



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA**

400282  61060

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE  
Tanacetum parthenium (L.) FAM. COMPOSITAE**

BO1150/95  
Ej. 2

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

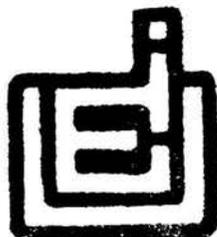
**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**JORGE MENDEZ MARTINEZ**

DIRECTOR DE TESIS:

**BIOL. J. GUILLERMO AVILA ACEVEDO**



LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEXICO

1995



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.

**A mis padres Jorge y Guadalupe  
por su invaluable apoyo, dedicación  
y motivación incondicional**

**A Gisela y Raul por su apoyo**

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento al Biol. José Guillermo Avila Acevedo, jefe del Laboratorio en Investigación en Productos Naturales, de la E.N.E.P. Iztacala, por su apoyo y dirección de la presente tesis, la cual sin su ayuda no habría sido posible. Al Biol. José Luis Muñoz Lopez quien con su invaluable ayuda en forma de crítica constructiva y valiosos comentarios evito que destrozara el idioma español.

Tambien agradezco de la manera más especial a los miembros del Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, el Biol. Gabriel Martínez Cortez y el M.V.Z. Andres Martínez Cortez, por su invaluable ayuda para que la presente tesis llegará a termino.

A todas las personas que de una u otra manera contribuyeron a la realización de la presente tesis mi agradecimiento en especial el M. en C. Jaime Barral Caballero, el M. en I. Luis Lucero Guerrero, la Hidrobiol. Claudia Gutierrez Naranjo y el Soc. José Castro Lopez, y a todos aquellos que omita y que hayan tenido participación alguna en el presente trabajo.

Finalmente a los sinodales, el M. en C. Ignacio Peñaloza Castro, la Q.F.B. Irma Delfin Alcalá y el M. en C. Agustín Cabrera Ruiz, a quienes les toco la tarea de revisar el presente trabajo, por sus invaluable opiniones y criticas.

## INDICE

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	4
Bacterias	4
Enterobacterias	8
<i>Vibrio cholerae</i>	10
Antimicrobianos	13
Resistencia a antibióticos	14
Antimicrobianos de origen vegetal	15
Mecanismos de acción de compuestos bactericidas de origen vegetal	18
Tradición herbolaria en México en relación con las enfermedades gastrointestinales	20
Familia Compositae	21
Descripción botánica de <i>Tanacetum parthenium</i>	22
Estudios fitoquímicos y biológicos del genero <i>Tanacetum</i>	22
Justificación	24
Objetivos	26
Metodología	28
Resultados	31
Discusión	44
Conclusiones	47
Apéndices	48
Bibliografía	54

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Unidad de Investigación Interdisciplinaria de Ciencias de la Salud y la Educación del Campus Iztacala de la UNAM, con los objetivos de: 1) evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de *Tanacetum parthenium* contra las enterobacterias *Escherichia coli*, *Salmonella thyphi*, *Shigella boydii*, *Enterobacter agglomerans* y 4 cepas de la vibriónacea *Vibrio cholerae* y 2) aislar e identificar el o los principios activos presentes en *T. parthenium*.

La investigación consistió en la obtención de los datos etnobotánicos más importantes, evaluación del potencial antimicrobiano de los aceites esenciales y aislar e identificar el o los componentes activos.

En los resultados se demostró que existe actividad antibacteriana en el aceite esencial, a éste se le determinó su concentración mínima inhibitoria y su concentración bactericida media, además se obtuvo la curva de supervivencia de *E. coli* expuesta al aceite. Se aisló como uno de los componentes activos, el alcanfor.

*La alegría de mirar y comprender es el don más  
hermoso de la naturaleza  
Albert Einstein*

## INTRODUCCION

Las infecciones causadas por microorganismos, por su naturaleza epidémica, han sido y son causa de gran mortalidad entre la población mundial. Por lo anterior, tienen gran importancia social, y los esfuerzos para encontrar medios para controlarlas han involucrado a un importante número de investigadores. Se considera que el desarrollo de métodos cada vez más eficaces para lograr el control de las infecciones y de la contaminación bacteriana como un gran aporte científico.

La epidemiología como ciencia se inicia en 1546 cuando Francastorio de Verona, en su obra *De Contagione*, describe la naturaleza infecciosa de ciertas enfermedades epidémicas. En la actualidad podemos definir a la epidemiología como: el estudio de los factores que influyen sobre la distribución de las enfermedades en las poblaciones, incluyendo las enfermedades infecciosas que son difundidas por gérmenes patógenos (Davis, 1982).

En 1876, Robert Koch estableció el papel etiológico de las bacterias como agentes infecciosos y formuló cuatro postulados para la identificación de agentes patógenos: 1) el organismo se encuentra en las lesiones de la enfermedad, 2) puede ser aislado en cultivos puros, en medio artificial, 3) la inoculación de los cultivos origina en los animales de experimentación un proceso parecido a la enfermedad y 4) el agente patógeno puede recuperarse a partir de las lesiones producidas en los animales inoculados. Con base en estos criterios ha sido posible el aislamiento de los microorganismos causantes de gran número de procesos infecciosos.

La identificación de los agentes patógenos de varias enfermedades, condujo a la utilización de diversos métodos de control, de los cuales, uno de los más utilizados es la quimioterapia, que ha permitido un considerable control de muchas enfermedades infecciosas y también ha disminuido su frecuencia. Los agentes quimioterápicos con acción antibacteriana, se dividen en

bacteriostáticos que inhiben reversiblemente la reproducción bacteriana y los bactericidas que ejercen acción letal irreversible (Brock, 1978).

El uso de plantas en el tratamiento de diversas enfermedades, y dentro de éstas las causadas por microorganismos está muy extendido, sobre todo en los países no industrializados (Hamburger, 1991). En México existe una tradición herbolaria que se remonta a la época prehispánica y que se complementó, con las plantas que fueron introducidas por los conquistadores europeos (Lozoya, 1987).

## ANTECEDENTES

### BACTERIAS

Los organismos unicelulares se dividen en dos grupos basándose en su complejidad. Los organismos protistas como protozoarios, algunos hongos y la mayoría de las algas son eucariontes al igual que las células de los hongos pluricelulares, las plantas y los animales, es decir su núcleo se encuentra rodeado por una membrana nuclear, múltiples cromosomas en el interior de cada núcleo y un aparato mitótico que garantiza la equipartición de los elementos resultantes de replicación cromosómica entre los núcleos hijos. Por el contrario, las células de las bacterias y de las algas verdeazules son denominadas procariontes en las cuales el núcleo está constituido en realidad por un único cromosoma carente de membrana nuclear. Las células procariontes carecen de organelos cubiertos de membrana, como son las mitocondrias. Aunque en su interior las bacterias sean más simples que las células animales, su estructura superficial es más compleja, ya que comprende una pared celular rígida que rodea a la membrana plasmática. Esta pared protege a las células de posibles lesiones mecánicas. Además, considerando que el metabolismo de estas células requiere un elevado contenido intracelular de ciertas sales y metabolitos, la pared celular evita la rotura osmótica de la bacteria cuando ésta se encuentra en medios hipotónicos. Además de la pared dependen muchas de las características taxonómicas bacterianas: su morfología, su principal división en bacterias gramnegativas y grampositivas y las propiedades antigénicas específicas en que se basa su clasificación y las interacciones entre los gérmenes patógenos y su huésped.

Existen dos formas morfológicas principales de bacterias, los organismos más o menos esféricos llamados cocos que a su vez se subdividen en: a) diplococos- agrupados en pares, b) estreptococos- en cadenas c) estafilococos- en racimos y d) sarcinas- tétradas o aglomeraciones cúbicas; y el de los bacilos que tienen forma de bastones que se subdividen en: a) cocobacilos- bastones extremadamente cortos, b) bacilos fusiformes- más delgados en sus extremidades,

c) bacilos fusiformes- forma de fibra y formas filamentosas y d) vibriones o espirilos- formas curvas.

Para ocupar la totalidad de los posibles nichos ecológicos, los procesos evolutivos que han afectado a las bacterias, han producido organismos capaces de sobrevivir utilizando las fuentes alimenticias más dispares, por otro lado, la acción de estos microorganismos tiene un papel importantísimo en los ciclos biogeoquímicos y en la descomposición de la materia orgánica. La energía procedente de todos estos combustibles esenciales adquiere utilidad al convertirse en adenosin trifosfato (ATP). El ATP interviene en la mayoría de los procesos de transferencia de energía y sirve para acoplar los procesos catabólicos (procesos degradativos, en los que se libera energía) con los anabólicos (reacciones de biosíntesis).

Existen tres vías principales para la producción de ATP: a) fermentación, b) respiración y c) fotosíntesis.

Actualmente la fermentación la podemos definir como un proceso metabólico en el cual la energía procede de compuestos orgánicos que actúan tanto de dadores como de receptores de electrones.

Los procesos energéticos de la fermentación pueden estudiarse desde varios puntos de vista. Cabe describirlas desde un punto de vista termodinámico, debido a que los productos resultantes tienen un contenido energético inferior al de los sustratos. Así, la diferencia molar de energía libre ( $\Delta F$ ) entre un mol de glucosa y dos moles de lactato (a pH neutro) es de 58 kcal. Esta diferencia se debe principalmente, al menor nivel energético del grupo carboxilo (-COOH), de su producto de descarboxilación ( $\text{CO}_2$ ) y del agua, en comparación con los mismos átomos situados en un grupo carbonilo o en un grupo hidroxilo. Por consiguiente, desde el punto de vista de la energía de enlace, la fermentación puede interpretarse como un reagrupamiento de átomos de H y de O en moléculas inorgánicas, para producir grupos carboxilos (fermentación láctica) o para dar lugar a  $\text{CO}_2$  (fermentación alcohólica).

Desde el punto de vista del metabolismo intermedio, el problema principal se centra en la producción de secuencias metabólicas en las que las reacciones que se producen espontáneamente vayan acompañadas de la producción de ATP. Para ello es necesario que se forme, en primer lugar, un fosfato orgánico cuya energía de hidrólisis ( $-\Delta F$ ) sea superior a las  $-8$  kcal que se liberan al transformarse de ATP a ADP + Pi; en tal caso, una enzima puede transferir en forma exergónica el grupo fosfato desde el dador al ADP (es decir un proceso inverso al que se produce en una reacción de fosforilación).

Las bacterias se clasifican en distintos grupos, según la acción que el oxígeno desarrolle en su crecimiento y metabolismo.

1.- Los aerobios obligados necesitan oxígeno y les falta la capacidad para realizar fermentaciones.

2.- Los anaerobios obligados, pueden crecer sólo en ausencia de oxígeno. Un subgrupo, llamado microaerófilo, incluso crece mejor en presencia de  $O_2$  a baja tensión; pero no se desarrolla a la tensión de  $O_2$  existente en el aire.

3.- Organismos facultativos: crecen tanto en presencia de oxígeno como en su ausencia y pasan en la presencia de oxígeno, a un metabolismo de tipo respiratorio.

4.- Anaerobios aerotolerantes: se trata de organismos parecidos a los facultativos, ya que pueden crecer en presencia o en ausencia de oxígeno, pero su metabolismo es siempre de tipo fermentativo.

Los aerobios obligados y los organismos facultativos que desarrollan un metabolismo respiratorio poseen una cadena completa de transporte de electrones, en la cual estos circulan desde el DPNH (o directamente desde algunos pocos sustratos, tales como el succinato o el lactato) a una flavoproteína y de aquí a través de algunos citocromos, se dirigen al oxígeno; el ATP se genera en el proceso acompañante que consiste en la fosforilación oxidativa. Sin

embargo, los organismos estrictamente fermentativos carecen en general, de la mayoría de los citocromos. Desde el punto de vista energético la respiración es mucho más eficiente que la glucólisis, ya que da lugar a 10 veces más energía libre ( $\Delta F$ ) y a la producción de una cantidad mayor de ATP, que es 19 veces mayor que la obtenida por mol de glucosa metabolizado por medio de la glucólisis.

En los procesos metabólicos anteriores, las sustancias utilizadas son compuestos orgánicos, los cuales se forman en la naturaleza por acción de los animales o de las plantas. Por esta razón, esta forma de metabolismo recibe el nombre de heterotrófico (alimentarse a expensas de otros organismos). Sin embargo, ciertos microbios no dependen de los compuestos orgánicos, sino que utilizan distintas fuentes energéticas y emplean esta energía para reducir el  $\text{CO}_2$  y transformarlo en compuestos orgánicos necesarios para su crecimiento (autótrofos).

