieron discriminar y asignar señales que se muestran en el Cuadro 37. Un análisis de difracción de rayos X permitió establecer de manera inequívoca la conformación en estado sólido de este alcaloide. En la Figura 6 se muestra una vista estereoscópica de la estructura y claramente se aprecia la coplanaridad de los anillos A, B y C. En el Cuadro 36 se presentan estas características espectroscópicas y espectrométricas de la lunidonina.

Considerando la moderada toxicidad de la lunidonina contra *Artemia salina* se decidió explorar otras actividades potenciales para este compuesto. En primer lugar se evaluó la potencialidad citotóxica en contra de las líneas

celulares MCF-7, HT-29 y A-549. Los resultados se indican en el Cuadro 34 y como se desprende de los mismos, el compuesto carece de propiedades citotóxicas, ya que en todos los casos los valores de DE<sub>50</sub> (Dosis efectiva 50) fueron mayores de 4 µg/ml (Anderson *et al.*, 1991).

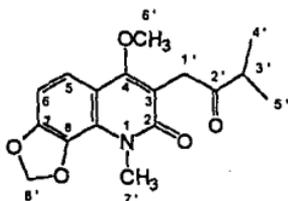
Por otra parte se evaluó la actividad potencial de la lunidonina como agente antiprotozoario. Los organismos seleccionados con base a su disponibilidad fueron *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*. Las evaluaciones correspondientes se realizaron en la Unidad de Investigación Clínica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, del Centro Médico Nacional Siglo XXI bajo la dirección del Dr. Roberto Cedillo Rivera. Las evaluaciones se efectuaron de acuerdo a los protocolos previamente descritos (Cedillo-Rivera, *et al.*, 1992 a, 1992 b, 1992 c). Los resultados de las evaluaciones se indican en el Cuadro 35. Cabe hacer notar que los ensayos efectuados se basan en la medida de la viabilidad de los trofozoitos de ambos protozoarios en presencia de los compuestos de prueba. De acuerdo a los resultados del Cuadro 35 es evidente que la lunidonina es inactiva en contra de los dos protozoarios.

**Cuadro 35. Susceptibilidad de *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* a la lunidonina.**

| Compuesto    | CI <sub>50</sub> (µg/ml)     |                        |
|--------------|------------------------------|------------------------|
|              | <i>Entamoeba histolytica</i> | <i>Giardia lamblia</i> |
| Lunidonina   | 79.67                        | 129.405                |
| Metronidazol | 0.05                         | 0.21                   |

CI<sub>50</sub> Concentración inhibitoria 50.

**Cuadro 36. Constantes físicas y espectroscópicas de la lunidonina.**



Fórmula molecular: C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>

Punto de fusión: 107-109 °C

IR KBr (cm<sup>-1</sup>)

1702, 1644, 1604, 1474, 1366, 1258

(Espectro 1)

RMN <sup>1</sup>H DMSO-d<sub>6</sub>, 300 MHz (ppm) 7.42 (d, J=9 Hz, H-5), 6.89 (d, J=9 Hz, H-6),

(Espectro 2)

6.07 (s, OCH<sub>2</sub>O), 3.82 (s, OCH<sub>3</sub>), 3.82 (s, NCH<sub>3</sub>), 3.79 (s CH-1'), 2.87 (sep, J=10.5 Hz, CH-3'), 1.18 (d, J=7 Hz, CH<sub>3</sub>-4' y CH<sub>3</sub>-5')

**Cuadro 37. Señales observadas en los espectros de  $^{13}\text{C}$  RMN.  
(Espectros 3 y 4).**

| Tipo de Carbono | Señales                                                                                                                                                                                      |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\text{CH}_3$ - | Dos metilos alifáticos: $\delta$ 18.77 (C 4' y C5')<br>Un N-metilo: $\delta$ 33.25 (C 7')<br>Un Oximetilo: $\delta$ 62.75 (C 6')                                                             |
| $\text{CH}_2$ - | Un metileno unido a carbono aromático: $\delta$ 37.87 (C1')<br>Un metilendioxi: $\delta$ 102.82 (C 8')                                                                                       |
| CH-             | Dos metinos aromáticos: $\delta$ 106.23 y 119.48 (C6 y C5)<br>Un metino alifático: $\delta$ 42.05 (C3')                                                                                      |
| C-              | Seis señales en la zona de carbonos aromáticos: $\delta$ 115.24 (C-3), $\delta$ 115.76 (C-4a), $\delta$ 126.80 (C-8a), $\delta$ 135.20 (C-4), $\delta$ 151.31 (C-7), $\delta$ 164.04 (C-8),. |
| C=O             | Un carbonilo de lactama $\delta$ 165.42 (C2)<br>Un carbonilo de cetona $\delta$ 214.17 (C2')                                                                                                 |

De manera adicional se aisló un sólido blanco caracterizado como manitol, al ser comparado con una muestra auténtica .

