

34  
Res



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ACCION ANTIMICROBIANA DE LOS  
COMPUESTOS DE *Piqueria trinervia Cav.***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A**

**MAYTE CERVANTES VEGA**



MEXICO, D. F.

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



1995

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

**FALLA DE ORIGEN**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE**  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Facultad de Ciencias  
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron La pasante(s) **Mayra Cervantes Vega**

con número de cuenta 8533205-0 con el Título: Acción Antimicrobiana de los compuestos de **Piqueria trinervia**C.

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de **Biologa**

GRADO	NOMBRE(S)	APELLIDOS COMPLETOS	FIRMA
Dr.	Munuel	Jiménez Estrada	
Director de Tesis M. en C.	Arturo	Navarro Ocaña	
Dr.	Abraham	Rubluo Isles	
Dra.	Patricia	Guevara Fefer	
Suplente Biol.	María Cristina Julia	Pérez Reyes	
Suplente			

ACCIÓN ANTIMICROBIANA DE LOS  
COMPUESTOS DE *Piqueria trinervia* Cav



*Piqueria Trinervia*

El presente trabajo fué realizado en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Manuel Jiménez Estrada.

En la Facultad de Química Departamento de Microbiología, bajo la asesoría de la Dra. Biserka Sveshtarova Perkakova.

En el Jardín Botánico Instituto de Biología Lab. de Cultivo de Tejidos Vegetales bajo la asesoría técnica de la Biol. Ingrid Brunner Caligaris y el Dr. Abraham Rubluo Islas.

Dedicado especialmente

A mis padres Manola Vega y Pedro Cervantes por todo el apoyo, amor y comprensión que me han dado durante toda mi vida.

A mis hermanos Tana, Pedro, Gustavo, Rigoberto, Maricruz e Ivan por el apoyo que me han dado.

A mis sobrinos, cuñados y suegros por todo su apoyo.

A ti José Manuel M. por tu amor y paciencia por ver realizado uno de mis objetivos

A mis amigas Celia y Clementina por una sincera amistad durante todo este tiempo

A todos ustedes con cariño y admiración gracias.

## Agradecimientos

Al Dr. Manuel Jiménez por su apoyo durante todo el tiempo que duró este trabajo

Al Q.F.B. Manuel Flores por su ayuda en la realización de las pruebas microbiológicas.

A mis compañeros del Lab. 2-8 por hacer amena mi estancia en el laboratorio

A la Dra. Biserka Sveshtarova por su ayuda incondicional al revisar este trabajo.

A los sinodales Dr. Manuel Jiménez, Dr. Abraham Rubluo, Al M en C Arturo Ocaña a la Dra. Patricia Guevara y a la Biol. Cristina Pérez por su revisión y corrección de este manuscrito

Al laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y al Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales por permitirme utilizar sus instalaciones para las pruebas biológicas.

Al Colegio de Posgraduados, al departamento de biología de la facultad de química a la Biol Ingrid B. por su donación de los microorganismos

A todos ustedes gracias

## Indice.

	pag
Introducción.	1
Antecedentes.	3
Características generales de la planta <i>Piqueria trinervia Cav</i> Piquerol	
Estructura química	
Actividad biológica	
La contaminación en el cultivo de tejidos vegetales	
Características generales de los microorganismos estudiados	
Objetivos.	14
Parte experimental	15
Parte química	
Parte biológica	
Resultados y discusión.	26
Conclusión.	37
Espectros de resonancia magnetica nuclear	40
Bibliografía	45

## INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más importantes de la salud pública en nuestro país son las enfermedades infecciosas de origen bacteriano. Así mismo las bacterias son una de las causas comunes de enfermedades en plantas, provocan una considerable reducción en la producción y calidad de los productos vegetales y en ocasiones la destrucción del cultivo (Agris, 1991).

Actualmente las infecciones bacterianas se pueden controlar mediante el uso de compuestos quimioterapéuticos como son las sulfas y los antibióticos. No obstante el uso indiscriminado de estos últimos ha provocado resistencia creciente de las bacterias a estos fármacos (Chavez A., 1979).

Las Compuestas una de las familias más numerosas de las Angiospermas, comprende unos 1100 géneros y 25000 especies. La mayoría de sus miembros son arbustos o matas de hojas persistentes, o plantas herbáceas rizomatosas.

Su Distribución está repartida por todo el mundo, a excepción de los territorios antárticos, están especialmente representadas en las regiones semiáridas de los trópicos y subtropicos, como la región mediterránea, México, región de El Cabo de África del Sur y formaciones de sabanas arboladas, arbustivas y herbáceas de África, Sudamérica y Australia.

Características diagnósticas: hojas alternas u puestas, rara vez verticiladas, sin estípulas, simples, con nerviaciones pinnadas o palmeadas, sentadas o pecioladas, frecuentemente con base auriculada o envainada, generalmente lobuladas o dentadas, algunas veces suculentas, raramente terminadas en zarcillos, a veces reducidas a escamas o faltando completamente.

Las flores están dispuestas en cada capítulo de forma racemosa indeterminada y las mas externas maduran primero.

El fruto es de una semilla, indehisciente, casi siempre seco, llamado cápsula. Pueden ser anguloso, redondeada, diversamente comprimida o curvado, ornamentada o distintamente alado; a veces es una drupa con endocarpo carnoso, semillas sin endospermo y con embrión seco.

Clasificación., La clasificación de las compuestas se encuentra en estado de transición. Durante 20 años se ha aceptado, en general, subdivisión, en 12 tribus, pero en vista de los recientes descubrimientos en bioquímica, palinología, micromorfología, anatomía y citología, parecen necesarias algunas modificaciones. La clasificación que sigue comprende 2 subfamilias y 17 tribus. La tribu *Eupatoricas* y *Senecioneas* ocupan una posición intermedia, en algunos aspectos, entre las dos subfamilias y podría justificarse su segregación para formar con ambas una tercera subfamilia.

Usos. plantas alimenticias (lechuga alcachofa, girasol), ornamentales (crisantemo, dalias), insecticidas (Pyrethrum) y medicinales.

La planta *Piqueria trinervia* Cav a sido utilizada en la medicina natural popular en México desde hace más de 100 años. El nombre le era atribuido según el mal que remediara. Esta planta se utiliza en varias partes del país para combatir: el tifo, fiebres intermitentes, reumatismo, malaria, tiene propiedades estimulantes y según el médico naturista mexicano Oliva se ha empleado para problemas estomacales (González, V., 1890). Los indios usaban esta planta en cocimiento o en lavados contra

fiebres, especialmente en los casos de tifo exantemático y contra el paludismo, pero sólo se ha comprobado que abate la temperatura al modo de la aspirina sin ser remedio específico. Entre la población se dice, además que esta planta ha dado buenos resultados para combatir los cálculos biliares y en Zitácuaro Michoacán "para el constipado y nervios", usando en ambos casos el cocimiento. En Aguascalientes usan la infusión en alcohol en fricciones contra el reumatismo (Martínez, 1969).

Recientemente se ha estudiado uno de sus componentes químicos más abundante el terpeno piquerol "A" como alelopático acción herbicida sobre plantas (González de la Parra et al, 1981), molusquicida (Cruz Reyes et al 1989), se le ha encontrado actividad en contra de *Tripanosoma cruzi* agente causal de la enfermedad del chagas (Tripanosomiasis americana) (Castro et al, 1992).

## ANTECEDENTES

### Características generales de la planta *Piqueria trinervia*

*Piqueria trinervia* Cav. es una planta herbácea que pertenece a la Familia Compositae, Subfamilia Tribuliflorae, Tribu Eupatorieae, género *Piqueria*, especie *trinervia*, conocida también como :

Hierba del zopilote (Molango, Hidalgo)

Hierba de San Nicolas (Valle de México y Jalisco)

Hierba del tabardillo (Valle de México y Jalisco)

Hierba del Perro (Chiapas)

Oxonitsal (Mesa Central)

Tzotzaniztale (Morelos)

Cuimic (Tabasco y Michoacán)

Xexenitzal " "

Yoloxiltic " "

Alta reina (Taxco y Guerrero)

Empueste (Teloloapan, Guerrero). (Robinson, 1906) (Paray, 1953).

Presenta un olor particular (Hierba santa) y llega a medir de 70 cm a 1m de altura, tiene tallos numerosos de color rojo oscuro, las hojas son laceradas opuestas, casi siempre de tres nervaduras y obtusamente dentada en sus bordes, la inflorescencia es cimisa corimbosa, cada corimbo presenta de 3 a 5 flores, los frutos son aquenios, los jóvenes comprimidos, los adultos pentágonos.

Crece naturalmente en México, América Central, Haití y los Andes del Perú, en México se encuentra en Puebla, Veracruz, Guanajuato, Valle de México y otros lugares, crece a una altura de 2300 a 3000 m de altitud, principalmente en lugares con matorral y pastizal, aunque se extiende al bosque de pino encino.

Es conocida erróneamente como *Stevia serrata*, se encuentra en floración los meses de agosto a noviembre.

## **PIQUEROL "A" y otros componentes químicos de la *P. trinervia***

Romo et al. (1970), aislaron de plantas de *Piqueria trinervia* colectadas de distintos lugares, terpenoides que fueron identificados por resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas espectrofotometría de rayos infrarrojo. De la planta colectada del Pedregal de San Ángel también se identificaron acetato de carquejilo (1a), un constituyente cristalino al que se le dio el nombre de piquerol "A" (1b). De planta colectada en Atlacomulco (Estado de México) fué aislado y caracterizado un nuevo constituyente, piquerol B (1c) (Fig 1)

La estructura II fué aislada del extracto etanólico de *P. trinervia* colectada en tehuacán. fig1

Bohlman y Suwita (1978) aislaron 2 terpenos de *P. trinervia* el Santalol IIIa y Santalol IIIb (Fig1) de la raíz, Bohlman aisló e identificó los compuestos VII, VIIIa, VIIIb, VIIIc y IX..(Fig)

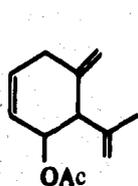
Jiménez y González de la Parra (1983), aislaron un compuesto llamado trinervinol IV (alcohol diterpénico), estableciendo su estructura química por datos espectroscópicos.(Fig1)

Soriano et al. (1983), determinaron la estructura cristalina del piquerol "A" por estudios de difracción de rayos X.

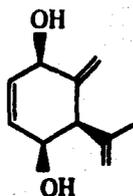
Rubio et al. (1985), efectuaron el análisis conformacional, determinaron la estructura electrónica de los terpenos del piquerol "A" y B su correlación con las propiedades químicas y biológicas que se manifiestan.

En 1985, Chavarín realizó modificaciones químicas al piquerol "A" por reacciones de esterificación que produjeron un cambio de conformación del anillo ciclohexánico al sustituir los hidrógenos de los grupos hidroxilo por grupos más voluminosos. Finalmente un análisis más detallado de éste comportamiento fué realizado por Rubio et al (1985), quien estableció la conformación más común del piquerol "A" y la de sus derivados serían la V y VI.(Fig1)

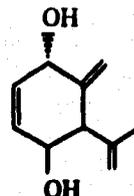
Estructura química de los componentes de la Piqueria trinervia Cav



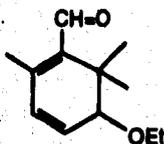
Acetato de Carquejilo  
**Ia**



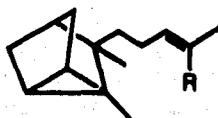
Piquerol A  
**Ib**



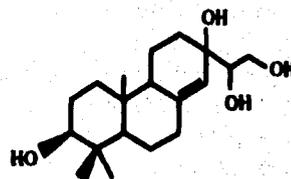
Piquerol B  
**Ic**



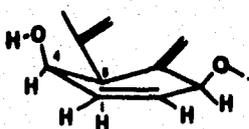
**II**



**IIIa**, Santalal, R=CH=O  
**IIIb**, Santalol, R=CH<sub>2</sub>-OH



Trinervinol  
**IV**

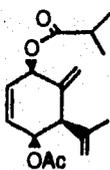


**V**

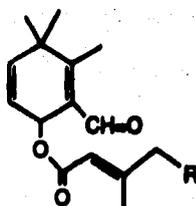


**VI**

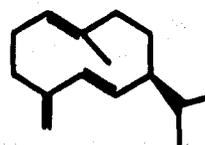
Conformaciones preferidas del Piquerol A y sus derivados.