Los procesos autotróficos pueden dividirse en dos clases: 1) La fotosíntesis que obtiene energía a partir de luz visible y que se desarrolla en las algas y en las bacterias pequeñas, así como en las plantas superiores. La fotosíntesis microbiana en las capas superficiales del océano y los lagos es desarrollada por las algas y abarca casi la mitad de la fotosíntesis terrestre total. 2) La quimioautotrofia (quimiosíntesis) obtiene la energía de la respiración de dadores de electrones inorgánicos. Este tipo de metabolismo se observa solo en las bacterias llamadas litotrofas (griego, lithos, piedra). Algunos organismos emplean  $\text{O}_2$  en su transporte de electrones, mientras que otros utilizan distintos aceptores de electrones. Las bacterias autotróficas que oxidan el  $\text{H}_2$  pueden utilizar con frecuencia de la misma forma, compuestos simples de carbono tales como el  $\text{CO}$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{HCHO}$  o  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Puesto que estos compuestos son orgánicos por definición su utilización no concuerda con la definición inicial de autotrofia. En este caso se definiría la autotrofia como la utilización del  $\text{CO}_2$  como fuente principal de los compuestos orgánicos.

## ENTEROBACTERIAS

Las enterobacterias como grupo presentan uno de los mayores índices de desarrollo de resistencia a antibacterianos y por otra parte son una de las mayores causas de morbilidad en México por las enfermedades de tipo gastrointestinal que provocan. Las principales características morfológicas, patológicas y de sensibilidad de este grupo de bacterias se presentan en la figura 1.

Las enterobacteriáceas constituyen una familia de bastones gramnegativos capaces de crecer en condiciones aerobias o anaerobias; estos organismos se encuentran normalmente formando parte de la flora (o de los microorganismos patógenos) del intestino de los vertebrados, aunque algunos de sus géneros son saprofiticos o parasitan a ciertas plantas.

Una de las diferencias más importantes establecidas dentro del grupo de estos microorganismos se basa en la capacidad de fermentar y en la capacidad de utilizar azúcares a través de la vía oxidativa o en la incapacidad absoluta para utilizar estas sustancias.

Entre los organismos fermentativos se incluyen tanto los géneros que resultan inocuos cuando se hallan presentes en el conducto intestinal como los géneros patógenos de las enterobacteriáceas.

La mayoría de los organismos no fermentativos producen una oxidación de la glucosa (*Pseudomonas* y otros géneros); existen algunos microorganismos incapaces de utilizar la glucosa u otros hidratos de carbono (*Alcaligenes* y ciertas cepas de *Acinetobacter*).

Sin embargo, la aparición de los antibióticos y la mayor supervivencia de pacientes que presentan una disminución de sus respuestas inmunitarias ha dado lugar a que los organismos fermentativos no patógenos se encuentren con una frecuencia cada vez más elevada como agentes que dan lugar a infecciones oportunistas (que en algunos casos, pueden ser graves).

### ESPECIES BACTERIANAS

Familia	Características	Enfermedades	Sensibilidad a fármacos
Enterobacteriaceae	Bastones gram negativos, Capacidad de crecimiento aerobio y anaerobio, no forman esporas, flagelos peritricóticos.		
<i>Escherichia coli</i>	Especie predominante del intestino grueso como comensal, cepas patógenas con capacidad invasora.	Infecciones de la vejiga y riñones, Diarrea aguda en infantes	Sulfamidas, ampicilina, cefalosporinas, tetraciclinas, carbenicilina
<i>Salmonella typhi</i>	No fermentan la lactosa ni la sacarosa, son invasoras.	Fiebre tifoidea	Cloranfenicol
<i>Shigella boydii</i>	Falta de movilidad, no son invasoras.	Alteración intestinal.	Ampicilina, tetraciclinas, estreptomina, sulfamidas, kanamicina, cloranfenicol, ácido nalidixico, colistina
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Hábitat: suelo, productos lácteos, agua, cloacas, intestino humano. Oportunistas.	Infecciones secundarias.	Cefalotina, ampicilina
Vibrionacea	Bacilos curvados (vibriones), gram negativos, un flagelo polar, 34 especies		
<i>Vibrio cholerae</i>	Producción de una enterotoxina muy potente. Solo afecta al hombre.	Cólera.	Tetraciclinas
<i>V. cholerae</i> El Tor	Biotipo productor de una hemolisina soluble		

Figura 1.- Cuadro sinóptico con las características principales de las especies bacterianas utilizadas en el presente trabajo (Tomado de Davis, 1982; Joklik, 1986; Jensen, 1987; Brock, 1978)

La clasificación genérica se basa en una serie de características bioquímicas, mientras que otras características bioquímicas y la determinación de la estructura antigénica permite una clasificación más específica. Los distintos géneros y especies de este grupo pueden ser identificados a partir de su capacidad para fermentar ciertos substratos (p. ej. citrato) como única fuente de carbono y por generar productos finales característicos (p. ej. el indol a partir de triptófano, amoníaco a partir de la urea y sulfuro de hidrógeno). La identificación final a nivel de especie se basa en su estructura antigénica <sup>(Davis, 1982)</sup>.

### *VIBRIO CHOLERAE*

Aunque en un principio se incluía a los vibriones dentro de las enterobacterias, se han determinado diferencias que permiten clasificarlos como familia independiente, de las 34 especies que constituyen a la familia Vibrionacea, es *V. cholerae* la que posee mayor capacidad patogénica. *V. cholerae* se diferencia de las enterobacteriáceas en distintos aspectos. 1) Aislados en fresco su forma es parecida a la de una coma y no a una varilla recta, aunque, después de cultivos repetidos, adopte la forma de los bacilos entéricos. 2) Se trata de un organismo oxidasa-positivo. 3) Crece extraordinariamente bien en medios excesivamente alcalinos (pH 9 a 9.6) para el crecimiento de otras bacterias; sin embargo se trata de un organismo sensible a los ácidos; este microorganismo es rápidamente destruido en cultivos que contengan hidratos de carbono fermentables (esta propiedad es utilizada para la nomenclatura de medios selectivos para su aislamiento primario). 4) Producen una neuraminidasa que hidroliza el ácido N-acetilneuramínico, ácido siálico que se encuentra en el plasma humano, en diversos tipos de mucina y en las estructuras superficiales de numerosas células de mamíferos.

El cólera es una enfermedad causada por la bacteria gramnegativa *Vibrio cholerae* que se ha propagado desde los pantanos y selvas del actual Bangladesh al resto del mundo. Puesto que este microorganismo sólo ataca al hombre, los desplazamientos de este contribuyen a diseminar la enfermedad.

Han existido 6 pandemias de cólera a partir de 1817, en la actualidad se encuentra en curso la 7ª pandemia, la cual inicio en 1961 y tiene como características principales:

- 1) se inició en Indonesia y no en Bangladesh;
- 2) ha completado 30 años y no muestra signos de remisión;
- 3) se ha extendido a regiones no afectadas desde el siglo pasado como Africa Occidental y Latinoamérica;
- 4) el biotipo dominante es El Tor;
- 5) el serotipo es Inaba;
- 6) el número de países afectados pasaba de 100 al término de 1991;
- 7) el hemisferio sur no ha sido respetado;
- 8) han aparecido otros hábitats como el Golfo de México, Rumania y el sur de la Rusia europea;
- 9) la disponibilidad de vacunas y antimicrobianos no ha detenido la diseminación por contagio; y
- 10) la letalidad ha descendido a niveles menores a 1%.

El contagio del cólera no es por contacto, sino se debe principalmente a la contaminación de las fuentes de agua por las evacuaciones de los enfermos coléricos debido a las deficientes condiciones sanitarias existentes en las aglomeraciones urbanas y rurales de los estratos sociales más bajos, este hecho se demostró en la última epidemia que sacudio al continente latinoamericano, especialmente en Perú. (Kumate, Sepúlveda y Gutiérrez, 1993). Las principales características de la bacteria se encuentran en la figura 1.

*V. cholerae* produce una enterotoxina extraordinariamente potente, que ya ha sido obtenida en forma altamente purificada: se trata de una proteína lábil al calor con un peso molecular (PM)

de alrededor de 84,000. Su acción sobre las células epiteliales del intestino delgado da lugar a la pérdida masiva de líquidos y electrolitos a través del intestino, que caracteriza al cólera.

## ANTIMICROBIANOS

La utilización de la quimioterapia contra agentes bacterianos patógenos se inició en 1935, cuando en Alemania, Domagk desarrolló el Prontosil, el cual curaba infecciones por estreptococos de forma espectacular. Aún cuando el Prontosil era inactivo *in vitro*, otro investigador Tréfoüel, demostró que los pacientes que eran tratados con el colorante, eliminaban un producto más simple, la sulfanilamida, que era activa *in vivo* e *in vitro*. Posteriormente se desarrollaron derivados más potentes de la sulfanilamida, denominados sulfamidas (Joklik, 1982).

En 1929, Fleming notó que una colonia contaminante de *Penicillium notatum*, producía lisis en las colonias estafilocócicas adyacentes al hongo, pero el agente lítico era inestable para ser utilizado en terapéutica, el aislamiento y estudio de la penicilina fue realizado por Florey y Chain en la Universidad de Oxford (Davis, 1982).

La penicilina fue el primero de los antibióticos, definidos como agentes antimicrobianos de origen microbiano. Debido al éxito obtenido con la penicilina, varios investigadores continuaron la búsqueda de otros antibióticos; a partir de actinomicetos; del género *Streptomyces* se aislaron los aminoglucósidos estreptomina, neomicina, kanamicina, gentamicina, espectomicina; las tetraciclinas, y los macrólidos eritromicina, micina, josamicina, oleandomicina, espirimicina, lincomicina, rosamarcina.

El cloranfenicol también fue aislado de *Streptomyces* y fue el primer antibiótico de amplio espectro (Freeman, 1989).

Otros antibióticos, las cefalosporinas se aislaron de *Cephalosporium acremonium*, de las cuales la principal es la cefalosporina C.

Los antibióticos de naturaleza peptídica como: bacitrina, gramicidina, pristinamicina y sulfato de polimixina B, del cual la mayoría se han aislado del género *Bacillus* (Garrod, 1985). Hasta hoy se han aislado casi 3 000 antibióticos, de los que sólo algunos son eficientes como agentes

terapéuticos. De los antibióticos de importancia clínica, solo el cloranfenicol, se produce en forma sintética a partir de fenona  $\beta$ -nitroacetato (Garrod, 1985).

## RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

La resistencia que presentan las bacterias a los antimicrobianos ha forzado a la búsqueda de nuevos antibióticos para poder contrarrestar con más eficacia las enfermedades causadas por las mismas ya que los medicamentos utilizados de manera regular son cada vez menos eficaces. La resistencia antimicrobiana puede dividirse en dos: natural y selectiva. La natural comprende el espectro genético primigenio previo a la intervención generalizada de quimioterápicos y antibióticos, tiene una base selectiva, resultado de la adecuación al medio, de las mutaciones ocurridas al azar durante un lapso evolutivo muy prolongado, de aproximadamente 4 000 millones de años. La resistencia selectiva se inicia en el presente siglo, cuando el hombre ha dispuesto en escala antes no considerada, de medicamentos con acción antimicrobiana que han acelerado vertiginosamente las posibilidades de selección, el resultado es una presión selectiva para interferir con el desarrollo de las clonas sensibles a los antimicrobianos y la facilitación para que la flora naturalmente resistente proliferare; por otra parte, las posibilidades de recombinación genética microbiana intervienen para facilitar la circulación de elementos genéticos que puedan modificar la resistencia natural. Los organismos presentan resistencia a los antibióticos de acuerdo a los siguientes mecanismos: a) Presencia de una barrera impermeable al antibiótico, b) Inactivación metabólica del antibiótico y c) Aprovechamiento metabólico del hospedero. (Kumate, 1981).

## ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL

Aunque la principal fuente de antibióticos siguen siendo los microorganismos, algunas plantas también poseen sustancias con esta actividad. El uso de vegetales para la cura de enfermedades infecciosas se ha documentado desde hace 5 000 años, en registros de las civilizaciones de la India, China y del Medio Oriente. (Hamburger, 1991).

Después de siglos del uso empírico de preparaciones herbales, al iniciarse el Siglo XIX, los primeros aislamientos de principios activos, marcan una nueva era en el uso de plantas medicinales y el inicio de la investigación moderna en las mismas. En la última década, el interés por drogas extraídas de vegetales, ha tenido un continuo crecimiento, durante este periodo el consumo de plantas medicinales casi se ha duplicado, en la actualidad, casi el 25% de las medicinas de patente a nivel mundial contienen algún compuesto activo que tiene su origen en las plantas. La conciencia ecológica y una creciente demanda por terapias no clásicas, pueden ser consideradas como las razones principales del actual interés en los preparados herbales.