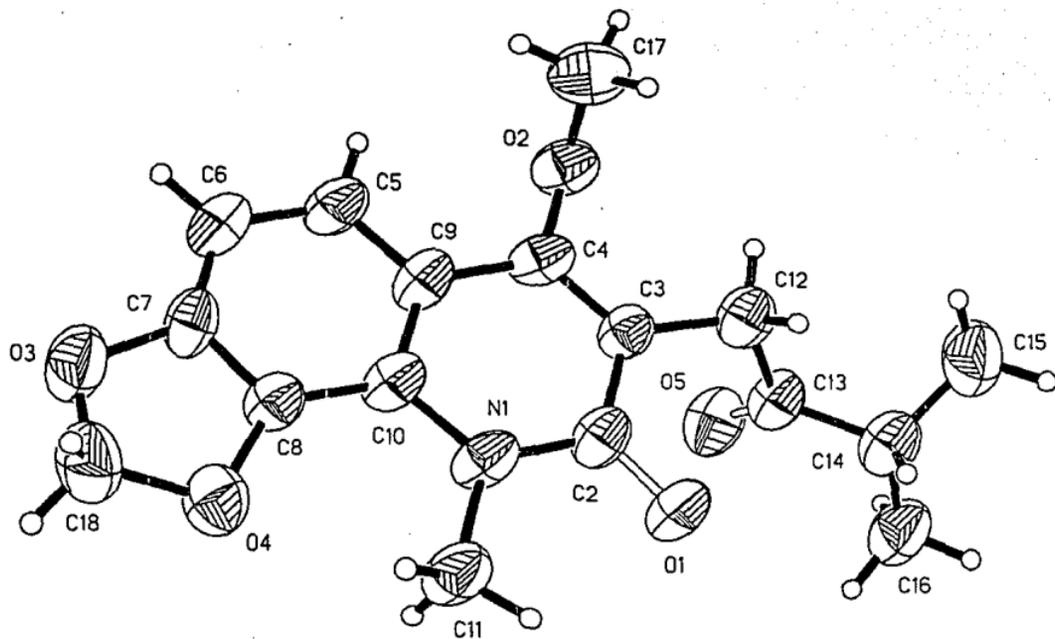
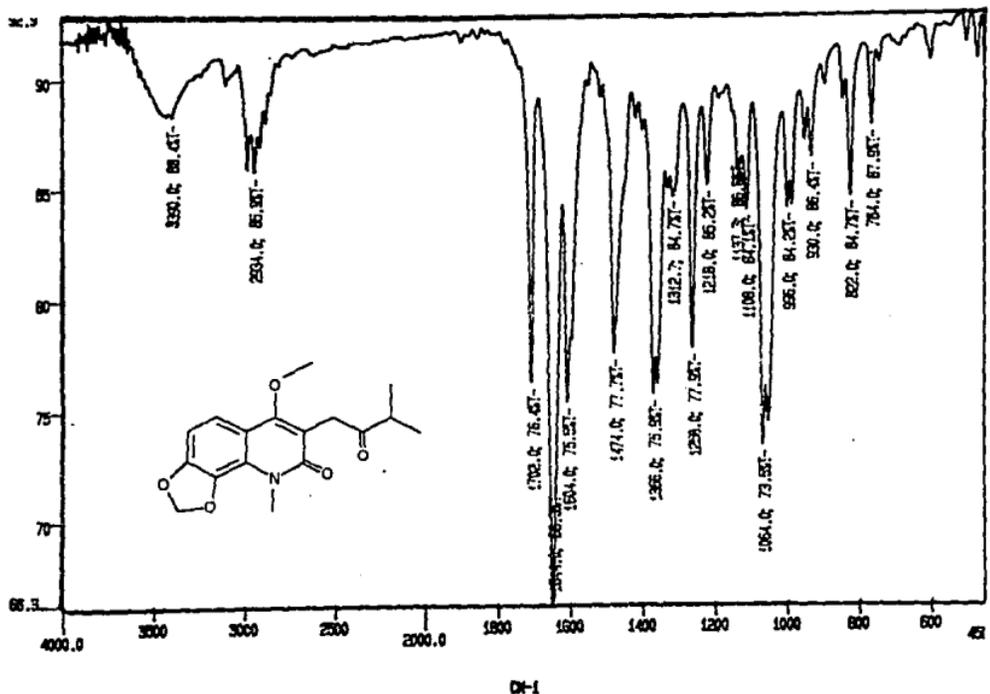
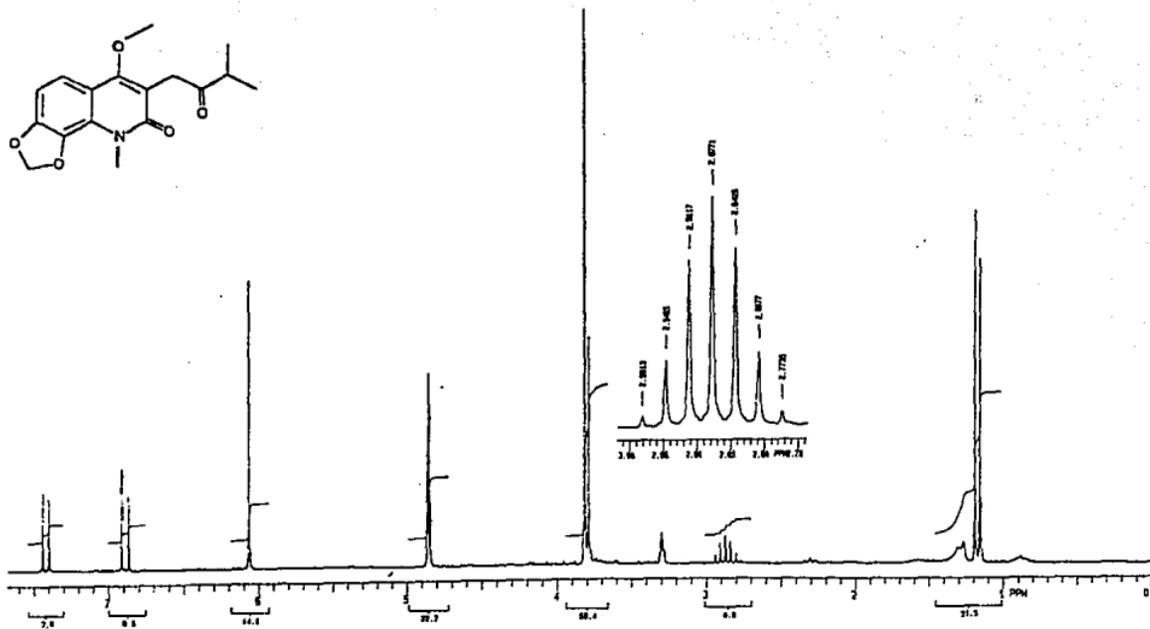