Diester de Piquerol  
**VII**



Isoferulol-(4-R-sesacoato)  
**VIIIa**, R=OAc (acetoxy)  
**VIIIb**, R=OH (hydroxy)  
**VIIIc**, R=H



**IX**

Figura 1

### Actividad biológica del piquerol

Cruz-Reyes y col (1989), demostraron la actividad molusquicida del piquerol A sobre 8 especies de caracoles pulmonados. Se utilizaron tres concentraciones 50, 25 y 5 ppm para cada una de las especies y 2 periodos de exposición, 6 y 24 horas, a 20 y 22°. Después de 6 horas a una concentración de 50 ppm de exposición todos los caracoles murieron, la mortalidad fué variable cuando se utilizaron concentraciones de 25 y 5 ppm para todas las especies, pero la concentración de 25 ppm fué efectiva después de 24 hrs de exposición.

La concentración de 5 ppm después de las 24 horas de exposición fué mortal en más de 60 % de los casos. De estos estudios se concluye que el piquerol A pueda ser un excelente molusquicida para las áreas donde hay transmisión de *Schistosomiasis* y *Fascioliasis*.

González M. de la Parra y col (1981), probaron el potencial alelopático del piquerol A y B en 6 diferentes especies de semillas, de pastos dando buenos resultados. El porcentaje de inhibición fué de 50 al 100% las concentraciones utilizadas fueron de 50, 100, 150, 200 mg/ml.

El mismo ensayo se realizó con raíces obteniéndose los siguientes resultados, el piquerol "A" mostró ser más activo al inhibir el crecimiento de las raíces. El piquerol B tuvo un efecto inhibitorio en tallo pero en raíces no presentó inhibición. El lixiviado (planta en agua acuosa de las hojas causó una fuerte inhibición en las radículas de las semillas probadas en un 50 a 95%.

Las reacciones estudiadas sugieren una diferente fisiología y mecanismos bioquímicos de acción: permeabilidad de la membrana, interferencia metabólica, bloqueamiento de las auxinas, inhibición de la respiración mitosis, etc. Esto podría ser importante para el entendimiento del fenómeno de alelopatía de ésta planta.

Cruz Ortega y col en (1991), hicieron un estudio del efecto del piquerol "A" sobre el sistema de transporte a nivel de membrana, el cual era inhibido por el piquerol "A" y su derivado diacetil piquerol. El piquerol "A" y el diacetato de piquerol fueron probados con fracciones microsomales de *Ipomea purpurea*. Los resultados mostraron que a una concentración de 50 ppm de diacetato de piquerol, la inhibición radicular era total y con piquerol A (a las mismas concentraciones) fué 72.9%. Estos datos sugieren que la acción del diacetil piquerol in vivo está relacionada con la ATPasa de la membrana del plasma celular

González de la Parra, y col (1991), determinaron la actividad acaricida del piquerol A y piquerol B en garrapatas de *Boophilus microplus*, uno de los principales ectoparásitos que causan graves daños al sector ganadero en México. Los resultados mostraron que ambos piquerol A y B previenen la ovoposición; la concentración de 300 mg/ml de piquerol A causa 100% de mortalidad.

González de la Parra y col (1992), probaron el efecto inhibitorio del piquerol A sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* agente causante de la *Tripanosomiasis americana* ó enfermedad del Chagas. Las concentraciones empleadas del Piquerol A fueron de 800, 400, 200 y 100 mg/ml. En la concentración de 800 mg/ml se

presenta una lisis celular y en 100 mg/ml solo hay inhibición parcial en el crecimiento celular, finalmente en la concentración de 200 mg/ml, hay un efecto inhibitorio en el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* en 4 días de observación, estos datos de concentración son similares a los reportados para la Ofloxacina (compuesto sintético), que inhibe el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* en un 80%.

### **La contaminación en el Cultivo de Tejidos *in vitro*.**

La contaminación bacteriana *in vitro* es un problema común para metodologías del cultivo de tejidos vegetales y es difícil de detectar. Bacterias y hongos han sido reportadas como contaminantes en cultivos de tejidos *in vitro* (Blake 1988; Enjalric et al 1988; Leggat et al 1988). La contaminación con bacterias es considerada el problema mas serio y que reduce la producción de los cultivos *in vitro*. Las bacterias que generalmente aparecen en los cultivos son *Pseudomonas*, *Actinetobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter* y *Erwinia*. (Boxus and Terzi 1987; Cornu & Michel 1987; Podwyszynska & Hempel 1987; Singha et al 1987, Brunner et al 1995).

El explante cultivado *in vitro* puede permanecer sin contaminación de bacterias u otros organismos durante 7 meses y aparecer de repente la contaminación. Las bacterias que se encuentran con frecuencia en estos cultivos son: *Erwinia* (Knauss and Miller, 1977; Peromelon and Kelman, 1980 *Pseudomonas*, *Bacillus* (Jones, J.B., 1979) *Epichleo typhina* (Kasperbaver et al 1979, 1980) Y *Hyphomicroblum* (Horsch and King, 1983).

La contaminación puede ser controlada por antibióticos, pero desafortunadamente los tejidos de las plantas son sensibles a los antibióticos y responden variablemente de acuerdo a sus genotipos.

Los antibióticos más usados para controlar la contaminación *in vitro* son: *Penicillium*, De Ropp (1949) Streptomycin Zamski y Umiel (1978) Carew y Patterson (1970), Phillips et al (1981), Umiel y Golner(1976) Bacitracin Rier y Henderson (1956) Sparsomycin Owens (1976)

Los antibióticos pueden causar inestabilidad cromosómica así como tener algún beneficio para el explante o no tener efecto alguno.

Al realizar estudios de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* de *Piqueria trinervia* Cav se observó que no presentaba ninguna clase de contaminación por bacterias, lo que motivó a hacer el presente estudio sobre la acción bactericida de los componentes de esta planta. (Rubluo et al 1995).

### **Características generales de los microorganismos que se utilizaron para realizar las pruebas microbiológicas en este trabajo.**

Hacia fines del siglo XIX, Pasteur había eliminado con métodos experimentales el mito de la generación espontánea, y se conocía desde entonces que los microorganismos eran la causa de las enfermedades infecciosas. (Tabla 1).

Tabla 1 Características generales de los microorganismos que se utilizaron para las pruebas de susceptibilidad de los compuestos de la *Piqueria trinervia*

Microorganismos	Características generales	Metabolismo	Formas clínicas	Fuente de contaminación	Epidemiología	Tratamiento
<i>Candida albicans</i>	Célula globosa u ovoide de 3 a 7 micras		Mucocutánea, oral, genital, esofágicas, cutánea, visceral, pulmonar, tos, mocoide, dolor torácico, fiebre gastritis.	El hombre mismo	Padecimiento cosmopolita no importa edad ni sexo ataca por igual, siempre y cuando presente factores de oportunismo.	Sistémico anfotericina fluconazol ketoconazol Tópico nistatina ketoconazol miconazol sulconazol
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos gram positivo inmóviles de .7 a 1.2 micras racimos o cadenas cortas	Anaerobios facultativos	Vías respiratorias, sinusitis, faringitis, laringitis, bronquitis, absceso pulmonar, y pleural Digestivo intoxicación alimenticia, enteritis, peritonitis, absceso de hígado Urinario cistitis nefritis prostatitis.	Piel del hombre en varias especies de animales se le encuentran en la superficie de los objetos, en el aire suelo agua en la leche puede colonizar la mucosa de las fosas nasales y dar origen a un portador asintomático peligroso		Oxacilinas metilicina cefalosporinas rifampicina eritromicina fosfomicina clindamicina vancomicina

ESTABLECIMIENTO DE LA CALIDAD

Tabla 1 continua

<i>Escherichia coli</i>	bacilos gram negativos móviles de 2 a 3 micras	aerobias y anaerobias facultativas	fiebre no muy elevada dolor abdominal, diarrea secretora, deshidratación, desequilibrio hidroelectrolítico., puede ser el agente etiológico de enteritis y enterocolitis (diarreas del turista)	agua contaminada suelo, medio ambiente plantas e insectos	Cosmopolita Las cepas de diarrea enterotoxigena de cerditos pasan de un país a otro en poco tiempo y demuestran con qué facilidad cepas patógenas especiales pueden diseminarse por todo el mundo	Aminoglucósidos cloranfenicol tetraciclinas sulfametoxazol-trimetoprim
<i>Serratia marcescens</i>	bacilos gram negativos móviles	aerobios y anaerobios facultativos	Infecciones quirúrgicas, infecciones intrahospitalarias, otitis, sinusitis, meningitis, endocarditis, neumonía.	suelo, agua estancada animales y vegetales		Estreptomicina cloranfenicol tetraciclinas

BIBLIOTECA DEL INSTITUTO VETERINARIO Y ZOOLOGICO DE LA UNAM

Tabla 1 continua

<p><i>Salmonella typhi</i></p>	<p>bacilos gram negativos móviles de 2 a 4mm</p>	<p>aerobias y anaerobias facultativas</p>	<p>gastroenteritis, salmonelosis fiebre de 38 a 40° vómito, cólico abdominal, evacuaciones líquidas, moco con o sin sangre fetidez fecal, fiebre tifoides, sudoración profunda y calosfríos cefalea</p>	<p>La ingestión de aguas contaminada.</p>	<p>Se encuentra en todas las latitudes y en todos los países en desarrollo en donde se encuentra en forma endémica con brotes epidémicos. En México la tasa en 1960 era de 17.6 por cien mil habitantes y en 1980 bajó a 4.6 por cien mil habitantes con una epidemia registrada en 1972 La mayor insidencia se encuentra en la edad escolar, es poco frecuente antes de los 7 años de edad</p>	<p>cloranfenicol ampicilina trimetoprim-sulfametoxazol</p>
--------------------------------	--	---	---	---	---	--

Tabla 1 continua

<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>	<p>bacilos gram negativos de .6 por 2micras móviles</p>	<p>aerobios</p>	<p>complicación infecciosa de quemaduras procesos infecciosos en drogadictos infección intra hospitalaria infección de vías urinarias meningitis infecciones corneales neumonía</p>	<p>animales y el mismo hombre.</p>		<p>Carbencilina tobramicina ticarcilina piperacilina mezclocilina cefalosporinas de 3ª generación monobactam.</p>
<p><i>Streptococcus faecalis</i></p>	<p>cocos gram positivos inmóviles en cadenas colonias en forma de disco de .5 a 2mm</p>	<p>anaerobios facultativos</p>	<p>faringitis, fiebre estreptocócica, escarlatina, sinusitis, neumonía, meningitis, celulitis perianal vaginitis.</p>	<p>animales y comoda enlatada.</p>	<p>Durante años recientes el número de epidemias en hospitales se ha incrementado en E.U., especialmente en recién nacidos.</p>	<p>penicilina estreptomycin sulfonamidas</p>

## Bacterias de importancia fitopatológica

***Erwinia carotovora***. Bastones rectos, con dimensiones de 0.5 a 1.0x1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$ . Se desplazan por medio de varios o muchos flagelos peritricos. *Erwinia* son las únicas bacterias fitopatógenas que son anaerobias facultativas gram negativa. Produce la pudrición blanda bacteriana de las hortalizas ( y algunas plantas anuales de ornato). El microorganismo se encuentra distribuido en todo el mundo y produce pérdidas considerables de cosechas en el campo, su transporte y especialmente en el almacenamiento, dando como resultado pérdidas totales mayores de órganos vegetales que cualquier otra enfermedad ocasionada por bacterias. Casi todas las hortalizas carnosas están sujetas a pudriciones blandas bacterianas, de ahí que estas últimas puedan producir una considerable pudrición de ellas al cabo de unas horas, ya sea durante su almacenamiento o venta en el mercado. Dichas pudriciones producen pérdidas económicas considerables al disminuir la cantidad disponible para la venta, al disminuir la calidad y por lo tanto el valor en el mercado de los cosechas y al incrementar excesivamente los gastos de medidas preventivas para combatir las enfermedades y en la preparación de la producción parcialmente afectada para su uso.