Básicamente, las plantas medicinales se utilizan en dos formas: a) como mezclas complejas conteniendo un amplio rango de constituyentes (infusiones, aceites esenciales, tinturas, extractos y b) como principios activos químicamente puros (Hamburger, 1991).

Los compuestos puros se utilizan cuando los principios activos de una planta muestran actividad fuerte y específica y/o tienen un pequeño espectro terapéutico que requiere dosificación precisa y reproducible, mientras que la utilización de extractos, tinturas, etc. es apropiada para plantas que exhiben actividades farmacológicas débiles y/o menos específicas o si los principios activos de una planta son aún desconocidos.

Todavía falta realizar investigación sobre plantas que pueden ser fuente de nuevas drogas, puesto que de aproximadamente 5 000 especies medicinales reportadas, sólo un pequeño porcentaje se ha investigado fitoquímicamente y la fracción sometida a pruebas biológicas es aún

menor (Hamburger, 1991). En la siguiente lista se incluyen algunos de los trabajos encaminados a la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antibacteriana.

### EJEMPLOS DE COMPUESTOS AISLADOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

ESPECIE *	COMPUESTO	ACCIÓN SOBRE	REFERENCIA
<b>1.- Lignanós y derivados del Fenilpropano</b>			
<i>Cercedyphylum japonicum</i>	Fenil benzodioxano	<i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Tada, 1991
<i>Rhynchosia suaveolens</i>	Bifenilos	<i>B. subtilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Khan, 1984
<i>Machaerium floribundum</i>	Procianidina	<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Waage, Hedin & Grymley, 1984
<i>Helycrysium decumbens</i> <i>H. stochea</i> <i>H. italicum</i>	Derivados de fluoroglucinol y acetofenona	Gram positivas y <i>E. coli</i>	Tomás-Barberan, 1989
<i>Piper sarmentosum</i>	Fenilpropanoides	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i>	Masuda, 1991
<b>2.- Terpenos</b>			
<i>Laurencia chilensis</i>	3 hidroxí-4-metilacetofenona	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i>	Valdebenito, 1982
<i>Psoralea juncea</i>	Plicatin- $\beta$	<i>S. aureus</i> <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Schmitt, 1991

### 3.- Glucósidos

<i>Vicia angustifolia</i>	Glicósido-(1→6)-glucósido	<i>P. maltophilia</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Waage, 1985
<i>Ipomoea bahiensis</i>	Glucósido hidroxiaácido graso	<i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>Streptococcus faecalis</i>	Bieber, 1986

### 4.- Flavonoides

<i>Plantago major</i>	Glucósido	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Mitscher, 1988
<i>Gossypium arboreum</i>	Gosipetin 8-0 ramnósido Quercetin 3-0 glucósido 3' 0 glucósido	<i>P. maltophilia</i> <i>E. cloacae</i>	Waage & Hedin, 1984
<i>Agrimonia pilosa</i>	Derivados de catequinas	<i>S. aureus</i>	Kasai, 1992
<i>Eleagnus glabra</i>	Flavonoides	<i>Proteus vulgaris</i> <i>S. aureus</i>	Mori, 1987
<i>Psidia trinervia</i>	Flavonoides	<i>Bacillus cereus</i>	Wang, 1989

### 5.- Quinonas

<i>Karwinskia humboldtiana</i>	Benzocromanos	<i>S. aureus</i> <i>M. smegmatis</i>	Mitscher, 1985
<i>Anona montana</i>	Anaquinona-A	<i>B. subtilis</i> <i>Mycobacterium luteus</i>	Wu, 1987

### 6.- Pterocarpanos

<i>Erythrina mildbraedii</i>	Pterocarpanos	<i>S. aureus</i> <i>M. smegmatis</i>	Mitscher, 1988
------------------------------	---------------	---	----------------

---

## MECANISMOS DE ACCION DE COMPUESTOS BACTERICIDAS DE ORIGEN VEGETAL

Aunque se ha aislado un número importante de compuestos activos, sólo a algunos se les ha determinado su mecanismo de acción. Dentro de éstos figuran los flavonoides, los taninos y los terpenos.

Flavonoides.- Se ha visto que existe muerte bacteriana cuando hay flavonas en el medio de cultivo. Estos compuestos inhiben la síntesis de DNA o RNA bacteriano por intercalación entre las bases de la doble hélice debido a que estos compuestos tienen una estructura planar similar a las bases púricas y pirimídicas además de poder formar puentes de hidrógeno con ellas, en este caso las flavonas que han mostrado mayor inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos son aquellas que presentan tres grupos OH en el anillo B (por ejemplo la miricetina) <sup>(Mori, 1987)</sup>

Taninos.- La acción inhibitoria de estos compuestos se debe a los siguientes efectos: astringencia, acción sobre membranas y competencia por metales.

a) Astringencia.- Este efecto se ha estudiado de manera exhaustiva en el caso de los taninos, ya que esta propiedad ha sido utilizada para el curtido de pieles. El carácter astringente de los taninos puede inducir la formación de complejos insolubles de enzimas y de substratos que las bacterias requieren para su crecimiento normal. Se ha observado que muchas enzimas microbianas se inhiben cuando se mezclan con taninos. Las enzimas en las cuales se ha observado este efecto son las peroxidasas y las glicosiltransferasas. También los taninos pueden afectar el metabolismo de los microorganismos como lo sugiere el cambio de morfología de *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* y *Cellvibrio fulvus* que a bajas concentraciones de taninos en el sustrato forman filamentos o cadenas mientras que las células en condiciones de crecimiento normales crecen de manera individual <sup>(Scalbert, 1991)</sup>.

b) Acción sobre membranas .- Dentro de los efectos deletéreos de los taninos sobre los microorganismos está su acción sobre membranas, se ha demostrado que el ácido tánico a concentración de 50 mg/l inhibe el transporte electrónico membranal de *Photobacterium phosphoreum* (Konishi, 1987). La acción de los taninos en las bacterias puede ser similar a la observada en fenoles sintéticos (como el o-difenilfenol y difenilalcanos) y compuestos que son muy utilizados como desinfectantes.

c) Competencia por metales.- Otro mecanismo de toxicidad de los taninos es su capacidad de formar complejos con los metales. Los sistemas biológicos incluyendo a los microorganismos son altamente dependientes de los iones metálicos presentes en el medio. Por ejemplo, la infección de humanos por *E. coli* se inhibe por la presencia de lactoferrina (encontrada en la leche humana) la cual forma quelatos con el fierro. Los taninos tienen un efecto similar al de la lactoferrina, puesto que muchos de estos compuestos presentan más de dos grupos o-difenol en su molécula, los que pueden formar quelatos con varios tipos de iones metálicos, como los iones férricos y cúpricos. La naturaleza multicatecólica de los taninos, permite la reticulación y con esto la formación de un precipitado metal-tanino que de esta forma, torna inaccesibles a los iones metálicos para el consumo bacteriano.

Terpenos.- La actividad antibacteriana de estos compuestos se debe a que tienen capacidad de solubilizar la membrana y provocar lisis, este efecto es observado especialmente en bacterias gram negativas (Kubo, 1993).

## LA TRADICION HERBOLARIA EN MEXICO EN RELACION CON LAS ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES

En México existe una tradición herbolaria, que se remonta a la época prehispánica, el conocimiento de las propiedades terapéuticas de las diversas plantas es empírico, acumulado en el curso del tiempo. La información sobre plantas medicinales es escasa en comparación con el número de especies. No obstante hallarse documentado el arraigado y antiguo uso que de las plantas han hecho los mexicanos por más de cinco siglos, no logramos aún contar con un inventario amplio y confiable de tales recursos vegetales. Uno de los esfuerzos para subsanar esta deficiencia fue realizado por el Instituto Mexicano del Seguro Social, por medio de una encuesta a nivel nacional sobre el uso de plantas medicinales (Lozoya, 1987). Con los resultados obtenidos en la encuesta antes mencionada, se conoció que el 38% de las especies reportadas son utilizadas para el tratamiento de enfermedades del aparato digestivo. Estos padecimientos son en su gran mayoría el resultado de procesos infecciosos, asociados a diversas circunstancias ecológicas y sociales, que la medicina tradicional pareciera resolver con eficacia utilizando remedios a base de plantas cuyos efectos no se han estudiado científicamente (Sepúlveda, 1988 y Osuna, 1989).

De los grupos étnicos que viven en México, uno de los que conservan la tradición de utilizar plantas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales es el de los purépecha. A pesar de que es conocido el uso de plantas por esta etnia, no existe información de que en la antigüedad hayan existido jardines botánicos o si es que los hubo no alcanzaron la magnitud de los que había en el Valle de México y Cuernavaca (Sepúlveda, 1988). Hoy en día, se puede encontrar información al respecto en la Organización de Médicos Indígenas Purépecha (OMIP) (Avila, 1993).

## FAMILIA COMPOSITAE

La familia de las compuestas contiene aproximadamente 14000 especies con distribución mundial. Son plantas herbáceas o arbustivas, pocas veces arbóreas, con las hojas esparcidas, raramente opuestas, por lo general más o menos divididas, sin estípulas pero provistas, a veces, de aurículas estipuliformes. tienen flores hermafroditas, unisexuales o estériles; la corola, actinomorfa, tubulosa o zigomorfa, ligulada y se hallan agrupadas de manera diversa en capítulos, sobre un receptáculo liso o foveolado, nudo o provisto de páleas de diversa condición, rodeado en conjunto por un involucreo o periclineo formado por brácteas más o menos numerosas; a su vez, los capítulos pueden formar inflorescencias en corimbo, cima, glomérulo, etc. El androceo se compone de 5 estambres epicorolinos con las anteras soldadas en un tubo que rodea al estilo; este es filiforme, bifido en las flores femeninas o hermafroditas, con las dos ramitas convexas en su cara externa y planas en la interna, provisto, hacia la parte superior o externamente, de pelos rígidos colectores o recorrido a lo largo del borde de la cara interna por dos estrias glandulares, las llamadas glándulas estigmáticas, que constituyen el verdadero estigma. Mucho más corto que los estambres antes de que las anteras lleguen a sazón, el estilo se alarga rápidamente cuando llegando el momento de la polinización, penetra en el cilindro constituido por las anteras concrecentes y arrastra el polen vertido en él por medio de los pelos colectores. El endosperma es de tipo celular o nuclear; las antipodas suelen ser numerosas; en ciertos casos ocurre la apogamia. El fruto es un aquenio, a menudo prolongado superiormente en un pico o provisto de un vilano de naturaleza muy variada. La semilla es única y carece de albumen.

Comparada con algunas de las otras grandes familias, como la Leguminosae, el número de productos económicamente importantes derivados de la familia Compositae es relativamente pequeño. La investigación química realizada en años recientes ha incrementado el interés medicinal sobre esta familia y en la actualidad poseemos mejor conocimiento de muchos remedios populares casi abandonados, así como de plantas hasta hoy no investigadas. Entre

estas últimas están comprendidas algunas que poseen actividad antitumoral o antibacteriana y otras que constituyen fuentes comerciales de látex cauchífero.

### DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Tanacetum parthenium*

*Chrysanthemum parthenium* (L.) Berhn. (*Matricaria parthenium* L., *Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip.) Planta herbácea perenne, muy aromática al estrujarse, hasta de 80 cm de alto, pubérula en sus tallos más jóvenes, hojas e involucros, tallos más o menos ramificados, erectos, hojas bipinnatifidas, de contorno elíptico, hasta de 8 cm de largo, pecioladas; cabezuelas por lo general numerosas en panículas corimbiformes, sobre pedúnculos hasta de 8 cm de largo; involucreo subhemisférico, sus brácteas aproximadamente 50, las exteriores lineares, las interiores oblongas, hasta 4 mm de largo; receptáculo converso o hemisférico; flores liguladas 10 a 21 (o más en algunas cultivadas), sus corolas blancas, las láminas oblongas, de 2.5 a 8 mm de largo, de  $\pm 1.5$  mm de largo, sus corolas amarillas, tubulosas de  $\pm 1.5$  mm de largo; aquenios cilíndricos, de  $\pm 1.5$  mm de largo, provistos de 5 a 10 costillas, glabros, vilano en forma de corona diminuta. . Alt. 2250-2550 msnm Especie nativa de Europa, frecuentemente cultivada como medicinal y ornamental; a veces escapada acá y allá. Se le conoce popularmente como "Santa María" y "hierba de Santa María"(Rzedowski, 1985). Distribución en toda la república ya que es una planta introducida y solo se le encuentra cultivada (Martínez, 1979).

### ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y BIOLÓGICOS DEL GENERO *TANACETUM*

El género *Tanacetum* pertenece a la Familia Compositae, comprende aproximadamente 145 especies, distribuidas en Europa, Turquía, Rusia y América; muchos de los estudios fitoquímicos de *Tanacetum* se han abocado al estudio de los componentes de los aceites esenciales, en el análisis fitoquímico del aceite esencial de flores y hojas de *T. cilicium*, se aisló una serie de compuestos, tales como: monoterpenos hidrocarbonados y sesquiterpenos oxigenados (Thomas, 1989(D)), los aceites esenciales de esta especie demostraron propiedades antibacterianas contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Proteus* sp y *Salmonella* sp, en los

resultados, la comparación entre las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MICs) y los antibióticos de uso común fueron favorables para el aceite esencial (Thomas, 1989(A)). Para *T. corymbosum* se realizó un estudio fitoquímico similar del aceite esencial, encontrándose compuestos parecidos a los de *T. cilicium* junto con otros no terpenoides (Thomas, 1989(E)), pero sólo se reportaron propiedades anticoagulantes y antifibrinolíticas (Thomas, 1989(C)). De *T. argirophyllum* var *argirophyllum* se aislaron siete lactonas sesquiterpénicas y se demostró su actividad antibacteriana contra *S. aureus*, *B. megaterium*, *B. subtilis* y *E. coli* (Gören, 1990) A *T. densum* ssp *sivasicum* se le aislaron e identificaron lactonas sesquiterpénicas con actividad antibacteriana contra *B. subtilis* y *Klebsiella pneumoniae* y también se evaluó su actividad citotóxica (Gören, et al, 1992).

Entre las especies reportadas por los purépecha está *T. parthenium* que es conocida por los mismos como "aceitilla". A *T. parthenium* se le han realizado varios estudios fitoquímicos en los que se han encontrado los siguientes compuestos: en las estructuras glandulares de las hojas grandes concentraciones de lactonas sesquiterpénicas (Wijesekera, 1991), también se han aislado Crisantemina A y B, partenólido, resinosina, germacranólidos, guayanólidos y crisantemonina (Romo de Vivar, 1970), además de tres derivados del pineno y dos enol éter polinas espiroquetales (Bolhmann, 1982). Con respecto a sus características terapéuticas se ha reportado para el tratamiento de la migraña, con acción espasmolítica y una posible actividad antitrombótica (Wijesekera, 1991), en cuanto a su actividad antimicrobiana no hay estudios microbiológicos y fitoquímicos previos, sólo se encuentran reportes de su uso en enfermedades de origen bacteriano en diversas partes del mundo (Thomas, 1989(D)). En México, existen reportes del uso de *T. parthenium* como espasmolítico y digestivo (Lozoya, 1987) y también se utiliza la hoja como antidisentérico (Osuna, 1989). De acuerdo a la información proporcionada por la OMIP, esta planta es utilizada para el empacho, corajes y diarreas (J. G. Norberto, miembro de la OMIP).

## JUSTIFICACIÓN

El estudio de las propiedades antibacterianas de la flora utilizada de manera popular para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales se considera importante por los siguientes factores:

- Solo una pequeña parte de los recursos vegetales utilizados en la medicina tradicional, se ha estudiado desde el punto de vista químico-biológico (Romo de Vivar, 1985).

- Las diferentes etnias en México continúan utilizando plantas medicinales como parte de la medicina tradicional para el tratamiento de este tipo de enfermedades, por lo cual es importante evaluar si estas plantas presentan o no un efecto antibacteriano.

- Otro factor importante en la búsqueda de nuevos antibióticos, es que en especial las enfermedades del aparato digestivo son resultado en su mayoría de procesos infecciosos (Osuna, 1989). Las enfermedades gastrointestinales de origen bacteriano son la principal causa de morbilidad y mortalidad en México (INEGI, 1989).

- Se requiere de estudios químicos y microbiológicos básicos de las plantas para: a) aislar e identificar los componentes activos y b) estudiar las propiedades toxicológicas y farmacológicas de estos productos naturales.

- La resistencia desarrollada por los agentes patógenos a los antibióticos de uso terapéutico común, la resistencia se ha comprobado en casi todos los agentes patógenos del hombre, animales y plantas. En el hombre la *Entamoeba histolytica* y el *Treponema pallidum* son excepciones a los demás microorganismos patógenos ya que no se han descubierto cepas resistentes. (Kumate, 1981).

•Por último, por la crisis económica, los recursos vegetales del país deben de ser estudiados para afrontar carencias y costos de medicamentos que son cada vez más difíciles de adquirir para los sectores de bajos recursos de la población.

## OBJETIVOS

- 1) Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de *T. parthenium* en contra de las enterobacteriaceas *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Enterobacter agglomerans* y 4 cepas de la vibrionacea *Vibrio cholerae*.
- 2) Aislar e identificar, hasta donde sea posible, el o los principios activos presentes en *T. parthenium*.

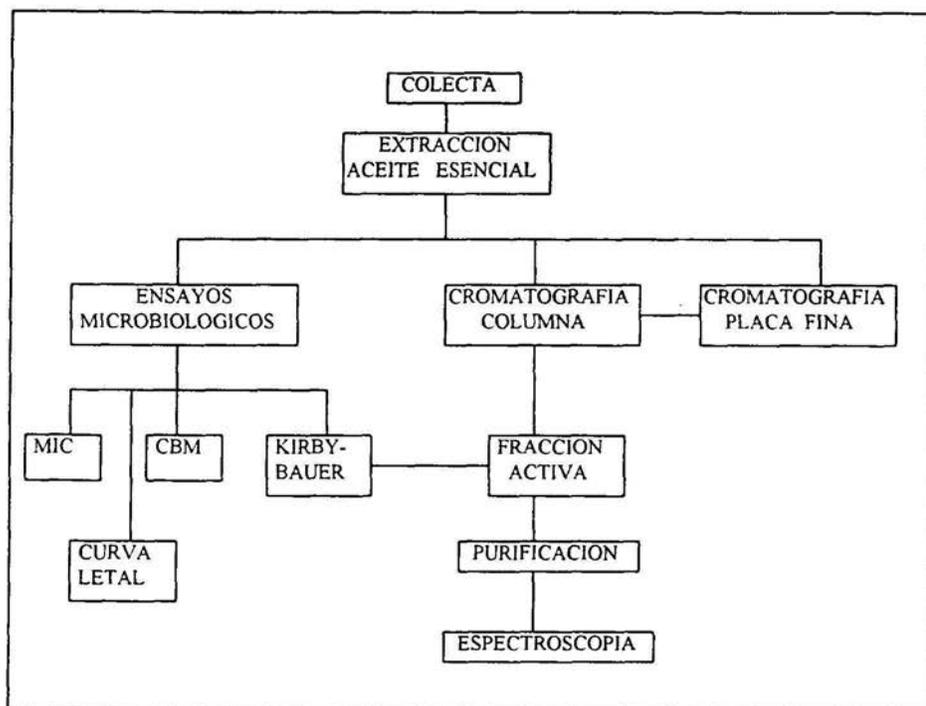


Figura 2.- Diagrama de flujo de la presente investigación, para mostrar la actividad antibacteriana y el aislamiento y elucidación del o los principios activos de *T. parthenium*.

## METODOLOGÍA

### 1) Colecta

La colecta de los ejemplares de *T. parthenium* se realizó en el jardín botánico del Palacio de Huitziméngari, en la ciudad de Pátzcuaro, Estado de Michoacán, en las coordenadas 101° 36' de longitud Oeste y 19°31' de latitud Norte, a una altitud de 2100 msnm (Carta topográfica E-14-A-22, Cetenal, 1979), el suelo está clasificado como lavisol crómico, litosol (Carta Edafológica E-14-A-22, Detenal, 1979) y lecho de basalto (Carta Geológica E-14-A-22, Detenal, 1978). El clima es del tipo (W2)(W) (Köppen) que corresponde a templado subhúmedo con lluvias de verano y un porcentaje de precipitación invernal menor al 5% (Carta de Climas Guadalajara, Coordinación General de los Servicios Nacionales de Estadística, Geografía e Informática, 1973). La identificación de los ejemplares la llevó a cabo la bióloga Edith López Villafranco, miembro del Herbario Izta de la UNAM Campus Iztacala.

### 2) Extracción del aceite esencial

Para la extracción del aceite esencial de *T. parthenium* fue utilizado el método de destilación por arrastre de vapor, a partir de tallos, hojas y flores lo más frescas posible (apéndice I).

### 3) Bioensayos

Para realizar los bioensayos se utilizó la siguiente metodología:

a) Método de difusión en agar o de Kirby-Bauer. (Ensayo cualitativo) (apéndice II).

b) Método de Dilución en Caldo. (Ensayo cuantitativo) para la obtención de la Concentración Bactericida Media (CBM) y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (apéndice III).

c) Curva letal: Método adicional para evaluar el efecto letal de un antimicrobiano contra un microorganismo dado (apéndice IV).

Los microorganismos utilizados en la investigación fueron las siguientes cepas de bacterias: *Escherichia coli* ATCC25922, *Salmonella thyphi* ATCC19430, *Shigella boydii* ATCC8700, *Enterobacter agglomerans* del cepario del Departamento de Microbiología de la UNAM FES Cuautitlan y las siguientes cepas de *Vibrio cholerae* donadas por el proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente de la UNAM Campus Iztacala; *V. cholerae* cc (aislada de un caso clínico), *V. cholerae* 01 (aislada de agua contaminada), *V. cholerae* CDC V12 (cepa de catálogo) y *V. cholerae* NO-01 donada por el Centro de Investigación y Estudio sobre la Calidad del Agua (CIECA) dependiente de la SARH. En esta investigación la cepa aislada de agua la nombramos 01, la de caso clínico cc, la de catálogo El Tor y la donada por el CIECA, NO-01.

#### 4) Estudio químico

Por razones propias de esta investigación, en cada fase del aislamiento se llevaron a cabo las pruebas microbiológicas de seguimiento que nos permiten separar con certeza el o los principios activos. Básicamente, el aislamiento de los compuestos activos consta de dos fases: la extracción de la planta descrita anteriormente y la separación de los componentes.

##### a) Separación y aislamiento.

Una vez evaluado el potencial antimicrobiano del aceite esencial, se separaron los componentes por medio de cromatografía de placa fina (cromatofolios Al de silicagel 60 con espesor de capa 0.2 mm) utilizando como marcadores al Borneol, Cineol y Eugenol para evaluar si en el aceite esencial existían estos componentes antisépticos o compuestos relacionados que dieran una noción de los componentes de la mezcla, con el objeto de establecer la fase móvil y la fase estacionaria para llevar a cabo la separación y la obtención de fracciones mediante cromatografía de columna.

El sistema usado en la separación por cromatografía en columna fue el siguiente: muestra de 4 ml de aceite esencial, fase móvil de Hexanos-Acetato de Etilo 9:1 v/v; fase estacionaria Silica gel de malla 70-230; longitud de columna 1.5 m; diámetro de la columna 2.5 cm.

b) Elucidación de la estructura.

La elucidación se llevó a cabo por medio de las siguientes pruebas: medición del punto de fusión en un aparato Fisher-Johns, obtención del espectro del ultravioleta al visible y obtención del máximo de absorción en un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP 8450A UV/VIS y obtención del espectro de masas de uno de los compuestos activos en un espectrómetro de masas Hewlett-Packard modelo 0504.

## RESULTADOS

### 1.- Estudio de campo.

En la siguiente tabla se presenta los datos etnobotánicos de *Tanacetum parthenium*, obtenidos mediante entrevistas con los miembros de la Organización de Médicos Indígenas Purépecha (OMIP) (Figura 3)

<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip Nombre común: Santa María, Aceitilla Colector: J. Guillermo Avila Acevedo Lugar de colecta: Jardín Botánico, Palacio de Huitziméngari, Pátzcuaro, Michoacán Usos: Para el empacho, corajes, diarreas Parte usada: Hojas y tallos Preparación: Infusión, 30-70 g de hojas-tallos en 500 ml de H <sub>2</sub> O Forma de uso: Infusión Colecta: Planta perenne. floración en época de lluvias, colecta de Junio a Octubre
---

Figura 3.- Sumario Etnobotánico de *T. parthenium*.

### 2.- Bioensayo preliminar.

De acuerdo a los antecedentes y a la información etnobotánica proporcionada por la OMIP, se consideró que era alta la probabilidad de que el o los principios activos se encontraran en el aceite esencial, por lo que se procedió a su extracción mediante la técnica por arrastre de vapor exhaustivo. El rendimiento fue bajo ya que de 400 g de *T. parthenium* se extrajeron 0.3 ml  $\pm$  20  $\mu$ l de aceite esencial, lo que es un rendimiento de 0.05 %. Para poder obtener el suficiente aceite esencial para las fases posteriores de la investigación, se sometieron a arrastre de vapor aproximadamente 10 Kg de *T. parthenium* y se extrajo un total aproximado de 7 ml de aceite.