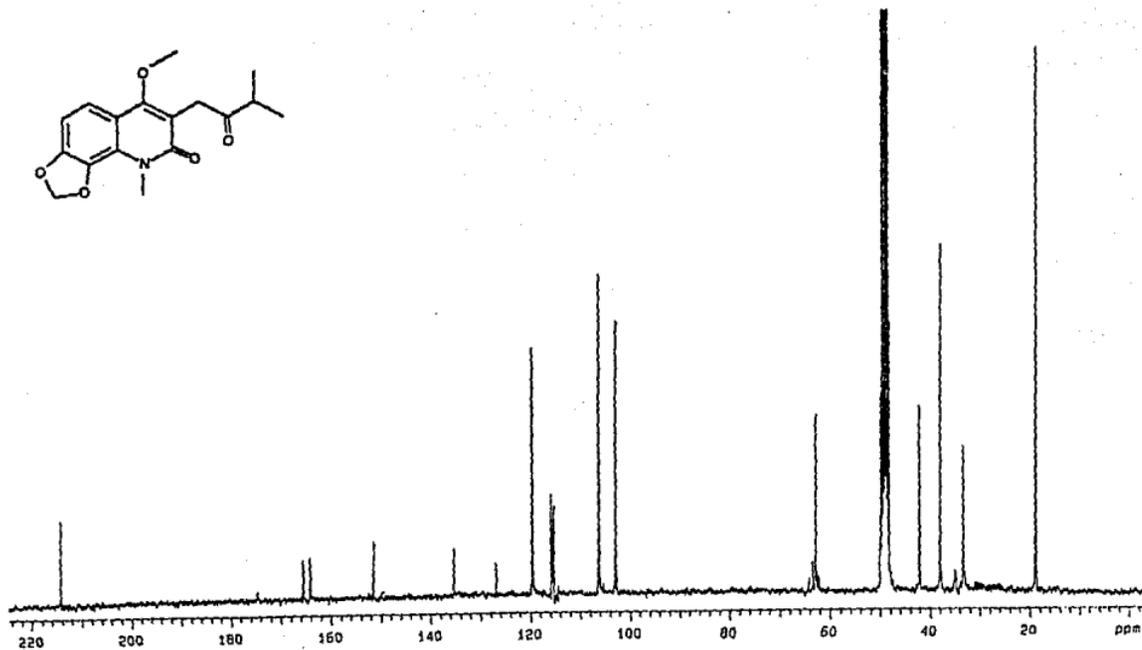
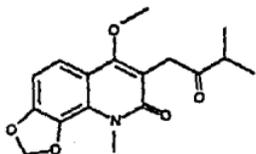
Figura 6. Vista estereoscópica de la estructura de la lunidone.



Espectro 1.

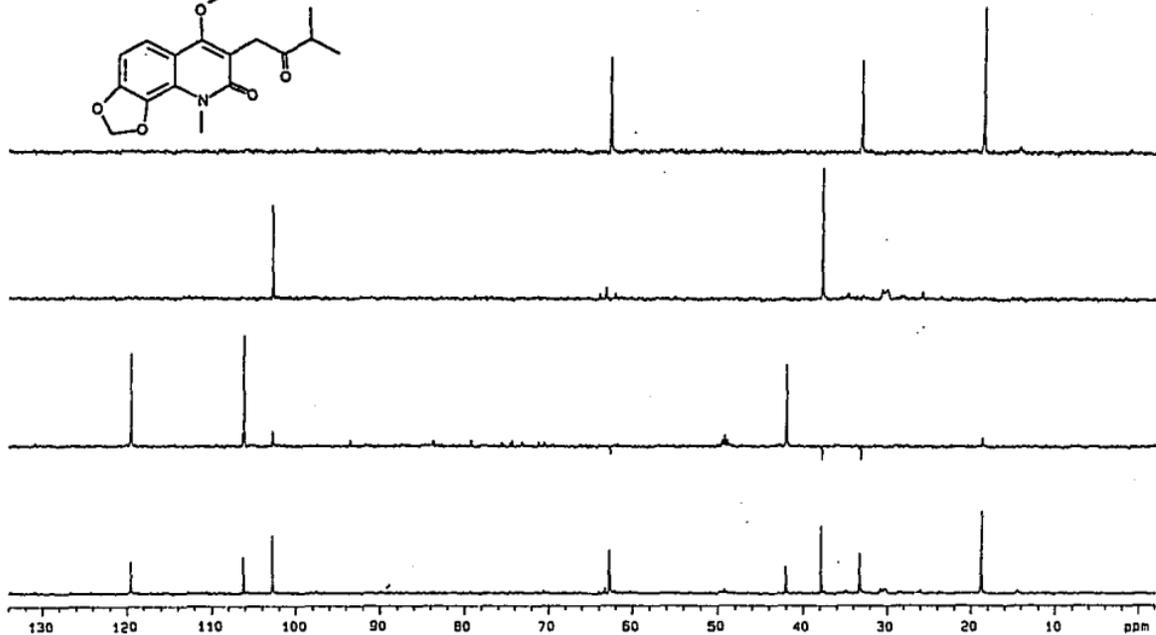
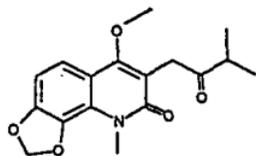