Los síntomas producidos por las pudriciones blandas en frutos de hortaliza y en otros órganos carnosos ya sea en el campo o durante su almacenamiento, son muy similares a los hospederos. Al principio, en los tejidos de dicho órgano aparece una pequeña lesión aguanosa que se extiende con rapidez en lo que se refiere a diámetro y profundidad. La zona afectada se ablanda y suaviza.

***Pseudomonas fluorescens***. produce la enfermedad denominada "ojo rosada de la papa".

***Xanthomonas campestris***. Bastones rectos Gram negativas, con dimensiones de 0.5 a 1x1.5 a 4 $\mu\text{m}$ . Se desplazan por medio de un flagelo polar. Todas las especies son fitopatógenas y se encuentran sólo en asociación con plantas o con órganos de éstas. Causa la pudrición negra o nervadura negra de las crucíferas, es cosmopolita. Afecta a todos los miembros de la familia de la col y algunas veces causa pérdidas considerables en estos cultivos. La infección de las plántulas jóvenes produce achaparramiento, crecimiento desigual y caída de las hojas de la parte inferior de la plántula. La zona afectada se empardece y seca

***Corynebacterium spp*** . Bastones rectos o ligeramente curvos y con dimensiones de 0.5 a 9x 1.5 $\mu\text{m}$ . por lo general son bacterias inmóviles Gram positivas. Varias especies de *Corynebacterium* producen enfermedades en el hombre y los animales. Produce la marchitez bacteriana de la alfalfa y del frijol la pudrición anular de la papa y el cáncer y marchitez bacteriana del tomate.

***Pseudomonas spp***. Bastones rectos o curvos, con dimensiones de 0.5 a 1x1.5 a 3.0 $\mu\text{m}$ . Se desplazan por medio de uno a muchos flagelos polares. Muchas especies son habitantes comunes del suelo o de ambientes marinos y de agua dulce. La mayoría de las especies patógenas de este género infectan a las plantas y sólo algunas de ellas a los animales y al hombre

## **OBJETIVOS**

**El objetivo general de este trabajo fué:**

**\*Probar la acción antibacteriana del metabolito secundario piqueroi "A" y de las aguas madres de cristalización ("aceite") de la planta *Piqueria trinervia* Cav. contra bacterias de importancia para la salud pública, bacterias de importancia fitopatológica y bacterias contaminantes en cultivo de tejidos vegetales in vitro.**

**Objetivos particulares.**

**\*Aislar y caracterizar químicamente los compuestos que presenten actividad antibacteriana**

**\*Comparar los resultados de actividad antibacteriana de bacterias patógenas humanas con antibióticos comerciales.**

## **Materiales y Métodos**

### **Parte experimental**

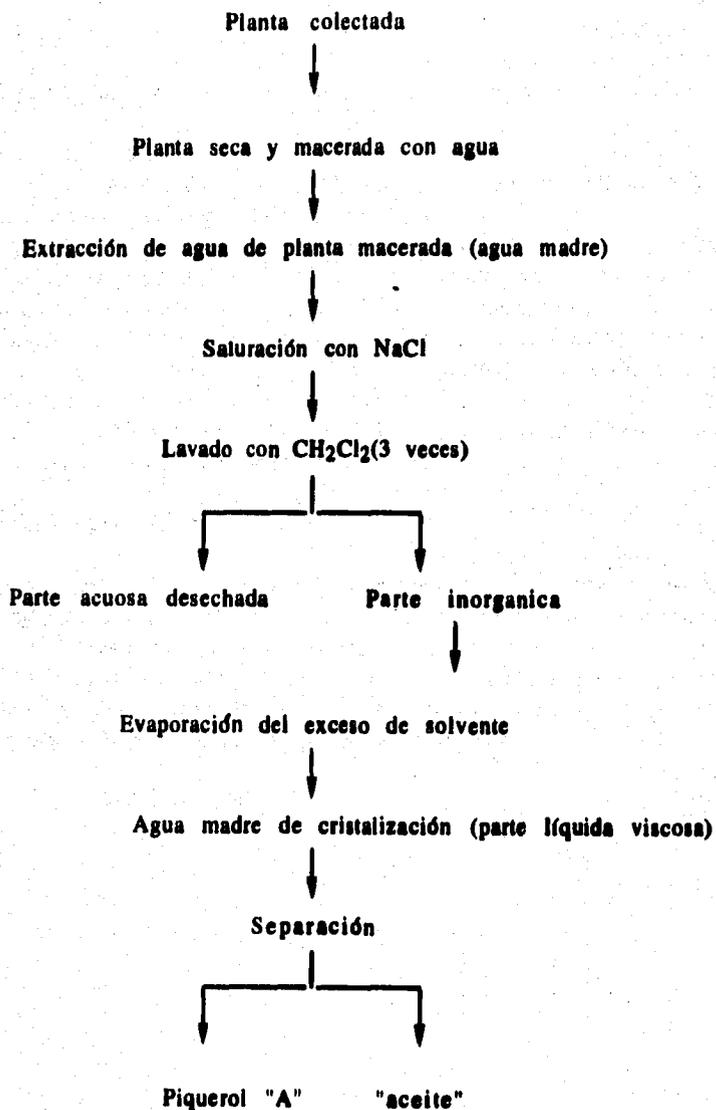
#### **Parte química**

#### **Extracción del principio activo piquerol "A" y "aceite"**

La planta *Piqueria trinervia* fué colectada en la carretera al Ajusco Km12.5, en el mes de noviembre a una altitud de 2400m de altitud.

En una columna de vidrio (Pyrex) de 1m de altura y 8 cm de diámetro se colocaron hojas flores tallos semillas de la planta trituradas, y se agregaron agua destilada, dejándose macerar a temperatura ambiente durante 48hrs, posteriormente el agua se saturó con cloruro de sodio, y con un embudo de separación(Pyrex) se hizo la extracción con cloruro de metileno. Se destiló a baño María en una vaporera (WM Boekel) hasta que quedaron unos mililitros en el matríz bola (Pyrex), al irse evaporando el cloruro de metileno cristalizó primero un compuesto llamado trinervinol, el cual se filtró para después obtener puro el piquerol "A". Las llamadas aguas madres de la cristalización (parte líquida viscosa) es donde el piquerol "A" va ha cristalizar y una vez que cristaliza dentro de las aguas madres se filtra quedando las aguas madres de cristalización que se le denominó 'aceite' y el piquerol "A" . (Diagrama de flujo 1)

**Diagrama de flujo 1. Obtención del piquerol "A" y del "Aceite"**



### **Transformaciones del piquerol "A"**

Las transformaciones del piquerol "A" se hicieron con el propósito de saber si al acetilarse o tratarse en un medio ácido tiene algún compuesto que sea parecido al de la mezcla del aceite, para así poder comparar y poder identificarlo con mayor facilidad.

#### **Acetilación**

Se pesaron 80 mg de piquerol "A", se disolvieron en 2ml de piridina y un mililitro de anhídrido acético y se dejó reposar 24hrs.

La mezcla obtenida se vertió en un matríz elermeyer de 120 ml de capacidad, se colocó en hielo, una vez deshecho el hielo se extrajo la solución con cloruro de metileno, 3 veces en un embudo de separación, se lavó con una solución de ácido clorhídrico al 10% 3 veces con 20 ml aproximadamente, y luego con agua destilada otras tres veces para neutralizar, se secó el cloruro de metileno con sulfato de sodio anhídrido para quitar el exceso de agua, se filtró y se evaporó a su mínimo volumen.

El aceite que quedó (de color amarillento) (Diagrama de flujo 2), no debe olerse ya que causa irritaciones a la garganta y las mucosas nasales.

#### **Tratamiento en medio ácido**

Se disolvieron 100 mg de piquerol A en agua destilada (5ml) y se calentaron a baño de vapor hasta su disolución total, se agregaron 4 gotas de ácido sulfúrico, se dejó toda la noche a temperatura ambiente, y se extrajo con acetato de etilo. El acetato de etilo se lavó con agua destilada hasta neutralidad (3 veces), se quitó el exceso de agua con sulfato de sodio anhídrido, al acetato de etilo se concentró a un mínimo volumen y, se obtuvo un aceite de olor característico. (Diagrama de flujo 3)

## Diagrama de flujo 2. Acetilación del Piquero "A"

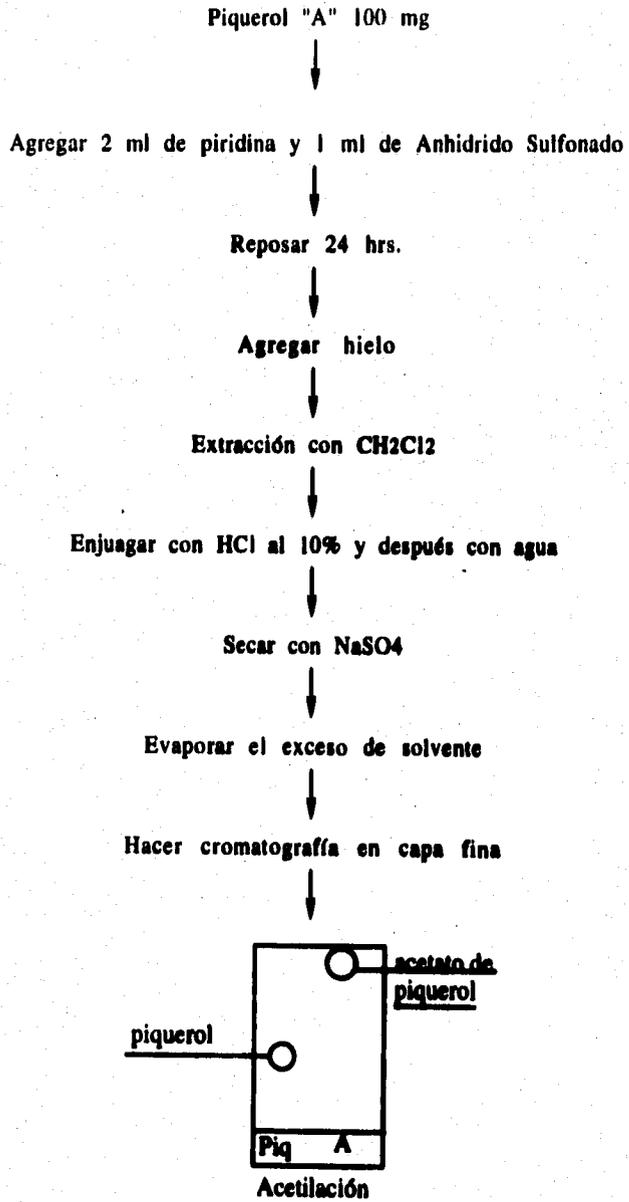
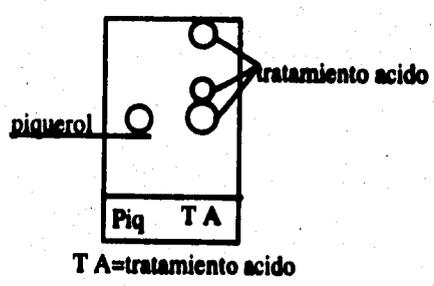
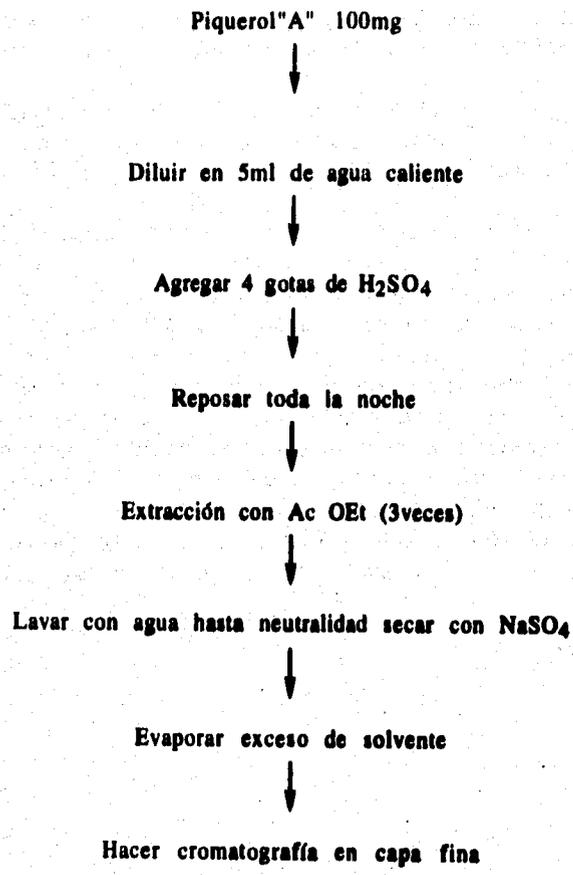