Se realizaron tres bioensayos con la finalidad de evaluar la actividad antibacteriana del aceite esencial mediante la técnica de difusión en agar. La media de los resultados se muestra en la Figura 4.

Figura 4.

EFFECTO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL

	MICROORGANISMOS PROBLEMA *, **						
[ ]	<i>E.c.</i>	<i>S.b.</i>	<i>E.a.</i>	<i>S.t.</i>	<i>V.c.</i> 01	<i>V.c.</i> tor	<i>V.c.</i> cc
10 µl	12.3	16	10.6	12	17.6	35.6	11.5
20 µl	14.3	17.5	12	12.6	20.6	+35	13
30 µl	19	20	13.3	15.6	25.6	+35	17
C <sup>+</sup>	21	20	16	19	22	25	20

\* Clave: *E. c.* *Escherichia coli*; *S. b.* *Shigella boydii*; *E. a.* *Enterobacter agglomerans*; *S. t.* *Salmonella typhi*; *V. c.* *Vibrio cholerae*, 01 agua contaminada, tor catálogo, cc, caso clínico.

\*\* halos de inhibición en mm.

C<sup>+</sup>: control positivo: discos con 30 µg de kanamicina

[ ] Concentración en µl/cilindro

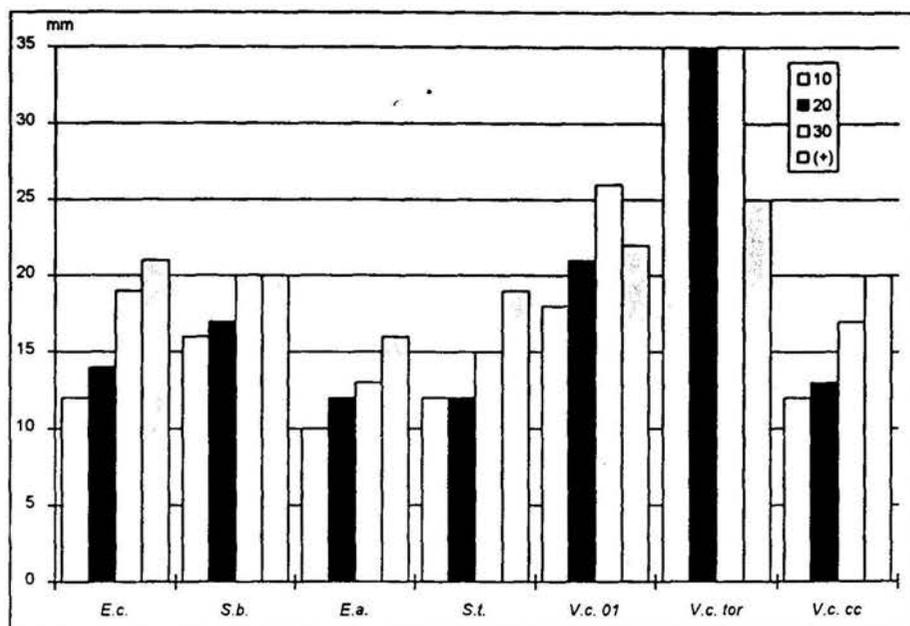


Figura 5.- Gráfica de las medias aritméticas del aceite esencial

Como se muestra en los resultados de la figura 5, los aceites esenciales poseen actividad antibacteriana, la cual en algunos casos fue mayor a la del control positivo, además es evidente que la actividad aumenta con la concentración utilizada.

### 3.- Evaluación cuantitativa.

Para la evaluación de la efectividad del aceite esencial, se procedió a realizar un bioensayo cuantitativo del efecto bactericida, de acuerdo al método de dilución en caldo para calcular la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Media (CBM), el medio utilizado fue medio caldo Mueller-Hinton con un inóculo de  $3 \times 10^8$  Bac/ml (#1 de Mc Farland). Cada uno de los bioensayos se hizo por triplicado, en la figura 6 se muestran las medias de los mismos.

Figura 6.

EVALUACION DEL EFECTO BACTERICIDA DEL ACEITE ESENCIAL

	MICROORGANISMOS PROBLEMA							
	<i>E.c.</i>	<i>S.b.</i>	<i>E.a.</i>	<i>S.t.</i>	<i>V.c. 01</i>	<i>V.c. tor</i>	<i>V.c. cc</i>	<i>V.c. NO-01</i>
CMI*	10.6	32	10.6	16	4	4	6.6	8
CBM*	16	37.3	13.3	21.3	8	5.3	16	8

\* Concentraciones en  $\mu\text{l}/2\text{ml}$

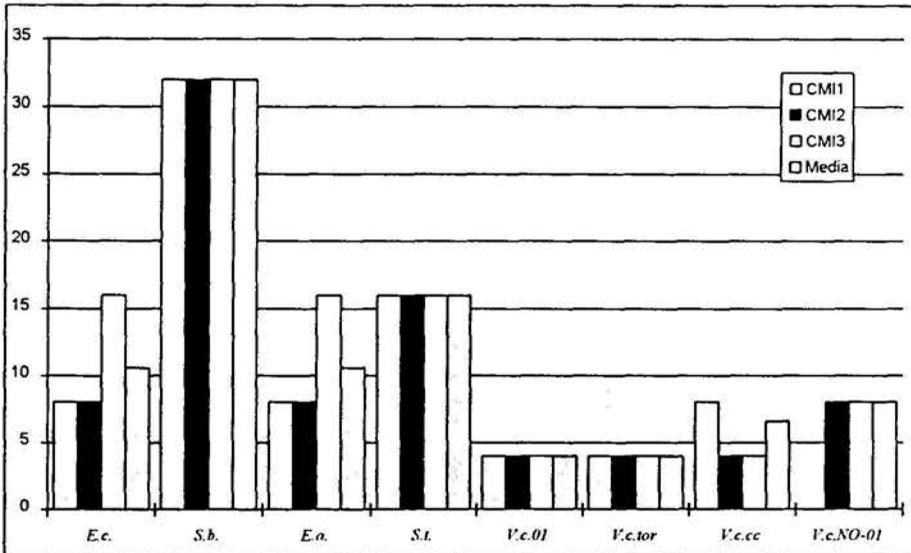


Figura 7.- Gráfica de las medias de la CMI del aceite esencial.

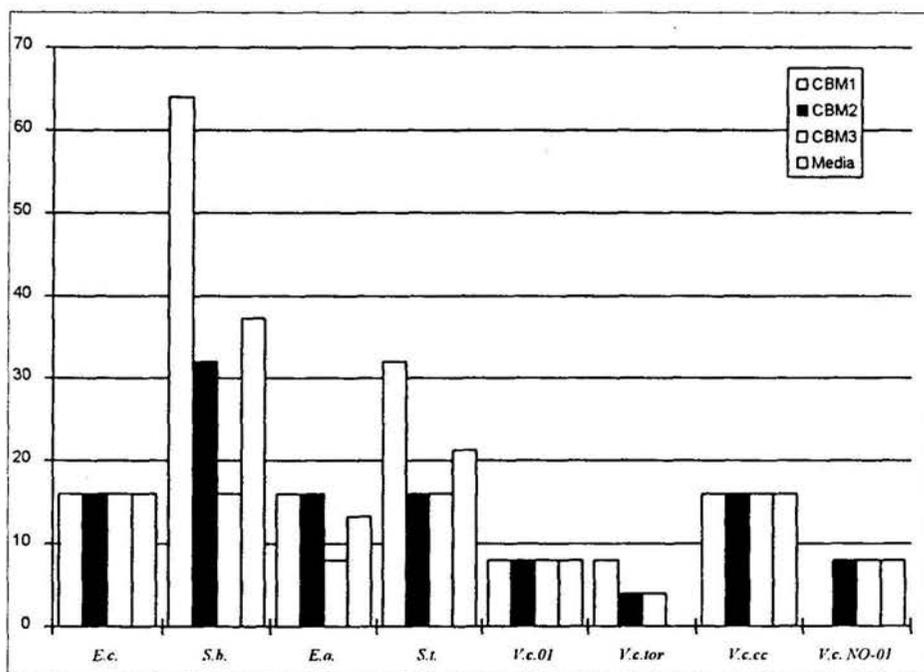


Figura 8.- Gráfica de las medias de la CBM del aceite esencial.

#### 4.- Curva de supervivencia o mortal.

Para determinar el tipo de cinética de muerte que produce el aceite esencial sobre *E. coli*, se procedió a realizar el bioensayo con *E. coli* para la obtención de la curva mortal, con los datos del bioensayo se realizó una regresión lineal para indicar el tipo de cinética de mortalidad que se presenta, el gráfico representa el resultado de la curva mortal (figuras 9 y 10).

Figura 9.  
RESULTADOS DE LA CURVA MORTAL

Tiempo (hr)	# de bac/ml ( <i>E. coli</i> )	Tiempo (hr)	Regresión (bac/ml)
T <sub>0</sub>	8.5 X 10 <sup>9</sup>	T <sub>0</sub>	24 X 10 <sup>9</sup>
T <sub>1</sub>	4.6 X 10 <sup>9</sup>	T <sub>1</sub>	74 X 10 <sup>7</sup>
T <sub>2</sub>	25.5 X 10 <sup>6</sup>	T <sub>2</sub>	23 X 10 <sup>6</sup>
T <sub>3</sub>	1.5 X 10 <sup>5</sup>	T <sub>3</sub>	73 X 10 <sup>4</sup>
T <sub>4</sub>	4.5 X 10 <sup>4</sup>	T <sub>4</sub>	23 X 10 <sup>3</sup>

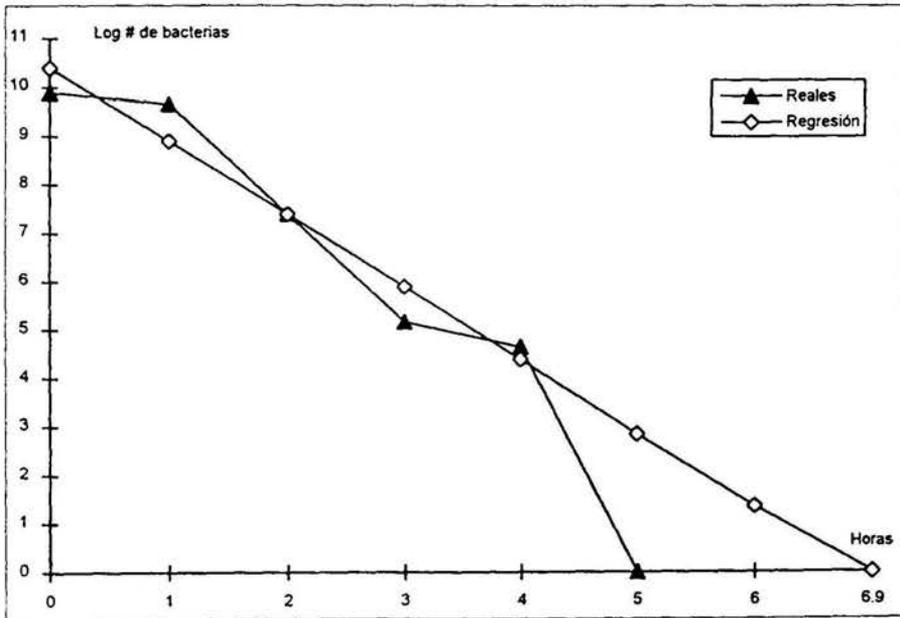


Figura 10.- Gráfica de la actividad del aceite esencial por medio del método de curva letal.

### 5.- Aislamiento del principio activo.

Para determinar el número probable de componentes del aceite esencial se realizó una cromatografía de placa fina en la cual se observaron 9 manchas, la figura 11 muestra los Rf de cada mancha (fase móvil: Hexanos-Acetato de Etilo 9:1 v/v, fase estacionaria: sílica gel).

Figura 11.  
RF DE LAS FRACCIONES DEL ACEITE ESENCIAL.

Fracción	Rf	Rf de marcadores
1	0.39	0.24 Eugenol
2	0.48	0.40 Borneol
3	0.52	0.47 Cineol
4	0.57	
5	0.61	
6	0.64	
7	0.69	
8	0.92	
9	0.97	

La separación de los componentes se hizo por cromatografía en columna de la cual se obtuvieron 8 fracciones y a cada una de las fracciones les fue evaluada la actividad antimicrobiana mediante la técnica de Kirby-Bauer (Figura 12).