Espectro 2.



114

Espectro 3.



115

Espectro 4.

## 7. CONCLUSIONES.

1. El ensayo preliminar de dilución en agar de los extractos de las especies objeto del presente estudio permitió detectar 16 especies vegetales con actividad antimicrobiana contra los diferentes microorganismos de prueba.

En una segunda etapa, al realizar la determinación antimicrobiana cualitativa por el método de difusión en agar se detectaron diez especies con actividad antimicrobiana (*Ptelea trifoliata*, *Dysodia papposa*, *Malmea depressa*, *Datura lanosa*, *Tournefortia hirsutissima*, *Helianthella quinquenervis*, *Heliopsis longipes*, *Ratibida latipaliaris*, *Cnidosculus tehuacanensis* e *Hyptis verticillata*).

La cuantificación de la actividad antimicrobiana de los nueve extractos más activos permitió detectar cinco especies con propiedades antisépticas significativas. Estas especies incluyen *Datura lanosa*, *Malmea depressa*, *Heliopsis longipes*, *Helianthella quinquenervis* y *Cnidosculus tehuacanensis*. Las cuales constituyen candidatos idóneos para la obtención de principios activos con propiedades antisépticas mediante procedimientos biodirigidos de investigación fitoquímica.

2. La determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* permitió detectar diez especies con posibles actividades biológicas más complejas: *Ilex rubra*, *Ptelea trifoliata*, *Datura lanosa*, *Dysodia papposa*, *Geranium niveum*, *Conyza filaginoides*, *Heliopsis longipes*, *Helianthella quinquenervis*, *Metopium brownei* y *Malmea depressa*.

Los extractos de *Datura lanosa*, *Heliopsis longipes* y *Dysodia papposa* no mostraron actividad citotóxica contra las líneas celulares ensayadas que incluyen HT-29 (Adenocarcinoma de colon), MCF-7 (Carcinoma de pecho) y A-549 (Carcinoma de pulmón). Por otra parte, los extractos de *Ilex rubra*,

*Geranium niveum* y *Malmea depressa* demostraron actividad citotóxica marginal para dichas líneas celulares. El extracto de *Helianthella quinquenervis* demostró actividad citotóxica específica contra la línea celular MCF-7. Por lo tanto estas especies constituyen candidatos idóneos para la obtención de principios activos citotóxicos mediante procedimientos biodirigidos de investigación fitoquímica.

3. El fraccionamiento biodirigido mediante la determinación de la toxicidad para *Artemia salina* del extracto metanólico de *Ptelea trifoliata* permitió la obtención de la lunidonina como uno de los constituyentes activos mayoritarios presentes en las fracciones tóxicas para *Artemia salina* de esta planta medicinal. El análisis de difracción de rayos X permitió establecer de manera inequívoca la estructura en estado sólido de este alcaloide.

4. El alcaloide lunidonina resultó inactivo como agente potencial citotóxico y antiprotozoario.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- American Type Culture Collection (1989). *Catalogue of Bacteria and Phages*. 17ª ed., Maryland.
- Anderson, J.E., Goetz, C.M., McLaughlin, J.L. y Sufness, M. (1991). A Blind Comparison of Simple Bench-top, Bioassays and Human Tumour Cell Cytotoxicities as Antitumor Prescreens. *Phytochemical Analysis* 2, 107-111.
- Avila, A.J.G., Muñoz L.J.L. y Martínez C.G. (1993). In-vitro Antimicrobial Activity of Various Plant Extracts Used by Purepecha Against Some Enterobacteriaceae. *International Journal of Pharmacognosy* 31, 61-64.
- Buchanam, R.E. Y Gibbons, N.E. (Editores) (1974). *Bergey's Manual of Bacteriology*. 8a. ed., The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
- Bhattacharyya, J. y De Carvalho V.R. (1986). Epi-isoshinanolone from *Plumbago-scandens*. *Phytochemistry* 25, 764-765.
- Burres, N.S., Hunter, J.E. y Wright, A.E. (1989). A Mammalian Cell Agar-Diffusion Assay for the Detection of Toxic Compounds. *Journal of Natural Products* 52, 522-527.
- Bye, R. A., Mata, R. y Pimentel J. (1991). Botany, Ethnobotany and Chemistry of *Datura lanosa* (Solanaceae) in México. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie. Botanica* 61, 21-41.
- Bye, R. A. (1986). *Datura lanosa*, a New Species of *Datura* from México. *Phytologia* 61, 204-206.
- Cabrera, C.E., Sousa, S.M. y Tellez, V.O. (1982). *Imágenes de la Flora Quintanaroense*. Centro de Investigaciones de Quintana Roo. A.C.E. Instituto de Biología, UNAM. 12-17, 20-27 y 130.