Diagrama 3. Obtención del tratamiento en medio ácido del piquerol "A"



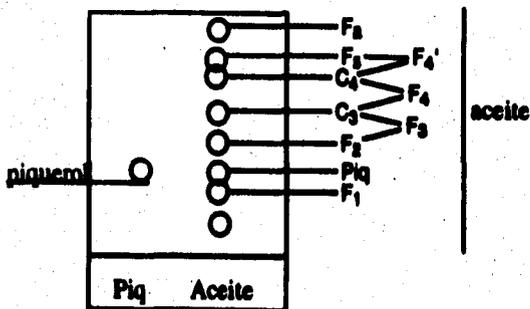
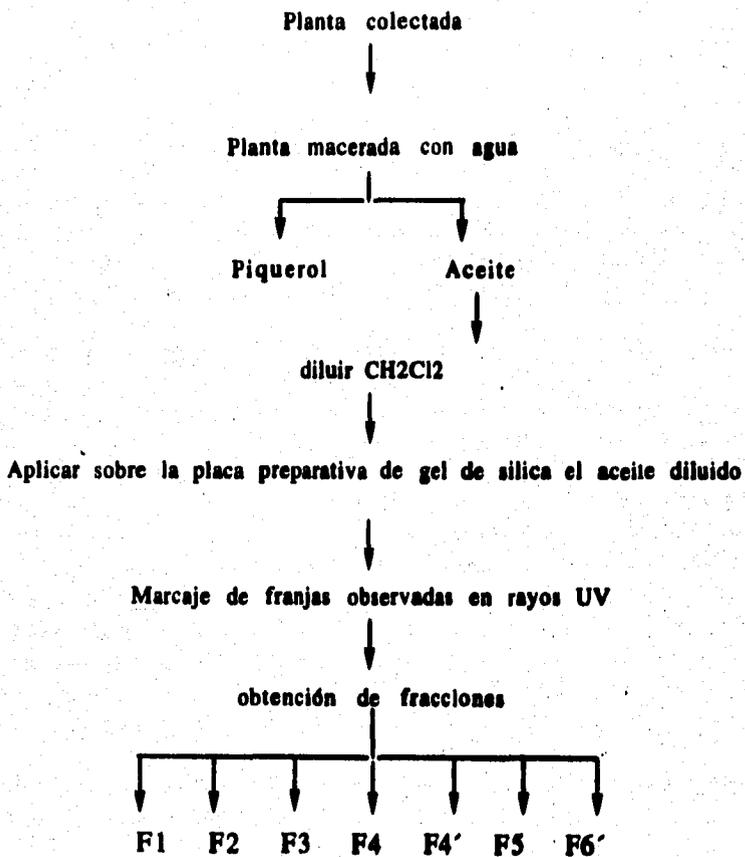
### **Fraccionamiento del aceite de *P. trinervia* Cav**

Se realizaron diseños experimentales para separar el aceite en sus diferentes compuestos se utilizó cromatografía en capa fina, mediante placas preparativas de gel de sílice de 10 X 20 cm.

Para realizar la elución del "aceite" de la planta *P. trinervia*. Primero en la placa preparativa se marcó una línea a 2cm del margen, sobre esa línea se aplicó el aceite homogéneamente con un capilar (del extracto del aceite se pesaron 200mg y se diluyeron en un mililitro de cloruro de metileno).

La placa preparativa se eluyó en una cámara cromatográfica con una solución de cloruro de metileno/acetato de etilo 7/3, 2 (veces) para tener mayor resolución, una vez eluída se dejó secar y se observó con una cámara de rayos ultravioleta la formación de franjas que florecen, las cuales se marcaron y posteriormente se cortaron. Para tener la seguridad de que se cortó la franja que se quería, se reveló una parte de la placa con sulfato cérico analítico y fué así como se pudo observar claramente las manchas. Una vez que se definieron las franjas en la placa de sílice se cortaron y se extrajeron con acetato de etilo, en un rotovapor (Büchi) se eliminó el exceso de disolvente, cada franja que se extrajo colocándose en un recipiente pequeño y limpio el cual se pesó previamente para saber cuanto se obtuvo de cada compuesto, por cromatografía en placa delgada (Alugram) se verificó si se separaron y purificaron los productos, cada una de estas fracciones fueron probadas con las bacterias. (Diagrama de flujo 4)

### Diagrama de flujo 4. Obtención de Fracciones



## Parte biológica

### Determinación del efecto de los compuestos obtenidos sobre los diferentes microorganismos en estudio

La prueba que se utilizó para la determinación de la sensibilidad microbiana a los compuestos obtenidos de la planta *Piqueria trinervia* fué la de difusión en discos. Una cantidad determinada de cada uno de los microorganismos de prueba ( $10^6$  microorganismos/ml) fué inoculado en cajas de petri con agar Iso-Sensites, previamente esterilizado a 15 lb de presión durante 15min. En este estudio se utilizaron discos de papel filtro (Schleichez) con capacidad de absorber 10ul. (Diagrama de flujo 5)

Los microorganismos utilizados para la prueba fueron: *Candida albicans* (Hospital general, aislada de pacientes), *Staphylococcus aureus* Gram(+) (ATCC-6538), *Escherichia coli* Gram(-) (O-126), *Serratia marcescens* Gram(-) (Hospital general, aislada de pacientes) *Salmonella typhi* Gram(-) (TY-2), *Pseudomonas aeruginosa* Gram(-) (101415), *Streptococcus faecalis* Gram(+) (TCC-8043), que fueron obtenidos del Cepario de la Facultad de Química. *Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia carotovora* y *Xantomonus campestris varcampestris* Gram(-), que fueron donadas por el Centro de Fitopatología del Colegio de Posgraduados de Chapingo. *Bacillus licheniformis* Gram(+) ATCC (14580) del Instituto de Ciencias del Mar *Staphylococcus spp.* Gram(+) aislada de la planta (*Dieffenbachia*) *Micrococcus spp.* Gram(+) de *Staphylococcus spp* de (*Anthurium*), *Pseudomonas spp* Gram(-) de (*Dieffenbachia*) *Corynebacterium spp* de (*Spathiphyllum*), fueron aisladas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de plantas ornamentales que presentaban problemas de contaminación in vitro. (Brunner et al 1995).

El efecto inhibitorio fué evaluado mediante la medición de la zona de inhibición. Las concentraciones utilizadas de cada compuesto se encuentran en las tablas 2 y 3.

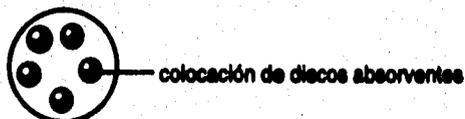
### Diagrama de flujo 5 Pruebas microbiológicas

Preparación de medio de cultivo para bacterias

Vaciado de medio a cajas petri

Vaciado de microorganismos en el medio

Colocación de discos absorbentes



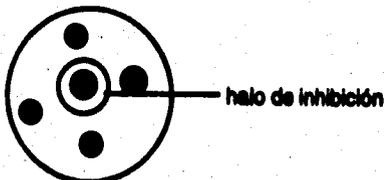
Colocación de muestras estudiadas

Aceite      Piquero! "A"      Tratamientos del piquero!      Fracciones



Incubación a 35<sup>0</sup> C por 18 hrs.

Medición de halos de inhibición en mm



Después de varias pruebas de los compuestos a diferentes concentraciones, se tomó la decisión de utilizar aquellas señaladas en la tabla 2, para el caso del Aceite, piquero y sus derivados (acetilación y tratamiento ácido) las concentraciones son constantes ya que el piquero y el aceite son productos que se obtienen en mayores cantidades los cuales pueden pesarse y preparar lo deseado.

En el caso de las fracciones del aceite las concentraciones varían en cada extracción debido a que no se obtiene la misma cantidad de todas.

**Tabla 2. Concentraciones en mg/ml de los compuestos probados contra los diferentes microorganismos.**

Compuestos	Piquero	Aceite	Diacetato	*Tratamiento ácido	**F <sub>7</sub>	**F <sub>8</sub>
<b>Bacterias</b>						
<i>Salmonella typhi</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Candida albicans</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Escherichia coli</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Serratia marcescens</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Erwinia carotovora</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Xantomonas campestris</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Bacillus licheniformis</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Staphylococcus spp</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Micrococcus spp</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Pseudomonas spp</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06
<i>Corynebacterium spp</i>	0.08	0.007	0.123	0.129	0.11	0.06

\*El tratamiento ácido está formado por dos fracciones \*\*F<sub>7</sub> y \*\*F<sub>8</sub> las cuales se probaron por separado.

Se tomaron 10µl de cada concentración en mg/ml para las pruebas biológicas por que los discos utilizados para las pruebas son de capacidad de 10µl.

**Tabla 3. Concentraciones en mg/ml de las fracciones probadas contra los diferentes microorganismos**

Fracciones	F1	F2	F3	F4	F4'	F5	F6
<b>Bacterias</b>							
<i>Salmonella typhi</i>	0.21	0.03	0.06	0.09	0.92	0.20	0.20
<i>Candida albicans</i>	0.21	0.03	0.06	0.09	0.92	0.20	0.20
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.21	0.03	0.06	0.09	0.92	0.20	0.20
<i>Escherichia coli</i>	0.21	0.03	0.06	0.09	0.92	0.20	0.20
<i>Serratia marcescens</i>	0.21	0.03	0.06	0.09	0.92	0.20	0.20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.21	0.03	0.06	0.09	0.92	0.20	0.20
<i>Streptococcus faecalis</i>	0.21	0.03	0.06	0.09	0.92	0.20	0.20
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.105	0.031	0.165	0.038	0.050	0.030	0.100
<i>Erwinia carotovora</i>	0.105	0.031	0.165	0.038	0.050	0.030	0.100
<i>Xanthomonas campestris</i>	0.105	0.031	0.165	0.038	0.050	0.030	0.100
<i>Bacillus licheniformis</i>	0.146	0.05	0.10	0.136	0.103	0.02	0.085
<i>Staphylococcus ssp</i>	0.146	0.05	0.10	0.136	0.103	0.02	0.085
<i>Micrococcus spp</i>	0.146	0.05	0.10	0.136	0.103	0.02	0.085
<i>Pseudomonas spp</i>	0.146	0.05	0.10	0.136	0.103	0.02	0.085
<i>Corynebacterium spp</i>	0.146	0.05	0.10	0.136	0.103	0.02	0.085

\*Se tomaron 10µl de cada concentración en mg/ml para las pruebas biológicas

## RESULTADOS y DISCUSIÓN

De la planta *Piqueria trinervia*, la cual se usa en varias partes de la República Mexicana con fines medicinales, se obtuvo el metabolito secundario llamado piquerol "A", y de las aguas madres de cristalización se obtuvo un líquido viscoso que se denominó "aceite" que es una mezcla compleja de componentes (Urzúa 1995). (Fig2).



A = Aceite de *P. trinervia*  
P = Piquerol

Fig 2. Cromatografía en capa fina del aceite y del piquerol "A".

Se probó el efecto antimicrobiano del "aceite", de los componentes de este, del piquerol "A" y del piquerol transformado sobre los microorganismos patógenos humanos y los fitopatógenos.

Se hicieron pruebas de sensibilidad de antibióticos comerciales sobre las bacterias que atacan al hombre, para tener un punto de comparación con los compuestos de *P. trinervia* (tabla 5). La sensibilidad que es la susceptibilidad de un microorganismo dada a un antibiótico constituye una técnica común e importante en la mayoría de los laboratorios. Los resultados de estas pruebas sirven para seleccionar los antibióticos idóneos para una terapia frente a los microorganismos (Koneman, 1991).

Con el objeto de determinar si había una pérdida de actividad, el aceite fue probado a intervalos de tiempo. Los resultados se muestran en la tabla 4, e indican que no hubo una pérdida significativa de actividad durante 6 meses.

El aceite presenta actividad inhibitoria sobre todos los microorganismos patógenos humanos (tabla 4) pero sus fracciones por separado pierden esta actividad en 5 de los microorganismos probados, persistiendo esta únicamente sobre 2 de los microorganismos (*S. aureus* y *S. typhi*) (tabla 6).