Figura 12.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS FRACCIONES DEL ACEITE ESENCIAL

Fracción*	<i>E.c.</i>	<i>S.b.</i>	<i>E.a.</i>	<i>S.t.</i>	<i>V.c.</i> 01	<i>V.c.</i> tor	<i>V.c.</i> cc
1	--	-	-	-	-	-	-
2*	11	9	-	12	13	11	-
3Ø	15	11	9	13	20	15	15
4*	-	-	-	-	-	-	-
5*	-	-	-	-	-	-	-
6Ø	-	-	-	-	-	-	-
7Ø	-	-	-	-	-	-	-
8*	-	-	-	-	-	-	-
(+)	21	20	16	19	22	25	20
(-)	-	-	-	-	-	-	-

Clave: (+) Control positivo: Kanamicina 30 µg, (-) Control negativo: alcohol 30%, ØAceite, \*Cristales: Dosis \* 30 µg/ml, Ø µl/ml.

Como se observa en la figura 12, es evidente que la fracción con actividad antimicrobiana contra todas las especies y cepas de organismos es la fracción 3, aunque la actividad biológica de esta fracción es menor que la del control positivo, se consideró significativa. La F3 cristalizó de la fase móvil (Hexanos- Acetato de Etilo,9:1 v/v) y se procedió a determinar su pureza en cromatografía de placa fina utilizando como eluyente Hexanos. En este caso se observaron 2 manchas, una azul (cristales) y otra amarilla (aceite). Los cristales de la F3 se sometieron a una separación en cromatografía de columna.

A las dos fracciones procedentes de la F3 se les determinó su actividad antimicrobiana contra todas las bacterias. La evaluación de estas dos fracciones se muestran en la siguiente tabla.

Figura 13.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS FRACCIONES DE LA  
FRACCION 3

[ ]*	<i>E.c.</i>	<i>S.b.</i>	<i>E.a.</i>	<i>S.t.</i>	<i>V.c.</i> 01	<i>V.c.</i> cc	<i>V.c.</i> tor	<i>V. c.</i> NO
Cristales	13	12	16.5	17	19.5	15.5	14.5	16.5
Aceite	-	-	-	-	-	-	-	-
C <sup>+</sup>	19	21	22	17	15.5	15.5	16.	15.5
C <sup>-</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Concentraciones: Aceite 30  $\mu$ l, Cristales 30  $\mu$ g, C<sup>+</sup> Control positivo: Kanamicina 30  $\mu$ g y C<sup>-</sup> Control negativo: Alcohol al 20%.

6.- Elucidación de la estructura.

La fracción activa (cristales), sublimó a temperatura ambiente, y tiene un punto de fusión de 180 °C, su espectro ultravioleta (en CHCl<sub>3</sub>) presentó un máximo de absorción a 295 nm como se observa en la figura 14. El compuesto fue sometido a análisis de espectrometría de masas, y el espectro obtenido se comparó con los espectros de la biblioteca integrados al equipo de gases-masas y coincide en un 100% con el reportado para el Biciclo (2.2.1) heptano-2-1, 1,7,7-trimetil (alcanfor) y también con el reportado en la bibliografía (Mills III & Roberson, 1987), los resultados se encuentran en las figuras 15 y 16.

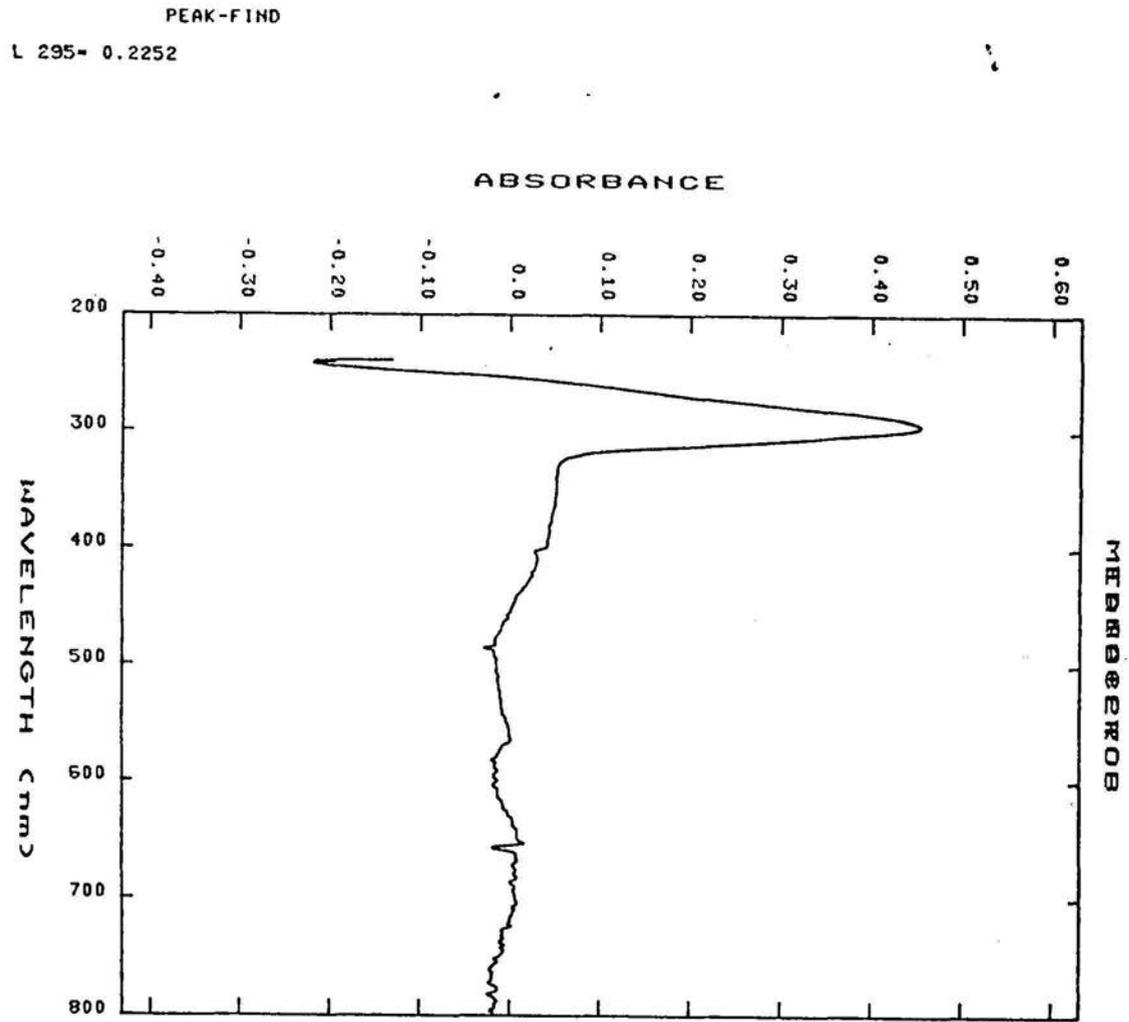


Figura 14.- Espectro UV de la fracción activa.

Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl- (9CI)

FRN: 3003 LSN: 496 [NBS 6255.] MW 152 C10H16O

CAS: 0000076222 EPA: 0000004829 QUAL INDX: 680

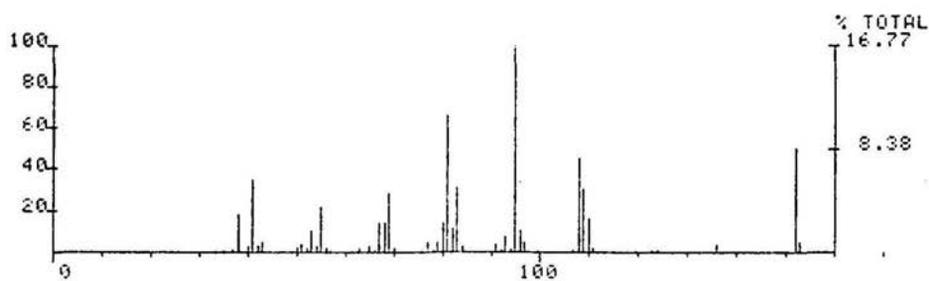


Figura 15.-Espectro de masas de la fracción activa.

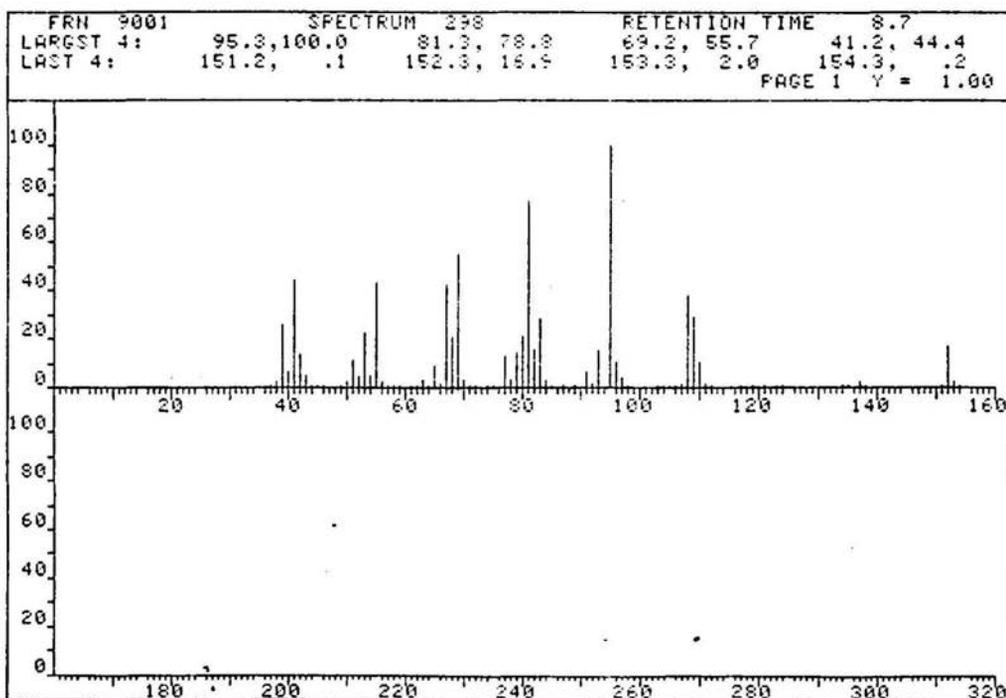


Figura 16.- Comparación de la información contenida en el espectrómetro de masas, con lo que se confirma que la fracción 3 es alcanfor.

Se compararon los resultados del compuesto activo procedente de la F3 con los datos del Index Merck para el alcanfor, cuyas características se presentan en el siguiente cuadro.

---

#### CARACTERISTICAS DEL ALCANFOR\*

---

Estructura: Cetona dextrógira  $C_{10}H_{16}O$

Sublima a temperatura ambiente, Punto de fusión de 179.5 °C,

Máxima absorción UV a 292 nm

Fuente: *Cinnamomum camphora* (Taiwan, Japón y sur de China)

Acción en el Aparato digestivo: En el intestino disminuye la contractilidad de los músculos estriados y lisos, pero los compuestos solubles del alcanfor actúan en sentido contrario.

Usos: Externamente como rubefaciente, tópico, antiséptico y resolutivo y por vía interna como antiséptico, carminativo, antipirético y anafrodisiaco

---

\* Tomado de San Martín, 1977, Tyler, 1976, Evans, 1991 y Index Merck.

## DISCUSION

El aceite esencial de *T. parthenium* presenta actividad antibacteriana y esto coincide con la información etnobotánica proporcionada por la OMIP, así como los estudios previos de Thomas (1989) con otras especies de *Tanacetum*.

En la tabla de la Figura 4, la especie que mostró más susceptibilidad fue *V. cholerae* en dos de sus cepas, de las cuales la de mayor sensibilidad fue la cepa de catálogo (CDCV12), que en las tres concentraciones fue superior a la del control positivo, la otra cepa sensible de *V. cholerae* fue la cepa 01 (aislada de agua) en la concentración de 30  $\mu$ l de aceite esencial. Por otra parte *E. agglomerans* demostró ser la bacteria menos sensible al aceite. En los demás organismos, sólo en la mayor concentración de aceite se observó actividad antimicrobiana similar a la del control positivo. Los diferentes grados de sensibilidad presentados por las especies y cepas utilizadas pueden tener como origen una sensibilidad del tipo intrínseco, es decir, que es una característica innata compartida por la mayoría de los miembros de una especie en el espectro genético primigenio previo a la intervención generalizada de quimioterápicos y antibióticos (Guiney, 1986), de acuerdo a lo mencionado con anterioridad, las distintas sensibilidades de las especies utilizadas en los bioensayos, se pueden considerar como intrínsecas con las excepciones de las cepas de *V. cholerae* cc y 01, que al ser cepas de origen clínico, han estado expuestas a presiones ambientales, por lo que su menor sensibilidad al aceite esencial podría haberse desarrollado por mecanismos de adaptación (Guiney, 1986) y el factor que más influye en las diferentes sensibilidades es el de las presiones ambientales.