- Cáceres, A., Torres, M.F., Ortiz, S., Cano, F. y Jauregui E. (1993). Plants Used in Guatemala for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. IV. Vibriocidal Activity of five American Plants Used to Treat Infections. *Journal of Ethnopharmacology* **39**, 73-75.
- Calzada, F., Mata, R., Bye, R. y Linares, E. (1990). A Retrochalcone from *Anredera scandens*. *Phytochemistry* **29**, 2737-2738.
- Camacho, M. del R. y Rios, P. (1987). Estudio Fitoquímico de *Cigarrilla mexicana*, Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Castañeda, P. (1987). Constituyentes de la *Cigarrilla mexicana* Parte II, Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- Cedillo-Rivera, R., Ramírez, A. y Muñoz, O. (1992a). *Archives of Medical Research*. **23**, 59-61.
- Cedillo-Rivera, R., Tapia-Contreras, A. y Muñoz, O. (1992b). *Archives of Medical Research*. **23**, 240.
- Cedillo-Rivera, R. y Muñoz, O. (1992c). *Journal of Medical Microbiology*. **37**, 221-224.
- Chilton, M.D. (1983). A Vector for Introducing New Genes Into Plants. *Scientific American* **248**, 50-59..
- Chineux, J.C., Maupas, Ph., Rideau, M., Verchere, C. y Viel, C. (1976). Cellular growth inhibitory properties of some furoquinoleic alkaloids isolated from Rutaceae. *C. R. Hebd. Secnces. Acad. Sci., Ser. O.* **283**, 101-104.
- Clark, A.M. El-Feraley y Li, W. (1981). Antimicrobial activity of phenolic constituentes of *Magnolia grandiflora* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **70**, 951-952.

- Crimino, G., De Giulio, A., De la Rosa, S. y Dimarzo, V. (1990). Minor Bioactive Polyacetylenes from *Petrosia ficiformis*. *Journal of Natural Products* **53**, 345-353.
- Cruz, M.J.G. (1991). Estudio Fitoquímico Preliminar de la "Hierba Martina" (*Hyptis verticillata*, Jacq.). Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma Benito Juárez de Oaxaca.
- Díaz J.L. (1976). *Índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México*. Monografías Científicas I y II. Instituto Mexicano para el estudio de las Plantas Medicinales, A.C.
- Domínguez, X.A., Quintero, G. y Butruille, D. (1972). Triterpenoids and Triacontano from *Conyza filaginoides*. *Phytochemistry* **11**, 1855-1856.
- Douros, J. y Sufness, M. (1978). *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **1**, 91.
- Farouk, A., Bashin, A.K. y Salih, K.M. (1983). Antimicrobial Activity of Certain Sudanese Plants Used in Folkloric Medicine. Screening for antimicrobial activity I. *Fitoterapia* **54**, 3-7.
- Ferrigni, N., McLaughlin, J.L., Powell, R.G. y Smith, C.R. (1984). Use of Potato Disc and Brine Shrimp Bioassays to Detect Activity and Isolate Piceatannol as the Antileukemic Principle from the Seeds of *Euphorbia lagascae*. *Journal of Natural Products* **47**, 347-352.
- Finegold, S.M. y Baron, E.J. (1989). *Bailey, Scott. Diagnóstico Microbiológico*, 7ª edición. Ed. Medica Panamericana. Buenos Aires, 190-210.
- Frolova, V.I., Kuzovkoo, A.D. y Kibol'chich, P.N. (1964). Alkaloids of *Ptelea trifoliata*. L. The Structure of Pteleine. *Journal of General Chemistry URSS* **34**, 3542-3546.

- Gascón, M. y Figueroa. (1989). Estudio Fitoquímico de *Hyptis mutabilis* (Labiatae). Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.
- Geran, R.I., Freenber, N.H., MacDonald, N. y Abbot, J.J. (1972). *Cancer Chemotherapy Reports* 3. 1.
- German, V.F. (1971). Isolation and Characterization of Citotoxic Principles from *Hyptis verticillata* Jacq. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 60, 649-650.
- Gómez L.L. (1992). Estudio Químico y Biológico Preliminar de *Helianthella quinquenervis*. Tesis de Licenciatura, UNAM.
- Gonçalves de L.O., Leoncio d'A.I. y Maceil, M.C.N. (1968). Antimicrobial Substances of Higher Plants XXVII. Isolation of Plumbagina from *Plumbago scandens*. *Rev. Inst. Antibiot* 8, 95-97.
- Gudkind, G.O., Martino, V., Graña, N., Coussio, J. y De Torres, R. (1982). Screening of South American Plants for Biological Activities, 1: Antibacterial and antifungal activity. *Fitoterapia* 52, 213-218.
- Hamburger, M.O. y Cordell, G.A. (1987). A Direct Bioautographic TLC Assay. Four Compounds Possessing Antibacterial Activity. *Journal of Natural Products* 50, 19-22.
- Hamburger, M. y Hostettman, K. (1991). Bioactivity In Plants: the Link Between Phytochemistry and Medicine, *Phytochemistry* 30, 3864-3874.
- Heinrich, M. (1992). Economic Botany of American Labiatae en: *Advances in Labiatae Science*. Royal Botanical Gardens, Kew. R.M. Harley and T. Reynolds (eds.), 475-488.
- Heinrich, M., Kunt, M., Wright, C.W., Rimpler, H., Phillipson, J.D. Schandelmaier, A. y Warhust, D.C. (1992). Parasitological and microbiological evaluation of Mixe indian medicinal plants (México). *Journal of Ethnopharmacology* 36, 81-85.