Pruebas realizadas con aceites de diferentes plantas no encuentran actividad para *S. aureus* y *E. coli*, no siendo así para *P. aeruginosa* la cual muestra inhibiciones similares a las de *P. trinervia*. (López 1992, Hammerschmidt 1993).

Haciendo una comparación con antibióticos, el aceite tuvo inhibición contra *C. albicans* mientras que los antibióticos probados no tuvieron efecto alguno (tabla 5) Urzúa 1995, Darah 1995, Paz 1995, Marcal 1992, no encuentra actividad sobre *C. albicans* (Dimayuga 1991, encuentra actividad en 13 extractos de plantas de 72 de 35 diferentes

familias. (López 1992, Abd El Nabi 1992) obtienen actividades de 60 y 20mm respectivamente para *C. albicans*.

El aceite presentó actividad en todas las bacterias que se aislaron de plantas *in vitro* y en 2 de las 3 bacterias fitopatógenas *Pseudomonas fluorescens* (Fig3) y *Xantomonas campestris*, la actividad que se presentó es mucho mayor para las bacterias que se aislaron *in vitro* que va de 17mm para *Pseudomonas* spp hasta 45mm para *Micrococcus* spp y *Staphylococcus* spp (Tabla 10 y 11), los antibióticos probados en el trabajo de Brunner 1995 muestran inhibiciones que van de 11 hasta 19 mm para las bacterias que se aislaron *in vitro*.

**Tabla 4 Actividad antibacteriana del aceite de *Piqueria trinervia***

Extractos	a1	a2	a3	a4	a5	Piquerol	CH3 CH2OH
<b>Microorganismos</b>	<b>Zona de inhibición en mm</b>						
<i>Candida albicans</i>	18	15	17	15	13	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	15	18	10	13	0	0
<i>Escherichia coli</i>	12	12	11	15	12	16	0
<i>Serratia marcescens</i>	10	10	9	15	12	13	0
<i>Salmonella typhi</i>	9	14	11	11	10	16	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	13	11	11	7	15	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	14	8	15	10	14	0	0

\*Concentración expresada en mg/ml o Zona de inhibición medida de 18-24 Hrs

a = aceite probadas en diferentes fechas aplicando 10 ul concentrado.

a1 = 1 Feb 94, a2 = 7 Abril 94, a3 = 14 Abril 94, a4 = 18 Mayo 94, a5 = Julio 94

CH3CH2OH = solvente con el que se disolvió el piquerol.

**Tabla 5 Resultados del antibiograma con bacterias patógenas humanas**

Antibióticos	Eri	Linc	K	E	NA	C
<b>Microorganismos</b>	<b>Zona de inhibición en mm</b>					
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	28	25	22	27	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	19	0	25	20
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	30	0	0	0
<i>Salmonella typhi</i>	0	0	29	0	0	22
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	27	26	0	27	0	0

Zona de inhibición en mm \*Concentración de los antibióticos Eri=ERITROMICINA \*15mg, Linc=LINCOMICINA

\*2mg, K=KANAMICINA \*30mg, E=ESTREPTOMICINA

\*15mg, NA=AC.NALIDIXICO \*30mg, C=CLORANFENICOL \*30mg.

En esta tabla se resaltaron los valores mas altos de halos de inhibición de los antibióticos usados, que se compararon con los valores de los compuestos de la planta *P. trinervia*

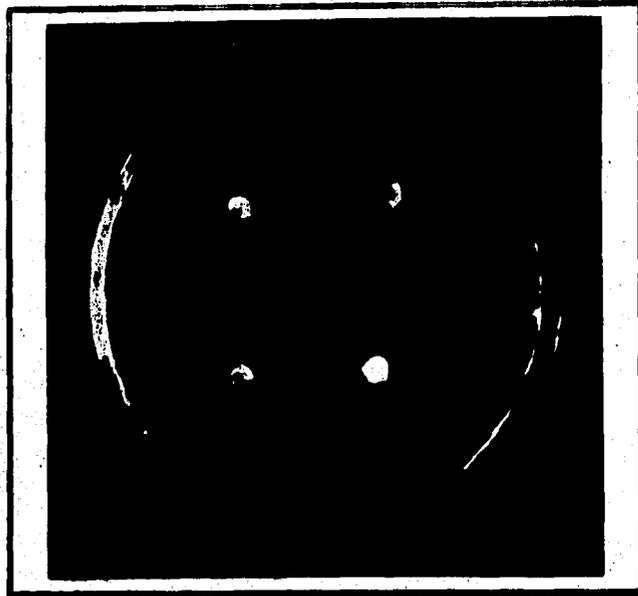


Fig 3 Placa de susceptibilidad en la cual se observa los halos de inhibición que tiene el 'aceite' sobre *Pseudomonas fluorescens*

Para realizar la separación de los componentes químicos del aceite se uso la cromatografía en capa fina preparativa se obtuvieron

7 fracciones F1, F2, F3, F4, F4', F5 y F6. De las cuales las fracciones F1, F2, F5, y F6 están formadas por un solo compuesto, mientras que F3, F4, F4' contienen 2 compuestos cada una con Rf's muy similares que no permitieron su separación. (Fig 4)

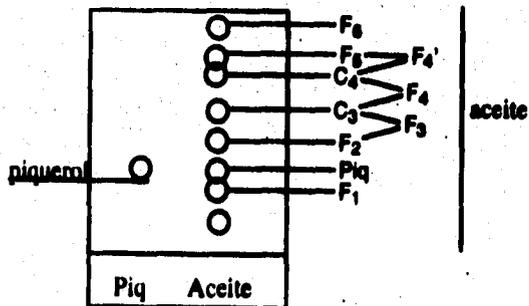


Fig 4. Fracciones en las que se dividió el aceite tomando como referencia el piquero "A"

La fracción F1 resultó ser muy activa sobre *S. typhi*, (Fig6). Se han realizado pruebas con extractos de diferentes plantas sobre bacterias de *Salmonella typhi* siendo su mayor inhibición de 12mm. (Shni et al 1995). El fracaso de las terapias contra *S. typhi* se debe a que cada vez se incrementa el número de bacterias resistentes a los antibióticos por lo que una alternativa es localizar nuevos antibióticos con productos naturales (Anderson and Smith 1972, Goldsrein et al 1986, Eykyn and Williams 1987) La fracción F1 se encuentra en estudio ya que su estructura química todavía no ha sido plenamente identificada. Esta fracción puede ser comparable con alguno de los antibióticos que se utilizan para combatir esta enfermedad como kanamicina y cloranfenicol los cuales tienen un halo de inhibición semejante al de la fracción F1. Tomando en cuenta que de estos antibióticos se utilizan cantidades mucho más pequeñas (ver tabla5) que las utilizadas con los compuestos de *P trinervia*.

Así mismo hasta el momento no ha sido posible asignarle a todos los compuestos su fórmula estructural, por lo que se sigue trabajando con ellos (Fig 10).

En la tabla 6 todas las fracciones obtenidas del "aceite" presentan actividad sobre *S. aureus* (Fig5). Se han encontrado muchas plantas con actividad antibacteriana sobre *S. aureus* teniendo actividades que van de 8 a 14mm de 113 extractos de plantas (Grosvenor 1995, Alonso 1995, Rojas 1992), En otras pruebas con la planta *A. nilotica nilotica* presentó una actividad de 25 mm de diámetro sobre *S aureus*, (Osman 1992). De la misma tabla 6 las fracciones (F1 y F6) tienen actividad sobre *S. typhi* (Fig6) y la fracción F6 sobre *Candida albicans*. Comparando los resultados de los antibióticos probados con las fracciones que inhiben a *S aureus*, se puede decir que son comparables para 3 fracciones F3, F4, F4'. Para la fracción F1 que inhibe a *S. thipy* los antibióticos probados son comparables con esta fracción, quedando comprobado que la gente que utiliza esta planta en los diferentes estados de la República Mexicana la usa correctamente para combatir el reumatismo, la tifo que son causadas por *S. aureus* y *S thiphy*. (Gonzalez, 1890).

De una gran variedad de bacterias las mas usadas para trabajos de pruebas de susceptibilidad por su importancia médica ya que son los microorganismos que se encuentran con más frecuencia en el humano provocando diferentes enfermedades y los cuales se vuelven cada vez más resistentes a los antibióticos sintéticos son *S. aureus*, *E. coli* *P. aeruginosa* *C. albicans*, *S. faecalis*, *S. typhi*. (Deeni et al 1991, Dimayuga 1991, Caceres, 1991, Pomilio et al 1992, Rojas et al 1992, Grosvenor et al 1995, Urzúa et al 1995, Youvraj et al 1995, Paz et al 1995). Nuestros resultados muestran (tabla6) la potenciabilidad de los derivados de la *P. trinervia* sobre 3 de estas bacterias (*S. aureus*, *C. albicans*, *S. typhi*).

Tabla 6 Actividad antibacteriana de las fracciones del aceite de *Piqueria trinervia*

Fracciones	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>4'</sub>	F <sub>5</sub>	F <sub>6</sub>	C CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Microorganismos	Zona de inhibición en mm							
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0	20	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	10	18	17	20	18	11	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Serratia marcescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Salmonella typhi</i>	26	0	0	0	0	0	12	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

Zona de inhibición medida de 18-24 Hrs.

F= Fracciones ,F<sub>1</sub> =1, F<sub>2</sub> =2, F<sub>3</sub> = formada por 2y3, F<sub>4</sub> formada por 3y4, F<sub>4'</sub> = formada por 4 y5, F<sub>5</sub> =5, F<sub>6</sub> =6.  
C=blanco

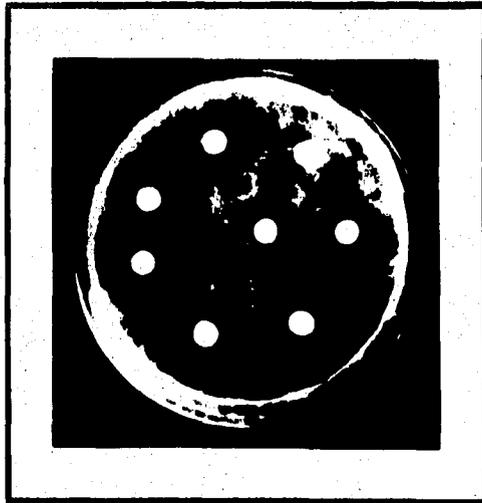


Fig 5. Placa de susceptibilidad donde se observan los halos de inhibición de las fracciones del "aceite" sobre *S. aureus*, donde el disco que no presentó inhibición fue el testigo.

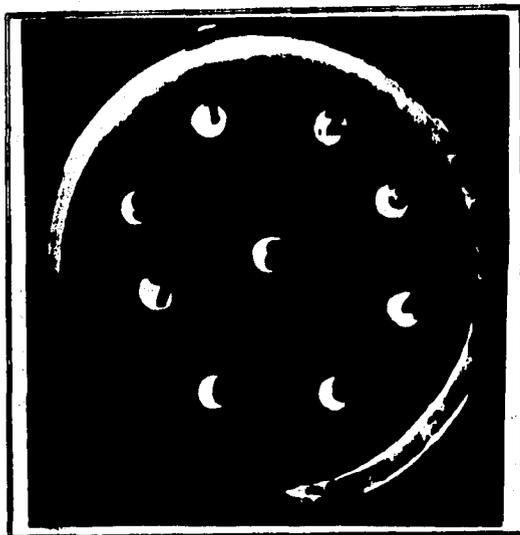


Fig 6 Placa de susceptibilidad donde se observa una clara inhibición de la fracción F1 sobre *Salmonella typhi*, la cual representa el disco No 8

En la tabla 7 se puede observar que las fracciones del aceite F1, F3, F4, F4' y F6 tienen efecto inhibitorio únicamente sobre *Ps. fluorescens*, siendo más efectiva la fracción F1, formada por un solo compuesto (Brunner 1995), hace pruebas con antibióticos sobre *Pseudomonas* obteniendo una inhibición de tetracilina de 19mm menor que la que se muestra con la fracción F1. Debido a que las fracciones F4 (4+3) y F4' (4+5) inhiben a *Ps. fluorescens*, mientras que las fracciones F3(3) y F5(5) no tienen este efecto, se puede concluir que el compuesto 4 es el principio activo.