Para evaluar la efectividad del aceite esencial como antimicrobiano se deben de considerar los siguientes aspectos: 1) las bacterias patógenas se pueden dividir en invasoras y no invasoras, ya que existe una diferencia significativa en la concentración de organismos necesaria para iniciar la infección, 2) la CMI y la CBM del aceite esencial, 3) la cantidad de aceite esencial en la infusión, y la forma de uso, 3) la velocidad y cuantía de la absorción en la zona de aplicación

4) la velocidad y cuantía de la distribución hística; 5) el ritmo de biotransformación en metabolitos activos o inactivos, y 6) el ritmo de excreción. De acuerdo a los factores antes mencionados sería difícil correlacionar el efecto que tienen los aceites esenciales *in vitro* e *in vivo*. Lo que se elucidó en el presente estudio fue que la infusión que utilizan los purépecha hecha a partir de *T. Parthenium* contiene aceites esenciales y que estos a su vez contienen al menos un componente activo que puede inhibir el crecimiento de bacterias patógenas del tracto gastrointestinal, este efecto coadyuvaría junto con el sistema inmunológico al mejoramiento de las personas que utilizan esta planta para el tratamiento de este tipo de infecciones, pero para poder afirmar lo anterior se requiere de la realización de estudios *in vivo* y de farmacocinética.

Por otra parte, aunque se demostró que el compuesto puro (alcanfor) presenta actividad antimicrobiana, no se puede afirmar que sólo este compuesto sea el responsable de la actividad biológica ya que por sí sólo su actividad antimicrobiana fue menor que la del control positivo (kanamicina) (figura 12), por lo que es posible suponer que la mezcla de compuestos presentes en el aceite esencial puede producir fenómenos de sinergia positiva o negativa. En cuanto a los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida media (CBM) de los aceites esenciales (figuras 7 y 8) se puede observar que en la mayoría de los casos están muy cercanos unos a otros para cada especie bacteriana (a excepción de *V. Cholerae* cc cuya CBM es el doble de concentración de la CMI), esto quiere decir que la cantidad de aceite necesario para inhibir y para matar está muy cercana. En la curva letal de acuerdo a la definición de muerte de un organismo que dice: La inactivación o muerte de un microorganismo viene dada por su incapacidad para dar origen a un nuevo ser; este efecto es el resultado de una serie de reacciones químicas. Las curvas nombradas de impacto múltiple son como la curva del presente estudio, estas curvas se inclinan cerca de su origen, antes de adoptar una dirección lineal, ya que antes de que se produzca la inactivación es necesario que se acumulen varios cambios (impactos) en una especie determinada. El número de impactos se determina extrapolando la parte recta de la curva y la ordenada al origen determina el número de impactos en unidades logarítmicas (Davis, 1982). De

acuerdo a lo anterior y realizando una regresión lineal para poder llevar a cabo una extrapolación, el número de impactos que necesita el aceite esencial para inactivar a *E. coli* es de 3.

Al realizar la comparación de los resultados de las pruebas químicas con los datos contenidos en el Index Merck para el alcanfor, se puede observar que la fracción activa presenta sublimación a temperatura ambiente al igual que el alcanfor, con respecto al punto de fusión la diferencia existente de 0.5 °C entre el resultado de laboratorio y el reportado en la bibliografía se debe a que el equipo donde se llevaron a cabo las pruebas no tiene la precisión para medir hasta 0.5 °C y por último la diferencia en la absorción UV es posiblemente causada por alguna impureza ya que la fracción se obtuvo de un extracto de origen vegetal y es de extrema dificultad lograr durante el proceso de purificación un compuesto con un grado de pureza del 100%.

La fracción activa también fue sometida a espectrometría de masas, que junto con las demás pruebas permitió elucidar que el principio activo es el Biciclo (2.2.1) heptano-2-1, 1,7,7-trimetil (alcanfor).

## CONCLUSIONES

- ◇ Hay actividad antibacteriana de *T. parthenium* en el aceite esencial obtenido a partir de tallos, hojas y flores.
- ◇ El aceite esencial de *T. parthenium* demostró actividad antibacteriana contra cada una de las especies con las que fue evaluado.
- ◇ Uno de los principios activos presente en el aceite esencial de *T. parthenium* es el alcanfor.
- ◇ El alcanfor es menos activo que el control positivo utilizado.
- ◇ El aceite esencial de *T. parthenium* es más eficiente que el alcanfor sólo, por lo que se sugiere continuar con el estudio en el supuesto de que podría existir sinergia de varios componentes, lo que explicaría la eficacia del aceite esencial como antimicrobiano.



## II.- Método de difusión en agar o de Kirby Bauer.

El método de difusión en agar se ha estandarizado con agar Mueller-Hinton. El medio recién preparado se vierte en placas de Petri sobre una superficie horizontal uniforme para alcanzar una profundidad aproximada de 4 mm; esto requiere aproximadamente de 25 a 30 ml en placas de 100 mm de Ø. Después de dejar enfriar el medio a temperatura ambiente, debe guardarse en refrigeración (de 2 a 8 °C). Inmediatamente antes de usarlas, las placas deben colocarse en una incubadora (35 °C) con las tapas entreabiertas, hasta que el exceso de humedad superficial en el medio de cultivo se evapore (generalmente de 10 a 20 minutos).

Inoculación de las placas: Método estándar, con una aguja o asa de inocular se toca cada una de cuatro o cinco colonias de una placa de crecimiento de la cepa a utilizar bien aisladas del mismo tipo morfológico y se inoculan en 4 a 5 ml de medio caldo. Los cultivos de caldo se dejan incubar a 35 °C hasta que aparece una turbidez ligera (generalmente de 2 a 5 horas). La turbidez de cultivos de caldo en crecimiento activo se ajusta entonces con solución fisiológica o caldo para obtener una turbidez visualmente comparable al estándar de Mc Farland. Cuando el tiempo no permite desarrollar un cultivo de caldo turbio, pueden suspenderse directamente en un pequeño volumen de solución salina colonias aisladas de una placa de 18 horas, la solución salina con los microorganismos se diluye hasta que la turbidez sea igual al estándar #1 de Mc Farland, el cual se prepara con 0.5 ml de solución de  $\text{BaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  al 1.175% más 99.5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 1%, que es equivalente a  $3 \times 10^8$  bacterias/ml.

15 minutos después de inocular, son aplicados con pinzas estériles, cilindros USP sobre la superficie de las placas inoculadas en cuyo interior se van a vaciar las diferentes concentraciones del antimicrobiano. Los cilindros deben colocarse suavemente sobre el agar con una pinza para asegurar la difusión total del antimicrobiano en la superficie. La disposición espacial de los cilindros debe ser tal que no estén a menos de 15 mm de los bordes de la placa y lo bastante separados entre sí para impedir la superposición de las zonas de inhibición. Generalmente esto

limita el número de cilindros que pueden colocarse de 12 a 13 sobre una placa de 150 mm y sólo 4 ó 5 en una de 100 mm. A los 15 minutos de aplicar los cilindros las placas se colocan en una incubadora a 35 °C. Cualquier demora mayor antes de la incubación permite excesiva difusión previa del antimicrobiano.

Después de 16 a 18 horas de incubación, las placas se examinan, se miden los diámetros de las zonas de inhibición total en mm <sup>(Barry, 1987)</sup>. Cuando fueron evaluadas las fracciones insolubles en agua, se utilizó como solvente etanol al 20 o al 30 % para disolver los compuestos o aceites y estas mismas soluciones se usaron como controles negativos.

Para encontrar el control positivo adecuado se hizo un antibiograma con discos de 5 mm para gram negativas (marca Bigaux) con los siguientes antibióticos; Ampicilina 10 µg, Cefalotina 30 µg, Cloranfenicol 30 µg, Acido Nalidixico 30 µg, Carbenicilina 100 µg, Nitrofurantoina 300 µg, Gentamicina 10 µg, Cefotaxina 30 µg, Amikacina 30 µg, Tetraciclina 30 µg, Trimetroprim Sulfametoxazol 30 µg y Kanamicina 30 µg y fue esta última la que presento la mejor actividad en relación a los demás antibióticos, de acuerdo con las tablas sobre resistencia a antibióticos propuesta por la Sociedad Americana de Microbiología <sup>(Barry & Thomsberry 1987)</sup>.

### III.- Método de dilución en caldo.

La solución antimicrobiana de trabajo se prepara diluyendo la droga en caldo de Mueller-Hinton a la mayor concentración deseada. La prueba se realiza en tubos de ensaye de 13 X 100 mm con tapa de rosca o con tapones de algodón. Se colocan 2 ml de solución de trabajo de la droga en una serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añade 1 ml de caldo Mueller-Hinton. Inoculación e incubación de los tubos. Se prepara un inóculo que contenga  $10^8$  UFC/ml ajustando la turbidez a un caldo de cultivo estándar de turbidez (estándar #1 de Mc Farland) y diluyendo luego a 1:200 en caldo. Añadir a cada tubo 1 ml del inóculo ajustado. Incubar a 35 °C durante 16 a 20 horas.

Interpretación de resultados: La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible, representa la MIC, en la concentración en donde no se encuentren unidades formadoras de colonias, se consideró como la CBM, una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo posible generalmente no se consideran evidencia de que la droga ha sido capaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración (Jones, 1987).

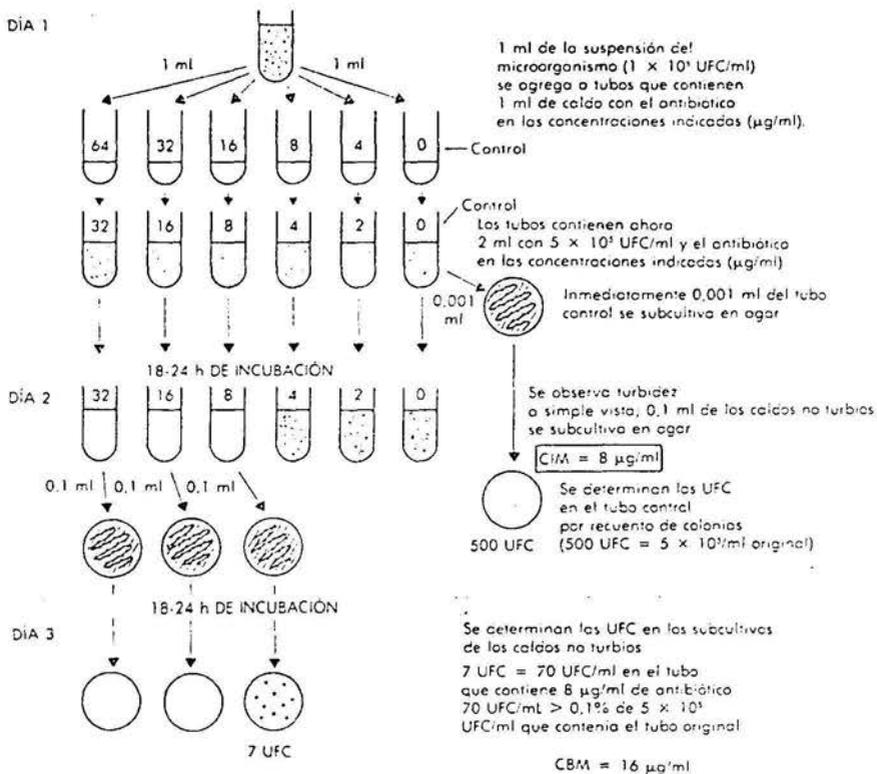


Figura 18.- Diagrama del método de dilución en caldo (Finegold y Baron, 1989)

#### IV.- Método de la curva letal.

La prueba de la curva letal se efectúa en tubos de vidrio, cada uno con 10 ml de medio caldo (caldo MH) y la concentración elegida del antimicrobiano a ensayar.

Para un proceso de 12 horas, con conteo de organismos sobrevivientes cada hora, la metodología es la siguiente:

1.- Preparar y rotular por lo menos un tubo con antibiótico para cada muestreo.

2.- Utilizar un tubo sin antibiótico como control de desarrollo.

3.- Preparar el inóculo con una concentración de  $3 \times 10^8$  bac/ml (#1 de Mc Farland).

4.-Las inoculaciones y diluciones para cada muestreo son de la siguiente forma: se toma 0.1 ml del problema y se diluyen con 9.9 ml de Solución Salina Fisiológica (SSF), se agita y se toma 0.1 ml de esta solución y se diluyen en 9.9 ml de SSF y se repite el proceso.