- Herz, W. y Kulanthaivel, P. (1984). Chromans from *Helianthella quinquenervis*. *Phytochemistry* **23**, 435-437.
- Hoffman, H., Timmermann, B.N., McLaughlin, S.P. y Punnapayak, H. (1993). Potential Antimicrobial Activity of Plants from the Southwestern United States. *International Journal of Pharmacognosy* **31**, 101-115.
- Hufford, C.D., Funderburk, M.J., Morgan, S.M. y Robertson L.W. (1975). Two Antimicrobial Alkaloids from Heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **64**, 789-792.
- Ikram, M. y Inamul-Haq (1980) Screening of Medicinal Plants for Antimicrobial Activity Part.I. *Fitoterapia* **5**, 231-231.
- Inouye, D.A. y Inouye, R. (1980). *American Journal of Botany* **67**, 1394-1396.
- Jiménez, A., Pereda-Miranda, R., Bye, R., Linares, E. y Mata, R. (1993). Ratibinolide III, A Sesquiterpene lactone Glucoside from *Ratibida latipaliaris*. *Phytochemistry* **34**, 1079-1082.
- Jiménez, A. (1992). Reinvestigación Química y Biológica de la Planta Medicinal *Ratibida latipaliaris* Richards. Aislamiento e Identificación de un Polialcohol de las Fracciones de Mayor Polaridad de *Cigarrilla mexicana* (Zucc et Martius ex DC) AIELLO. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas, Facultad de Química, UNAM.
- Kahl, G. y Shell, J.S. (1982). *Molecular Biology of Plant Tumors*, Academic Press N.Y. E.U. 155-544.
- Kakrani, H.K. y Nair G. (1982). Antibacterial and Antifungal Activity of Volatile Oil from Seeds *Aglaiia odoratissima*. *Fitoterapia* **53**, 107-109.
- Kołodziejki, J., Mruk-Kiewiez, A. y Mionskowki, H. (1969). Physicochemical Investigations on the Oil from Seeds of the Genus *Lepidium*. *Diss. Pharm. Pharmacol* **21**, 235-239.

- Koneman, M.D.; Allen, M.D.; Dowel (h), Ph. D.; Janda, Ph. D.; Sommers, M. D. y Winn (h) M.D.D. (1984). 3ª edición. Ed. Médica Panamericana, México.
- Korosi, J., Szendrei, K., Novak, I., Reish, J., Blazso, G., Minker, E. y Koltai, M. (1976). Quaternary Alkaloids of *Ptelea trifoliata* II. Examination of the Components by an Indirect Method. *Herba Hung* 15, 9-17.
- Kowalska, M. y Borkowski, B. (1966). Alkaloids in Leaves and Roots of *Ptelea trifoliata*. *Acta Polon. Pharm* 23, 295-304.
- Linares, E., Bye, R. y Flores, B. (1990). Tes curativos de México. Universidad Nacional Autónoma de México. 105-106.
- Linton, A.H. (1983). Theory of Antibiotic Inhibition Zone Formation Disc Sensitivity Methods and MIC Determinations, en: *Antibiotics; Assessment of Antimicrobial Activity and Resistance*. Academic Press, N.Y. 19-31.
- Mac Faddin, J.F. (1984). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Ed. Médica Panamericana, México.
- Martínez, M. (1979). *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas*, Fondo de Cultura Económica, México, 1ª ed., 19-1209.
- Martínez, M. (1989). *Plantas Medicinales de México*, Editorial Botas, México, 6ª ed., 21-613.
- Mata, R. (1993). Chemical Studies and Biological Aspects of Some Mexican Plants Used in Traditional Medicinal, en: *Phytochemical Potential of Tropical Plants*. Edited by K.R. Downum et al. Plenum Press, N.Y.
- Mata, R., Rios, L., Camacho, M. del R., Reguero, M.T. y Lorence, D. (1988). Triterpenes from *Cigarrilla mexicana*. *Phytochemistry* 27, 1887-1889.