Tabla 7 Actividad antimicrobiana de las fracciones del 'aceite' de *P. triseriata* contra bacterias flageladas

Fracciones	F1	F2	F3	F4	F4'	F5	F6	Control CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Microorganismos	Zona de inhibición en mm							
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	24	0	0	11	11	0	12	0
<i>Erwinia carotovora</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthomonas campestris</i> var <i>campestris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

Zonas de inhibición medidas de 18-24 hrs. Concentración expresada en mg/ml  
F=fracciones

En la tabla 8 se puede observar que todas las fracciones del "aceite" muestran efecto inhibitorio sobre *Bacillus licheniformis* siendo el mayor efecto el de la fracción F4. Las fracciones F1, F4 y F4' inhiben a *Staphylococcus* spp teniendo una mayor actividad la F6 la cual es comparable con las actividades que muestran los antibióticos probados por (Brunner et al 1995). Las fracciones F1, F2, F4, F4' y F5 inhiben a *Micrococcus* spp

siendo la mayor inhibición de la F4 que es mayor que las inhibiciones de los antibióticos Tetracilina, Ampicilina Cefalotoxina, Cloranfenicol, Gentamicina, Ácido nalidixico y Kanamicina (Brunner1995). Las fracciones F1 y F4 son activas sobre *Pseudomonas*, y la F4 sobre *Corynebacterium* spp. Los resultados obtenidos para *B. licheniformis*, muestran que el compuesto 4 presente tanto en la fracción F4 como en la F4', aumenta la actividad de las fracciones F3 (compuesto 3), y de la F5 (compuesto5). La actividad de las fracciones F4 y F4' sobre *Staphylococcus* spp es muy similar, concluyendo de estos resultados, que el efecto inhibitorio se debe al compuesto 4, presente en ambas fracciones, ya que si consideramos que F4 está formado por los compuestos 3 y 4 y la fracción 3 por el compuesto 2 y 3 el cual, no tiene efecto sobre *Staphylococcus* spp. obviamente éste se deba al compuesto 4.

De la misma manera se puede interpretar el efecto de la fracción F4' formada por los compuestos 4 y 5 y la F5 formada por el compuesto #5, esta última no presenta efecto inhibitorio por lo que se concluye que el efecto se encuentra en el compuesto 4.

**Tabla 8** Actividad antimicrobiana de las fracciones del aceite de *P. triseriata* contra bacterias aisladas de plantas ornamentales.

Fracciones	F1	F2	F3	F4	F4'	F5	F6	Control CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Microorganismos	Zona de inhibición en mm							
<i>Bacillus licheniformis</i>	8	8	8	17	12	9	11	0
<i>Staphylococcus</i> spp.	12	0	0	17	16	0	20	0
<i>Micrococcus</i> sp.p	15	13	0	25	15	17	20	0
<i>Pseudomonas</i> s.pp	9	0	0	10	0	0	8	0
<i>Corynebacterium</i> spp.	0	0	0	9	0	0	9	0

Zona de inhibición medidas de 24-48hrs. F=fracciones

De las pruebas de actividad antimicrobiana del piquero "A" se obtuvieron los siguientes resultados: de las 7 especies de bacterias patógenas estudiadas se presentó actividad solamente sobre *E. coli*, *S.marcescens*, *S typhi* y *P.aeruginosa*. siendo los resultados muy similares en los cuatro casos (tabla 3) González de la Parra(1984) realizó pruebas con el piquero A sobre *E.coli*, *S.aureus* *C.albicans* en la cual no encontró actividad debido probablemente las a que concentraciones que utilizó no eran las correctas.

De las bacterias fitopatógenas solamente *P.fluorescens* fué inhibida por el piquero "A" y puede ser comparado con el cloramfenicol que tiene una actividad de 15 a 16mm (Brunner1995), mientras que no se presentó actividad sobre las bacterias aisladas de plantas.(tabla 10 y 11)

El piquero "A" es activo sobre bacterias gram(-) y no presenta efecto sobre bacterias gram(+) y eucariontes (*Candida albicans*).

Del tratamiento del piquero "A" en medio ácido se obtuvo una mezcla de tres compuestos. De esta mezcla se hizo una separación por cromatografía en capa fina preparativa, quedando dos fracciones F7 y F8 siendo la fracción F7 con un Rf=0.86 formado por un solo compuesto y la F8 formada por 2 compuestos con un Rf=0.56 y Rf=0.43. (Fig 7 y 8).

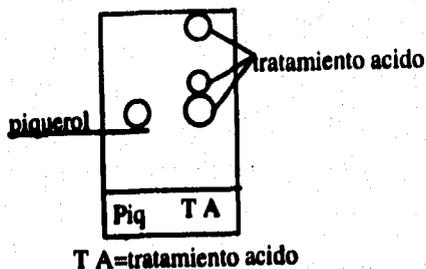


Fig 7 Tratamiento ácido dividido en 2 fracciones F6 y F7



Fig 8 Cromatografía en capa fina de los tratamientos del piquerol "A"  
 1.-P=Piquerol 2.-Ac2O=Aetilación 3.- tratamiento ácido

El diacetato de piquerol fué efectivo sobre los microorganismos patógenos con excepción de *S. faecalis*, siendo mayor la inhibición para *P.aeruginosa* (Tabla 9) no siendo comparables con los antibióticos probados (tabla 5) sobre las bacterias aisladas de plantas y las fitopatógenas no tuvo actividad (tabla 10 y 11)

El conjunto de las fracciones F7 y F8 = tratamiento ácido tuvieron actividad sobre todas las bacterias patógenas excepto para *S. faecalis*, siendo mayor esta sobre *E.coli*. Las fracciones del tratamiento ácido por separado F7 tuvo actividad sobre *C. albicans*, *S.aureus* y *S. typhi*, mientras que la fracción F8 únicamente inhibió a *E.coli* y *S. typhi* (tabla 9) siendo comparable con la kanamicina que fué el antibiótico con menor inhibición.(tabla5)

Tabla 9 Actividad antibacteriana del Piquerol transformado

Tratamientos del piquerol	Diacetato de piquero	Tratamiento ácido total	F7	F8	C <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
<b>Microorganismos</b>	<b>Zona de inhibición en mm</b>				
<i>Candida albicans</i>	9	10	15	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	9	10	13	0	0
<i>Escherichia coli</i>	8	15	0	10	0
<i>Serratia Marcescens</i>	8	10	0	0	0
<i>Salmonella typhi</i>	9	11	16	15	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	10	0	0	0
<i>Streptococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0

Zona de inhibición medida de 18-24Hrs. F<sub>6</sub>=Rf=0.86 F<sub>7</sub>=Rf= 0.56, Rf=0.43 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>= blanco

Considerando que la fracción F<sub>8</sub> no presentó actividad sobre *C. albicans*, *S. aureus* y *S. marcescens* se podría concluir que el principio activo que inhibe a estos microorganismos está en la fracción F<sub>7</sub>, mientras que el principio activo que inhibe a *E. coli* está en la fracción F<sub>8</sub>, ya que la fracción F<sub>7</sub> no muestra dicha actividad.

Los resultados muestran que las fracciones F<sub>7</sub> y F<sub>8</sub> por separado, no tienen actividad sobre *P. aeruginosa*, pero la mezcla de ellos si, lo que podría sugerir un efecto sinérgico entre los 3 compuestos, que forman estas fracciones.

Respecto a las bacterias fitopatógenas, los resultados muestran que las fracciones F<sub>7</sub>+F<sub>8</sub>= tratamiento ácido del piquerol son efectivas sobre *Xanthomonas campestris* var. *campestris* únicamente. Y las fracciones por separado fracción F<sub>7</sub> es efectiva sobre *Pseudomonas fluorescens* y la F<sub>8</sub> sobre *Pseudomonas* y *Xanthomonas campestris* var *campestris*. El efecto inhibitorio sobre *X. campestris* var *campestris* se debe a la fracción F<sub>8</sub>, ya que F<sub>7</sub> no presenta tal efecto. Debido a que F<sub>7</sub> y F<sub>8</sub> cada una por separado presenta actividad sobre *Pseudomonas fluorescens* y la mezcla de ellos no, se podría pensar en un efecto antagónico entre ellos (tabla 10).

Tabla 10 Actividad antibacteriana del "aceite", del piquerol "A" y del piquerol transformado contra de bacterias fitopatógenas

Extractos	Aceite	Piquerol	Tratamiento Ácido total	F7	F8	Diacetato de piquerol	Control CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> O H	Control CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
<b>Microorganismos</b>	<b>Zona de inhibición en mm</b>							
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	27	15	0	12	15	0	0	0
<i>Erwinia carotovora</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthomonas campestris</i> var <i>campestris</i>	16	0	11	0	10	0	0	0

Zona de inhibición medida de 18-24hrs. Concentración expresada en mg/ml  
F<sub>7</sub> y F<sub>8</sub>=fracciones del tratamiento ácido

La mezcla de las fracciones F<sub>7</sub> y F<sub>8</sub>=tratamiento ácido presentan efecto sobre todas las bacterias aisladas de plantas, con excepción de *Micrococcus*. spp.

Debido a que la fracción F<sub>8</sub> no tiene actividad sobre ninguna de estas bacterias, se puede concluir que el efecto antibacteriano se encuentra en la fracción F<sub>7</sub> (tabla 11).

**Tabla 11 Actividad antibacteriana de los extractos de *Piqueria trinervia* contra bacterias in vitro.**

Extractos	Aceite	PiqueroI	Diacetato de piqueroI	Tratamiento ácido total	*F7	*F8	Control CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
Microorganismos	Zona de inhibición en mm						
<i>Bacillus licheniformis</i>	31	0	0	15	11	0	0
<i>Staphylococcus spp</i>	45	0	0	13	21	0	0
<i>Micrococcus spp</i>	45	0	0	0	20	0	0
<i>Pseudomonas s.pp</i>	17	0	0	15	8	0	0
<i>Corynebacterium spp.</i>	25	0	0	12	10	0	0

Zona de inhibición medidas de 24 -48hrs. \*F7 y \*F8 = fracciones del tratamiento ácido

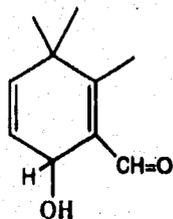
## Identificación química de los productos activos

El espectro de RMN del piquero "A" (Fig 11) muestra las siguientes señales, una señal múltiple, centrada en 5.97 (2H, protones vinflicos), 2 señales múltiples en 5.10 y 5.38 (2H, cada una, dos metilenos terminales) una señal simple, ancha 4.62 y otra triple en 4.39 (2 grupos -CH-OH-) una señal doble en 3 (1H, protón alílico), una señal simple, ligeramente ensanchada en 1.79 (3H, metilo vinflico) que resultan idénticos a las de una muestra original. Estructura. (Ib) (Fig 1)

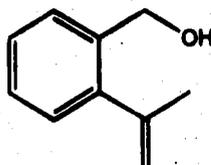
El espectro de RMN de la fracción F6 (Fig 12) la cual es un aceite de color amarillo, obtenido por cromatografía preparativa en capa fina mostró en 7.27 una señal múltiple debido a protones aromáticos. En 5.21 (1H) y 4.98 (1H) dos señales múltiples con acoplamiento, debido al metileno del isopropenilo. A 4.68 una señal simple (2H) que se asignó a un metileno del tipo (Ar-CH<sub>2</sub>-OH) y a 2.03 (3H) una señal simple que corresponde al metilo vinflico y por sus datos se le asignó la estructura X (Fig 9). Las mismas características presentó la fracción que se denominó F6 del tratamiento ácido del piquero A. Como anteriormente Chavarín Rivera llegó a este producto pudimos confirmar la estructura para la llamada fracción F6 y F7.

Otra de las fracciones del aceite a la que se le determinaron sus datos espectroscópicos fué la fracción 4, un aceite de olor característico y color ligeramente amarillo, formada por 2 compuestos básicamente, compuesto C3 VIIIb y compuesto C4 XI y cuyos espectros de RMN (Fig 13 y 14 respectivamente) presenta las siguientes señales a 10.57 (s, 1H), 6 (d, 1H), 5.7 (m, 1H), 3.87 (m, 1H), 2.3 (m, 3H), 2.2 (m, 3H), 10.25 (s, 1H), 6.25 (dd, 1H), 4.42 (d, 1H), 1.24 (m, 3H), 1.30 (m, 2H).