5.-Se toman 3 ml de cada dilución y se preparan 3 placas en agar nutritivo cada una con 1 ml de dilución. El número de colonias es igual a número de células  $\times 10^7$ . El proceso anterior es para cada muestreo.

6.-Representar el recuento de células en papel semilogarítmico (Barry & Thomsberry, 1987).

## BIBLIOGRAFIA

Avila Acevedo, J.G., Muñoz López, J.L. and Martínez Cortes, G., 1993., *In Vitro* Antimicrobial Activity of Various Plant Extracts used by Purepecha against some Enterobacteriaceae., *Int. J. Pharmacognosy*, 31 (1):1-4

Aye-Than, H.J., Kulkarni, Wut Hmone and S.J. Tha., 1989., Antidiarrhoeal Efficacy of Some Burnese Indigenous Drug Formulations in Exprimental Test Models., *Int. J. Crude Drug Res.*, 27 (4):195-200

Barry, A.L. y Thornsberry, C., 1987., Pruebas de susceptibilidad: Técnicas para pruebas de difusión. En :Manual de Microbiología Clínica. Lennette, Edwin H., Bulows, Albert, Hausler, William J. y Shadomy, H. Jean, Editores., 4ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Bieber, Lothar W., Alves Da Silva Filho, Alvaro, Corrêa Lima, Rosália M.O. & de Andrade Chiaeta, Alda., 1986., Anticancer and Antimicrobial Glycosides from *Ipomea bohiensis*., *Phytochemistry* 25 (5):1077-1081

Bohlmann, Ferdinand & Zdero, Christa., 1982., Sesquiterpene Lactones and Other Constituents from *Tanacetum parthenium*., *Phytochemistry*, 21 (10):2543-2549

Brock, Thomas D., 1978., Biología de los microorganismos., 2º Ed. Ediciones Omega, Barcelona, España

Cavallito, R. & Bailey, J., 1944., An antibacterial Principles of Garlic *Allium sativum*., *J. Am. Chem. Soc.* 66:1950

Davis, Bernard D., Dulbecco, Renato, Eisen, Herman N., Ginsberg, Harold S., Wood, W. Barry & McCarty, Maclyn., 1982., Tratado de Microbiología., 2ª Ed. Ed. Salvat., Barcelona, España

Dekukeilere, V., 1970., Absolute configuration and structure of Humulene and Antibiotic constituent of hops., *Tetrahedron* 26:385

Domínguez, Xorge Alejandro., 1973., Métodos de Investigación Fitoquímica., Ed. LIMUSA, México

El-Sayed, Ali M. & Al-Yahya, M. A., 1989., Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Chenopodium botrys* Growing in Saudi Arabia., *Int. J. Crude Drug Res.*, 27, (4)

Evans, William Charles., 1991., Farmacognosia., 13 Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill., México

Freeman, Bob A., 1989., Microbiología de Burrows., 22º Ed. Interamericana Mc Graw-Hill., México

Finegold, Sidney M. y Baron, Ellen Jo., 1989., Diagnóstico microbiológico., 7ª Ed. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina

Garrod, Lawrence P., 1985., Antibiótico y Quimioterapia., Salvat Editores, México

Gören, Nezhun, Jakupovic, Jasmin & Topal, Seminur., 1990., Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum argirophyllum* var *argirophyllum*., *Phytochemistry*, 29 (5):1467-1469

Gören, Nezhuan., Bozok-Johansson, Candan, Jakupovic, Jasmin, Lin, Lee-Juain, Shieh, Hui-Ling, Cordell, Geoffrey A. & celik, Necatil., 1992., Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum densum* ssp *sivasicum*., *Phytochemistry* 31 (1):101-104

Gottlieb, D. P. & Shaw, P., 1967., *Antibiotics*., Springer Verlag, Editions. New York. USA

Guiney, Donald G., 1986., Resistance to antimicrobial drugs., en *Infectious Diseases and Medical Microbiology*., Braude, Abraham I, Davis, Charles E. & Ferrer, Joshua, Editores., 2nd ed. W.B. Saunders Company., Philadelphia, USA

Hamburger, Mathias & Hostettmann, Kurt., 1991., Bioactivity in Plants: The Link Between Phytochemistry and Medicine., *Phytochemistry*, 30 (12):3864-3874

INEGI., 1989., Información Estadística Sector Salud y Seguridad Social. Cuaderno 6., México

Jensen, Marcus M., 1987., *Introducción a la Microbiología Médica*., Prentice-Hall Hispanoamericana. México

Joklik, Wolfgang K., 1986., *Zinsser Microbiología*., 18° Ed. Ed. Médica Panamericana., Buenos Aires, Argentina

Jones, Ronald. N. Barry, Arthur L., Gavan, Thomas L. & Washington II, John A., 1987., Pruebas de susceptibilidad: Técnicas de microdilución en caldo., En *Manual de Microbiología Clínica*. Lennette, Edwin H., Bulows, Albert, Hausler, William J. y Shadomy, H. Jean, Editores., 4° Ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Khan, Khalid A. & Shoeb, Aboo., 1984., Two Antimicrobial Biphenyls from *Rhynchosia suaveolens*., *Phytochemistry*, 4 (23):765-766

Kasai, Shizuo, Watanabe, Sakaya, Kawabata, Jun, Tahara, Satoshi & Mizutami, Junya., 1992., Antimicrobial catechin derivatives of *Agrimonia pilosa*., *Phytochemistry* 31 (3):787-789

Konishi, Kiyoshi, Adachi, Hirokazu, Kita, Kiyoshi & Horikoshi, Isamu., 1987., Inhibitory effects of tannic acid on the respiratory chain of *Photobacterium phosphoreum*., *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 35 (3): 1169-1175

Kubo, Y., 1993., Antimicrobial Activity of Green tea Flavor Components., En *Biactive Volatile Compounds from Plants*. Teranishi, Roy, Buttery, Ron G. y Sugisawa, Hiroshi, Editores., American Chemical Society, Estados Unidos.

Kumate, Jesús., 1981., *Antibiótico y Quimioterapia*., Francisco Méndez Hernández, Editor, México

Lozoya, Xavier, Aguilar, Abigail y Camacho, Juan Raul., 1987., Encuesta sobre el uso actual de plantas en la Medicina Tradicional Mexicana., *Rev. Med. IMSS. México*, 25 (4):283-291

Martínez, Maximino., 1979., *Catálogo de Nombres Vulgares de Plantas Mexicanas*., Fondo de Cultura Económica, México

Masuda, Toshiya, Inazumi, Aya, Yamada, Yasumasa, Padolina, William G. Kikuzaki, Hiroe & Nakatani, Nobuji., 1991., Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmetosum*, *Phytochemistry* 30 (10):3227-3228

Mills III, Terry & Roberson, J. Conrad., 1987., *Instrumental Data for Drug Analysis* Vol. I., 2<sup>o</sup> Ed. Elsevier, New York, USA

Mitscher, Lester A., Rao Gollapudi, Sitaraghav, Drake, Steven & Oburn, David S., 1985., Amorphostibol, an antimicrobial agent from *Amorpha nana*, *Phytochemistry* 24 (7): 1481-1483

Mitscher, Lester A., Okwutw, Simon K., Rao Gollapudi, Sitaraghav, Drake, Steven & Avona, Elizabeth., 1988., Antimicrobial pterocarpanes of nigerian *Erythrina mildbraedii*, *Phytochemistry* 27 (11):3449-3452

Mori, Akihisa, Nishino, Chikao, Enoki, Nobuyasu & Tawata, Shinkichi., 1987., Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*, *Phytochemistry* 26 (8):2231-2234

Nakatani, Nobaji, Ikeda, Kayo, Kikuzaki, Hiroe, Kiro, Masaru & Yamaguchi, Yuzo., 1988., Diaryldimethylbutane lignins from *Myristica argentea* and their antimicrobial action against *Streptococcus mutans*, *Phytochemistry* 27 (10):3127-3129

Nitao, James K. Nair, Muraleedharan G., Thorogood, Deborah L., Johnson, Kelly S. & Scriber, J. Mark., 1991., Bioactive neolignins from the leaves of *Magnolia virginiana*, *Phytochemistry* 30 (7):2193-2197

Osuna, Lidia y Lozoya, Xavier., 1989., Plantas medicinales usadas por la medicina tradicional para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales infecciosos, *Rev. Med. IMSS*. 27 (4):305-311

Raun, Helle & Brimer, Leon., 1988., Structure and antibacterial activity of plantamajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subsp *major*, *Phytochemistry* 27 (11):3433-3437

Romo de Vivar, A., 1985., *Productos Naturales de la Flora Mexicana*, Ed. LIMUSA, México

Romo de Vivar, A. and Jimenez, H., 1965., Structure of Santamarine, new sesquiterpene lactone., *Tetrahedron*, 21 1741-1745

Rzedowski, Jerzy., 1981., *Vegetación de México*, Ed. LIMUSA, México

San Martín Casamada, Ramón., 1977., *Tratado de Farmacognosia*, Ed. Científico-Médica., Barcelona, España

Scalbert, A., 1991., Antimicrobial properties of tannins., *Phytochemistry*, 30 (12): 3875-3863

Schmitt, Annegret, Tellikepalli, Hanumaiah & Mitscher, Lester A., 1991., Plicatin B, the antimicrobial principle of *Psoralea juncea*, *Phytochemistry* 30 (11):3569-3570

Seegal, H. & Holden, B., 1945., An antibacterial principle of *Anemone pulsatilla*, *Science* 101:41

Sepúlveda, M. T., 1988., La Medicina entre los Purépechas Prehispánicos., UNAM., México

Tada, Masahiro & Sakurai, Kohji., 1991., Antimicrobial compound from *Cercediphyllum japonicum*., *Phytochemistry*., 30 (4): 1119-1120

Thomas, O. O., 1989., (A) Antibacterial properties of the leaf and flower oils of *Tanacetum cilicium*., *Fitoterapia*., LX (2): 135-137

Thomas, O.O., 1989., (B) Anticoagulant and antifibrinolytic properties of *Tanacetum cilicium*., *Fitoterapia*., LX (2):138-140

Thomas, O. O., 1989., (C) Anticoagulant and antifibrinolytic properties of *Tanacetum corymbosum*., *Fitoterapia*., LX (3):231-233

Thomas, O. O., 1989., (D) Phytochemistry of the leaf and flower oils from *Tanacetum cilicium*., *Fitoterapia*., LX (2):131-134

Thomas, O. O., 1989., (E) Phytochemistry of the leaf and flower oils of *Tanacetum corymbosum*, *Fitoterapia*., LX (3):229-230

Tomás-Barberán, Francisco, Iniesta-San Martín, Esther, Tomás-Lorente, Francisco & Ramero, Angel., 1989 Antimicrobial phenolic compounds from three spanish *Helychrysum* species., *Phytochemistry* 29 (4):1093-1095

Tyler, Varro E., et. al., 1976., *Pharmacognosy*., 7° Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, USA

Valdebenito, Hugo, Bittner, Magalis, Sammes, Peter G. Silva, Mario, Watson, William H., 1982., A Compound with Antimicrobial Activity isolated from the red seaweed *Laurencia chilensis*., *Phytochemistry* 21 (6): 1456-1457.

Veerporte, A. R. Tssoi, A. Tijin, Van Doorne, H. & Svendsen, A. Baerheim., 1982., Medicinal plants of Suriname. I. Antimicrobial activity of some medicinal plants., *Journal of Ethnopharmacology*., 5: 221-226

Waage, Susan K and Hedin, Paul A., 1984., Biologically-active flavonoids from *Gossypium arboreum*., *Phytochemistry* 23 (11): 2509-2511

Waage, Susan K. and Hedin, Paul A., 1985., Quercetin 3-O galactosyl-(1-6)-Glucoside, a compound with antibacterial activity., *Phytochemistry* 24 (2): 243-245

Waage, Susan K, Hedin, Paul A. & Grimley, Eugene., 1984., A biologically active procyanidin from *Maacherium floribundum*., *Phytochemistry* 23 (12): 2785-2787

Wang, Ying, Hmburger, Mathias, Gueho, Joseph & Hostettmann., 1989., Antimicrobial flavonoids from *Psidia trinervia* and their methylated and acetylated derivatives., *Phytochemistry* 28 (9): 2323-2327

Wijeskera, R.O.B., 1991., *The Medicinal Plant Industry*., CRC Press, Boca Raton, USA

Wu, Tiang Shung, Jong, Ting-Ting, Tien, Hsien-Ju, Kuoh, Chang-Sheng, Farykawa, Hiroshi & Lee, Kuo-Hsiung., 1987., Annoquinone A, an antimicrobial and cytotoxic principle from *Anona montana*., *Phytochemistry* 26 (6): 1623-1625