- Mata, R., Castañeda, P., Camacho, M. del R. y Delgado, G. (1989). Chemical Studies on Mexican Plants Used in Traditional Medicine, V: Cucurbitacin glucosides from *Cigarilla mexicana*. *Journal of Natural Products* **51**, 836-839.
- Mata, R., Rojas, A., Soriano, M., Villena, R., Bye, R. y Linares, E. (1990). Ratibinolide, A New Sesquiterpene Lactone from *Ratibida latipaliaris*, *Heterocycles* **31**, 1111-1114.
- McLaughlin J.L. (1991). Crown Gall Tumours on Potato Discs and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plants Screening and Fractionation. *Methods in Plant Biochemistry* 1-32.
- Melo, A.M., Jardim M.L., De Santana, C.F., Lacet, Y., Lobo Filho, J., Delima e Ivan Leoncio, O.G. (1974). First Observations on the Topical Use of Primin, Plumbagin and Maytenin in patients with skin cancer. *Rev. Inst. Antibiot.* **14**, 9-16.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.A., Putnam, J.E., Jacobsen L.B., Nichols D.E. y McLaughlin J.L. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Plant Research Medica* **45**, 31-34.
- Mitscher, L.A., Bathala, M.S., Clark, G.W. y Beal, J.L. (1975). Antimicrobial Agents From Higher Plants. The Antimicrobially Inactive Components of *Ptelea trifoliata* L. *Lloydia* **38**, 117-123.
- Mitscher, L.A., Drake, S. y Gollapudi, S.R. (1987). A Modern Look at Folkloric Use of Anti-infective Agents. *Journal of Natural Products* **50**, 1025-1040.
- Mitscher, L.A. y Rao, G.S.R. (1984). The Search for New Antimicrobial Agents: Unusual Source, en: *Natural Products and Drug Development* Munksgaard, Copenhagen. Denmark, 193-212.
- Mulvey, R.K. y Jalewski, C.J. (1969) Kukosaginine. Plant Source and Its Isolation from *Ptelea trifoliata* Root bark. *Economic Botany* **23**, 75-81.

- Noguera, B., Camacho, M. del R., Mata, R., Bye, R. y Linares, E. (1994). Constituents of *Kohleria deppeana*. *Fitoterapia* **LXV**, 182.
- Novak, I., Szendrei, K., Papay, V., Minker, E. y Koltai, M. (1970). Hungarian Rutaceae Species: *Ptelea trifoliata*. *Herba Hung* **9**, 23-31.
- Novelo, M., Cruz, J.G., Hernández, L., Pereda-Miranda R., Chai, H., Mar, W. y Pezzuto, J.M. (1993). Citotoxic Constituents From *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural products* **56**, 1728-1736.
- Okorie, D.A. y Taylor, D.A.H. (1971). Meliaceae. Limonoids from *Swietenia humilis*. *Phytochemistry* **10**, 469-470.
- Olukoya, D.K., Idika, N. y Odugbemi, T. (1993). Antibacterial Activity of Some Medicinal Plants from Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology* **39**, 69-72.
- Pennigton, W.C. (1963). *Ceremonial and Drug Plants in the Tarahumar of Mexico*. Their Environment and Material Cultures. University of Utah Press.
- Pereda-Miranda, R., Hernández, L., Villavicencio, M.J., Novelo, M., Ibarra, P., Chai, H., y Pezzuto, J.M. (1993). Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihidro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis pectinata*. *Journal of Natural Products* **56**, 583-593.
- Petit-Paly, G., Montagu, M., Merienne, C., Ambrose, J.D., Rideau, M., Viel, C. y Chenieux, J.C. (1989). New Alkaloids from *Ptelea trifoliata*. *Planta Med* **55**, 209-210.
- Powel, R.G. y Smith, C.R. (1980). *Recent Advances in Phytochemistry* **14**. Plenum Press, N.Y. E.U., 23.
- Ream, L.W. (1982). Crow gall disease and prospects for genetic manipulation of plants. *Science*, **218**, 854-859.

- Reisch, J., Szendrei, K., Novak, I., Minker, E. y Papay, V. (1969). Chemistry of Natural Products. XXVI. Components of *Ptelea trifoliata* blossoms. Arctigenin methyl ether, (+)-Hydroxylunine, and ptelefolin. *Tetrahedron Letters*, 3803-3806.
- Reish, J., Szendrei, K., Novak, I., Minker, E., Korosi, J. y Csedo, K. (1972). Natural Product Chemistry 35. Three New 2-quinoline Alkaloids from *Ptelea trifoliata*. *Tetrahedron Letters*, 449-452.
- Reish, J., Mirhom, Y.W., Korosi, J., Szendrei, K. y Novak, I. (1973). Natural Products Chemistry XLV. O-Methylptelefolonium as *Ptelea* Leading Alkaloid. *Phytochemistry* 12, 2552-2553.
- Reish, J., Korosi, J., Szendrei, K., Novak, I. y Minker, E. (1975). Natural Products Chemistry 50 Coumarins and Quinoline Alkaloids from Root Bark of *Ptelea trifoliata*. *Phytochemistry* 14, 1678-1679.
- Reish, J., Korosi, J., Szendrei, K., Novak, I. y Minker, E. (1975). Studies in the Area of Natural Products Chemistry LIII. 7,8-Methylenedioxyquinoline Derivates as Alkaloids of the Flowers of *Ptelea trifoliata*. *Phytochemistry* 14, 840-841.
- Reish, J., Mester, I., Szendrei, K., Koeroesi, J. y Szendrei, K. (1978). Studies on Natural Products. 66. Pteleodimerine. The First Dimeric Quinolone Alkaloid. *Tetrahedron Lett* , 3681-3682.
- Richards, E.L. (1969). *Rhodora* 70, 348.
- Rideau, M., Verchere, C., Hibon, P., Chenieux, J.C., Maupas, P. y Viel, C. (1979). Dihydrofuroquinoline Alkaloids From Rutaceae: Isolation Structure, Biological Properties. *Phytochemistry* 18, 155-159.
- Rios, J.L., Recio M.C. y Villar, A. (1988). Screening Methods For Natural Products With Antimicrobial Activity: A Review Of The Literature. *Journal of Ethnopharmacology* 23, 127-149.