Después se separaron los dos compuestos lo cual nos permitió proponer las estructuras VIIIb (fig 1) y XI (fig 9) para los compuestos de la fracción 4, haciendo un análisis de los datos obtenidos y comparándolos con los datos de HRMN descritos para estos compuestos se pudo confirmar que la fracción 4 que estaba formada por los compuestos VIIIb (fig 1) y XI. (fig 9)



XI



X

Figura 9

## CONCLUSIONES

De la extracción acuosa de la planta *Piqueria trinervia* se obtuvo el metabolito secundario piquerol "A" y de las aguas madres de cristalización un "aceite", a los cuales se les probó su acción antimicrobiana.

De la separación del "aceite" por cromatografía se obtuvieron 7 fracciones F1, F2, F3, F4, F4', F5, F6. De la acetilación del piquerol "A" se obtuvo el diacetato de piquerol y del tratamiento en medio ácido del piquerol "A" se obtuvo una mezcla dividiéndose en F7 y F8.

El aceite presentó actividad sobre todas las bacterias en estudio patógenas fitopatógenas y las aisladas de plantas *in vitro*.

El aceite no perdió su actividad por lo menos en 6 meses sobre los microorganismos estudiados.

El aceite presentó actividad sobre todos los microorganismos, inhibe tanto a gram(+), como a gram(-), y es activo sobre eucariontes y procariontes.

El aceite tiene actividad sobre *C. albicans* en contraste con muchos antibióticos y extractos de otras plantas que se han probado contra este microorganismo los que no presentan actividad.

El aceite mostró actividad sobre *Ps. fluorescens* y *Xanthomonas campestris*. Sin embargo cuando éste fue fragmentado pierde su actividad para *Xanthomonas campestris* y la mantiene para *Ps. fluorescens*.

La fracción F1 es activa sobre *S. typhi* y comparable con los antibióticos kanamicina y cloranfenicol. También fue activa contra

*S. aureus*, presentó una fuerte inhibición contra *P. fluorescens* y sobre todas las bacterias que se aislaron de plantas *in vitro* con excepción de *Corynebacterium* spp.

La fracción F2 no muestra una actividad significativa

La fracción F3 muestra actividad sobre *S. aureus* no siendo comparable con el antibiótico más fuerte que es la eritromicina pero sí con la kanamicina que tienen halos de inhibición semejantes

La fracción F4 inhibió a todas las bacterias aisladas de plantas además *Ps. fluorescens* y a *S. aureus*.

La fracción F4' inhibe 3 de las bacterias *in vitro* con excepción de *Pseudomonas* spp. y *Corynebacterium* spp también inhibe a *S. aureus* y *S. fluorescens*

La fracción F5 inhibe a *S. aureus*, *B. licheniformis* y *Micrococcus* spp

La fracción F6 inhibe a todas las bacterias que se aislaron de plantas *in vitro*. A una de las fitopatógenas *S. fluorescens* y 3 de las patógenas para el humano *C. albicans*, *S. aureus* y *S. typhi*

El piquerol "A" es activo sobre bacterias gram(-) y no presentó actividad para bacterias gram(+) y eucariontes (*C. albicans*).

El piquerol "A" mostró actividad sobre *Ps. fluorescens*, *E. coli*, *S. marcescens*, *S. typhi* y *Ps. aeruginosa* no teniendo actividad para bacterias *in vitro*

El tratamiento ácido del piquerol A (F7 + F8) presentó actividad sobre todos los microorganismos aislados de plantas excepto para *Micrococcus*, sobre todas las patógenas con excepción de *S. faecalis*, para las fitopatógenas solo tiene inhibición sobre *X. campestris*.

De las 2 fracciones obtenidas del tratamiento ácido del piquerol A (F7 y F8), la fracción F7 persistió su actividad para *C. albicans*, *S. aureus*, *S. typhi*, *Ps. fluorescens* y

para las bacterias aisladas de plantas *in vitro* presentó actividad sobre todas las bacterias. La fracción F<sub>8</sub> persistió su actividad para *E. coli* y *S. Typhi*, *X. campestris*, *P. fluorescens*.

El diacetato de piquerol "A" presentó actividad sobre todas las bacterias patógenas excepto para *S. faecalis*.

Los estudios realizados por espectroscopia de RMN y EM comprobaron que las fracciones F<sub>7</sub> del tratamiento ácido del piquerol "A" y la fracción F<sub>6</sub> del "aceite" son idénticos además de tener la misma actividad inhibitoria.

Los compuestos que mostraron actividad sobre una gran variedad de microorganismos fueron los de las fracciones F<sub>1</sub>, F<sub>6</sub> y F<sub>4</sub>.

Se logró identificar químicamente los compuestos activos de la fracción F<sub>6</sub> X, F<sub>4</sub> que son los compuestos C3 VIIIa (Fig 1) y C4 XI. (Fig 2)

Los mejores resultados de los compuestos de la *Piqueria trinervia* contra los antibióticos se muestran en la (tabla 12).

Se puede observar que los antibióticos utilizados en este trabajo sobre *C. albicans* no mostraron actividad, mientras que la fracción F<sub>6</sub> si tiene actividad. Los antibióticos que se usan comercialmente sobre este microorganismo presentan halos de inhibición menores ó iguales a los de la fracción F<sub>6</sub> (Sulfametoxazol-trimetoprim con inhibiciones de 10 a 16 mm y Tetraciclina de 14 a 19 mm)

La fracción F<sub>1</sub> es comparable con alguno de los antibióticos (Kanamicina y cloranfenicol) que se utilizan para combatir la enfermedad producida por esta bacteria *S. thipi* ya que presenta halos de inhibición semejantes que los antibióticos.

El aceite como tal, sus fracciones en el cual se divide el aceite, pueden ser una alternativa natural para el control de contaminaciones bacterianas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* y para bacterias fitopatógenas ya que el aceite presenta halos de inhibición mayores que los antibióticos reportados en el trabajo de (Brunner 1995) los cuales se probaron sobre las bacterias que aísló de plantas cultivadas *in vitro*.

**Tabla 12 Comparación de los mejores valores de inhibición ( ) observados en los compuestos de la *Piqueria trinervis* contra los antibióticos probados en este trabajo.**

Extractos	Aceite	Fracciones	PiqueroI	Antibióticos
<b>Microorganismos</b>	<b>Zona de inhibición en mm</b>			
<i>C. albicans</i>	18	F6' (20)	0	0
<i>S. aureus</i>	19	F4' (20)	0	Eri (28)
<i>E. coli</i>	15	0	16	NA (25)
<i>S. murcensis</i>	15	0	13	K (30)
<i>S. Typhi</i>	14	F1 (26)	16	K (29)
<i>S. faecalis</i>	15	0	0	Eri (27)
<i>P. aeruginosa</i>	13	0	15	0
<i>P. fluorescens</i>	27	F1(24)	15	0
<i>E. carotovora</i>	0	0	0	C(18)
<i>X. campestris</i>	16	0	0	0
<i>B. lincheniformis</i>	31	F4 (17)	0	0
<i>Staphylococcus</i>	45	F6' (20)	0	Ce (23)
<i>Micrococcus</i>	45	F4 (25)	0	Ce (23)
<i>Pseudomonas</i>	17	F4 (10)	0	C(18)
<i>Corynebacterium</i>	25	F4, F6' (9)	0	A (14)

Zona de inhibición en mm    Concentración en mg/ml  
 Eri=eritromicina, NA=acido nalidixico, K=kanamicina, C=cloranfenicol  
 Ce=cefotaxima, A=ampicilina