- Rojas, A., Hernandez, L., Pereda-Miranda, R. y Mata, R. (1992). Screening For Antimicrobial Activity of Crude Drug Extracts And Pure Natural Products From Mexican Medicinal Plants. *Journal of Ethnopharmacology* **35**, 275-283.
- Rojas, A., Villena, R., Jiménez, A. y Mata, R. (1991). Chemical Studies on Mexican Plants Used in Traditional Medicine, XXI : Ratibinolide II, A New Sesquiterpene Lactone from *Ratibida latipalmaris*. *Journal of Natural Products* **54**, 1279-1282.
- Romero-R, C.M., Del Castillo, R.A.R., Martínez, M.A.C. y Calderon, C.J. (1989). Preliminary Studies on the Antibacterial Insecticidal and Toxicological Effects of the Chilcuan Root *Heliopsis longipes*. *Veterinaria* **20**, 151-156.
- Sahm, D.F. y Washington II, J.A. (1991). Antibacterial Susceptibility Test. Dilution Methods en Manual of Clinical Microbiology. 5ª edition, Editor in Chief Balows, A. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 1105-1116.
- Santamaría, F.J. (1978). Diccionario de Mejicanismos, 3ª edición, Editorial Porrúa, México.
- Segura-Correa, R., Mata, R., Anaya, A.L., Hernández-Bautista, B., Illena, R., Soriano-García, M. y Bye, R. (1993). New Tetranortriterpenoids from *Swietenia humilis*. *Journal of Natural Products* **56**, 1567-1574.
- Singh, K.V., Bhatt, S.K. y Sthapak, J.K. (1983). Antimicrobial and Anthelmintic properties of the Seeds of *Aegle marmelos*. *Fitoterapia* **54**, 261-264.
- Smith, A.R. (1981). Flora of Chiapas Published by the California Academy of Sciences. Part 2 Pteridophytes. Dennis E. Breedlove Editor.
- Standley, P.C. y Steyermark, J.A. (1946). Flora de Guatemala. Fieldiana: Botany **24** Part IV. Chicago Natural History Museum. 270-295.

- Suffness, M. y Pezzuto J.M. (1991). Assays Related to Cancer Drug Discovery, en: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol.6 . Hostettmann, K. (editor). 71-133.
- Szendrei, K., Novak, I., Petz, M., Reish, J., Bailey, H.E. y Bailey, V.L. (1973). Coumarins and Alkaloids from *Ptelea trifoliata* subspecies pallida var confinis. *Lloydia* **36**, 333-337.
- Szendrei, K., Petz, M., Novak, I., Reish, J., Bailey, H.E. y Bailey, V.L. (1974). Isolation and Structure Analysis of Quinoline Alkaloids and Coumarins from *Ptelea trifoliata* subspecies pallida var confinis. *Herba Hung* **13**, 49-61.
- Taniguchi, M. y Kubo, I. (1993). Ethnobotanical Drug Discovery Based on Medicine Men's Trials in the African Savanna; Screening of East African Plants for Antimicrobial Activity II. *Journal of Natural Products* **56**, 1539-1546.
- Tokarnia, C.H. y Dobereiner, J. (1982). Experimental poisoning of cattle by *Plumbago-scandens*. pesquisa *Veterinaria Brasileira* **2**, 105-112.
- Vanden Berghe, A.D. y Vlietinck J.A. (1991). Screening Methods for Antibacterial and Antiviral Agents From Higher Plants. *Methods in plant biochemistry* **6**, 47-67.
- Wagner, H. y Dersch, W. (1992). Pharmaceuticals Containing a Gallic Acid Derivate and/or Quercetin and Method for Isolating Them. *Ger. Offen D.E.* **4**,106-126.
- Wah, S. T. (1993). Toxicity Testing Using the Brine Shrimp: *Artemia salina*, en: Bioactive natural products. Detection, isolation and structural determination. Colegate S.M. y Molyneux, R.J. (editores). CRC Press, USA.

- Wall, M.E. y Wani M.C.(1977). *Annual Review Pharmacology and Toxicology* **17**, 117.
- Young, D.A. (1976). Flavonoid Chemistry and Phylogenetic Relationships of the Julianiaceae. *Systematic Botany* **1**.149-162.
- Young, D.A. (1979). Heartwood Flavonoids and the Infrageneric Relationships of Rhus (Anacardiaceae). *American Journal of Botany* **66**, 502-510.
- Zaenne, I., Van Larebeke, V., Teuchy, H., Van Montagu, M. y Schell, J. (1974). Supercoiled Circular DNA in Crown-Gall Inducing Agrobacterium Strains. *Journal of Molecular Biology* **86**, 109-127.