**ESTA TESIS NO DEBE  
 SALIR DE LA BIBLIOTECA**

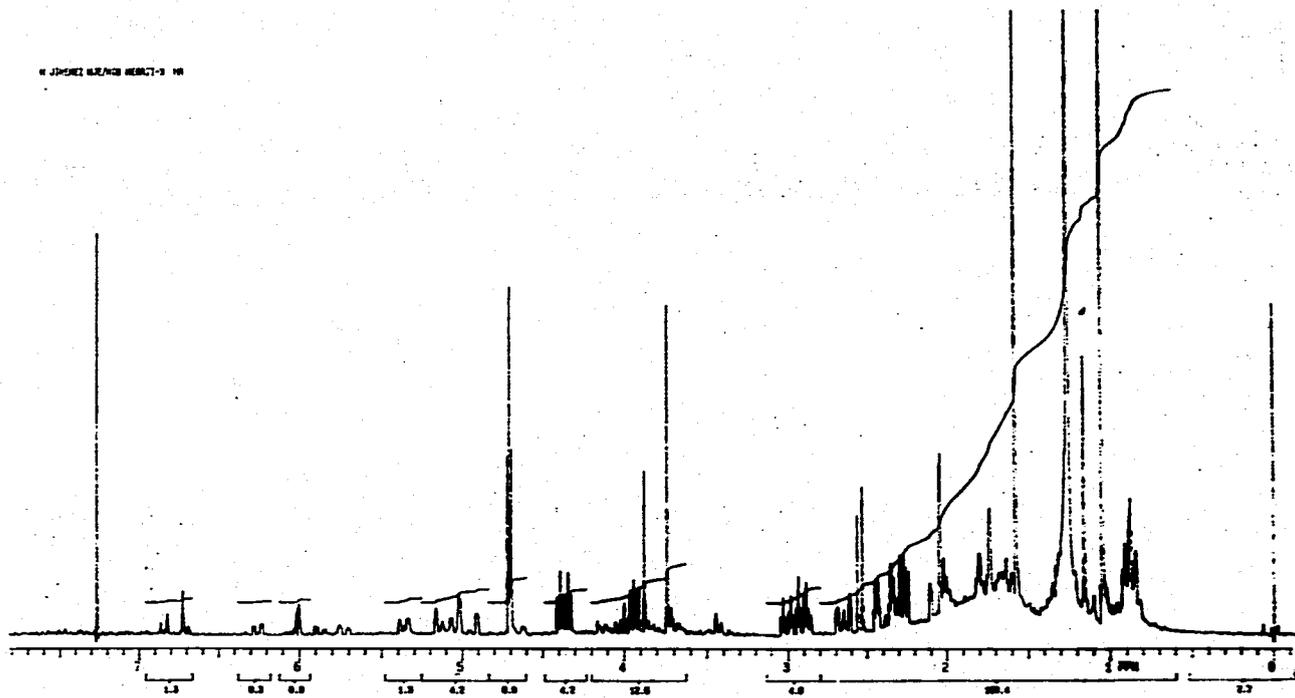


Figura 10 Espectro de resonancia magnetica nuclear de la muestra E1





DR. H. JIMÉNEZ: NOT-PART-ANIDA-4. 502  
I.N.A.N. INSTITUTO DE QUÍMICA  
4020

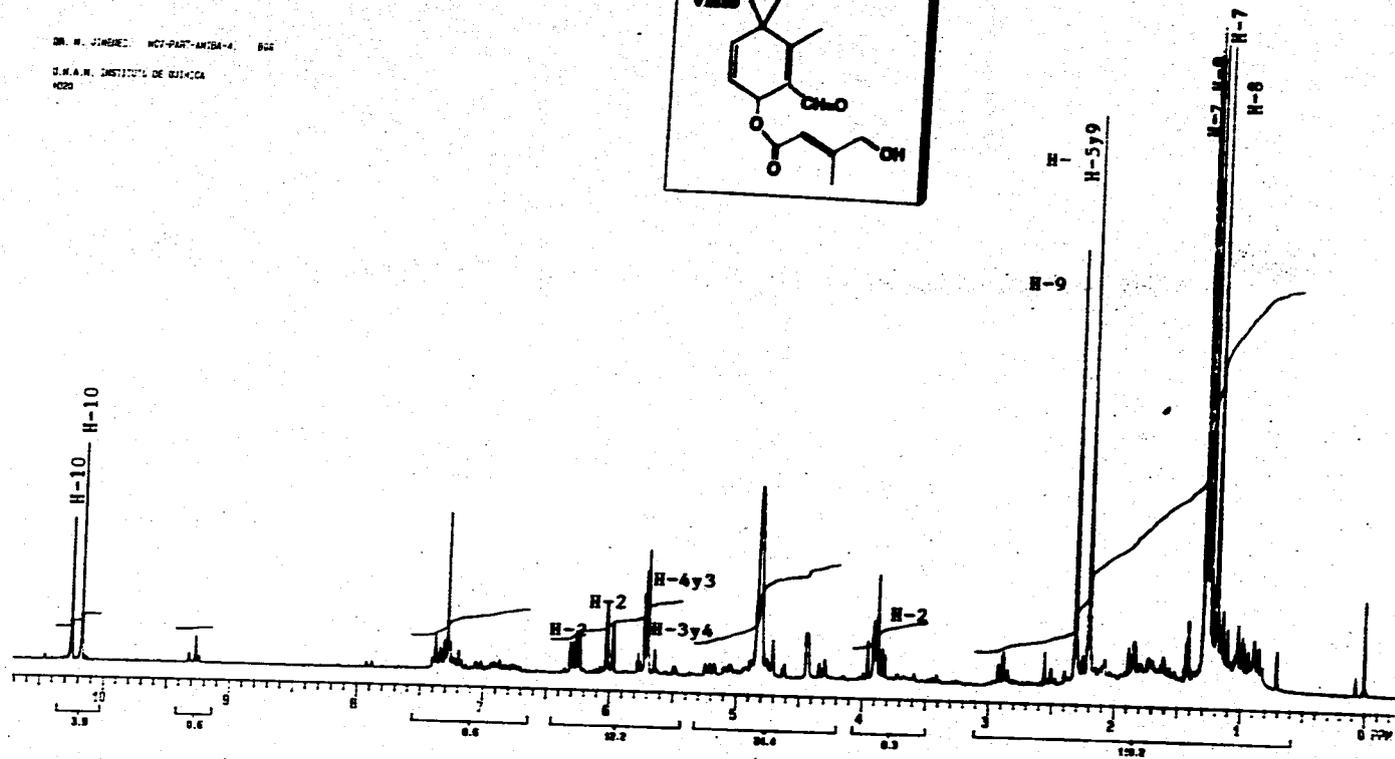
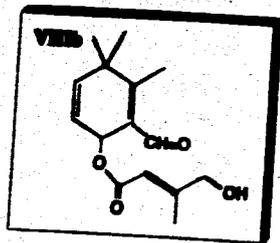


Figura 13 Espectro de resonancia magnética nuclear de la estructura VIIIb

DR. M. JOWNEY REV. PART. AM24-1. 836

Z.N.A.M. INSTITUTE OF SCIENCE  
+020

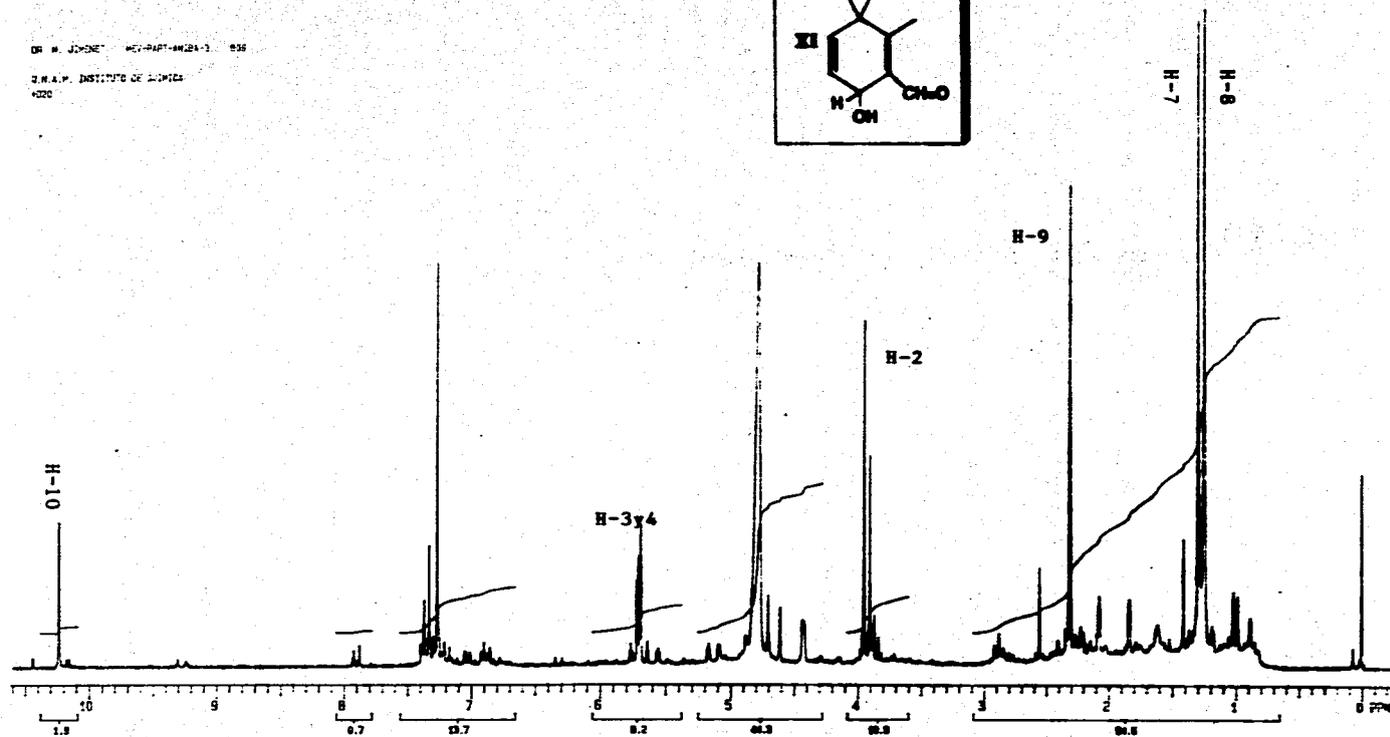
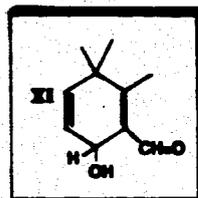


Figura 14 Espectro de resonancia magnética nuclear de la estructura XI

## BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, George N. Fitopatología, Editorial Limusa México 1991 19p.
- Alonso, E. Paz, M.P. Cerdeiras, J. Fernandez, F. Ferreira, P. Moyna M. Soubes, A. Vázquez, S. Vero, L. Zunino. Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 45 (1995)67-70.
- Anderson, E.S. and Smith, H.R. Chloramphenicol resistance in the typhoid bacillus. *British Medical Journal* 2(1972)329-331.
- Baker, F. J. M.R. Breach. Manual de técnicas de Microbiología Medica Ed. Acribia, Zaragoza (España) 1975 3-7p
- Bohmann, F. Suwita A. Nuevo diterpeno derivado de *Piqueria trinervia*, *Phytochemistry* 17(1978):560-561.
- Braude, Charles E. Davis Joshua Fierer Microbiología clínica Ed panamericana Buenos aires 1984. 972p.
- Blake, J. Mites and thrips as bacterial and fungal vectors between plant tissue cultures. *Acta Horticulturae* 225(1988) 163-166
- Brunner, I., Alfredo Echegaray, Abraham Rubluo. Isolation and characterization of bacterial contaminants from *Dieffenbachia amoena* Bull, *Anthurium andreanum* Linden and *Spathiphyllum* sp. Shoot cultured in vitro. *Scientia Horticulturae*. 1995 en espera.
- Cáceres, Armando, Alma V. Alvarez, Ana E. Ovando and Blanca E. Samayoa. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. 31(1991)193-208
- Castro, C. Jiménez M. González de la Para M. Efecto inhibitorio del Piquerol A en el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med.* 58(1992):281-282.
- Chavarrín, Rivera Carolina. 1985, Contribución a la química del piquerol, tesis.
- Chavez, Nutrición y Desarrollo Infantil Ed. Interamericana 19ed. (1979) pag 67-77.
- Chi-Kit, Wat. Timothy Johns and G.H. Neil Towers. Phototoxic and antibiotic activities of plants of the Asteraceae used in folk medicine *Planta med* 2(1980)279-290.
- Cruz, Reyes A. Chavarrín C. Campos Arias M., P. Taborda, M. Jiménez, Actividad molusquicida del piquerol A aislado de *Piqueria trinervia* Cav (Compositae) contra de 8 especies de caracoles pulmonados Mem Inst. Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, *Jurnal of Chemical Ecology* 84(1989):35-40.
- Cruz, Ortega. A. L. Anaya, M. Gavilane-Ruiz, S. Sánchez-Nieto and M. Jiménez E. Effect of Diacetyl Piquerol on H<sup>+</sup>-ATPase activity of *Ipamea purpurea*. *Journal of Chemical Ecology*. 7(1990)16
- Daruh, Ibrahim, Halim Osman Antimicrobial activity of *Cassia alata* from Malaysia *Journal of Ethnopharmacology* 45(1995) 151-156
- Davis, Bernard. Renato Dulbecco, Herman N. Eisen Darper Microbiología. Inter- nacional Edition ,1973 , 2d. 2-6p.
- Demi, Y.Y and H.S.N. Hussain Screening for antimicrobial activity and for alkaloids of *Nauclea latifolia* *Planta med* 35(1991)91-96.

Dimayuga, Rosalba Encarnación and Sergio Keer Garcia. Anti microbial Screening of medicinal plants from Baja California Sur, Mexico. *Planta med* 31(1991)181-192.

Edwin, F. George and Paul D Sherrington. Plan Propagation by tissue culture. Ed. Exegetics limited. 1984. 709p

Enjalric, F., Carron, M.P. & Lardet, L. Contamination of primary cultures in tropical areas: The case of *Hevea brasiliensis*. *Acta Horticulturae* 225(1988)57-65

Eykyn, S.J. and Williams, H. Treatment of multiresistant *Salmonella typhi* with oral ciprofloxacin. *Lancet Journal of Ethnopharmacology* 2(1987)1407-1408.

Falkiner, F.R. The Criteria for Choosing an antibiotic for control of bacteria in Plant Tissue Culture. *Internacional Association for Plant Tissue Culture*. 60(1990)13-23

Gale, E. F. Gale F.R.S. E. Cundliffe, P.E. Reynolds M.H. Richmond. The molecular Basis of antibiotic Action. Interscience Publication, London, 1972, 456pp

Goldstein, F.W. Chumpitaz, J.C., Guevara, J.M., Papadopoulos, B. and Acar, J.F. Plasmid-mediated resistance to multiple antibiotics in *Salmonella typhi*. *Journal of Infectious Diseases* 153(1986)261-266.

González, V. (1890) Breve estudio sobre la yerba del tabardillo (*Piqueria trinervia* Cav.) tesis, Fac Medicina, Universidad de Guanajuato.

González, de la Parra M Anaya M.L., Espinoza F, Jiménez M., Castillo R Potencial alelopático de *Piqueria trinervia* Cav (Compositae) y piquerol A y B. *Chem. Ecol.* 7(1981):509-515.

González, de la Parra M., Chavez Peña D., Jiménez Estrada, Ramos Mundo C. Potencial acaricida del Piquerol A y B en contra de *Boophilus microplus*. *Pestic Sci.* 33(1991):73-80.

Grosvenor, Paul W. Agus Supriono, David O. Gray Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2: antibacterial and antifungal activity. *Journal of Ethnopharmacology* 45 (1995) 97-111.

Hammerschmitt F-J. Alice M. Clark Fathy M. Soliman El-Sayed A. El-Kasbory, Mostafa M Abd El Kawy and Ahlam M. El Fishawy Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of *Jasontia candidans* and *J. montana*. *Planta medica* 59(1993) 68-70

Jiménez, M. y M. González. Nuevo alcohol diterpeno aislado de *Piqueria trinervia* Cav. *Rev. Latinoamericana Quim.* 14(1983):20-23.

Kirchner, Justus G. Thin-Layer Chromatography. Ed. Perry United States of America 1978 1137pp

Koneman, Allen Dowel Sommer, Elmer W. Stephen D., V.R. Herbert M. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Medica panamericana. 1991.

Knauss, J.F. & Miller, J.M. A contaminant, *Erwinia carotophora*, affecting commercial plant tissue cultures. *In Vitro* 14(1978) 754-756

Leggat, I. Waites, W.M., Leifert, C & Nicholas, J. Characterisation of micro-organisms isolated from plants during micropropagation. *Acta Horticulturae*, 225(1988)93-102.