

63
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DE LOS
EXTRACTOS METANÓLICOS DE**
Aristolochia grandiflora y *Aristolochia littoralis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A:

MARÍA VICTORIA NORMA SOLANO MÉNDEZ

ASESOR INTERNO: Q.F.I. ANDREA ANGELA BECERRIL OSNAYA
ASESOR EXTERNO: DRA. EN C. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ



V N A M

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

1995.

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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodríguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

" Efecto antimicrobiano de los extractos
metanólicos de *Aristolochia grandiflora*
y *Aristolochia littoralis* "

que presenta la pasante: María Victoria Norma Solano Méndez
con número de cuenta: 8513541 - 1 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 05 de Septiembre de 1995

PRESIDENTE M.V.Z. Luz Ma. Ortega Leyva

VOCAL M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

SECRETARIO Q.F.I. Andrea Becerril Omaya

PRIMER SUPLENTE Q.F.B. Maricela Noé Martínez

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Ma. Eugenia R. Posada Galarza

ESTE TRABAJO LO DEDICO...

A DIOS.

Porque es lo más grande y hermoso de este mundo, por darme la vida, paciencia y un poco de inteligencia y perseverancia para concluir esta meta.

A mis Padres: *FAUSTO Y HERMINIA.*

Con inmenso amor y gratitud por haberme dado el ser, porque han sabido guiar mis pasos por el buen camino de la vida; por su apoyo, consejos y paciencia para que yo pudiese realizar una de mis más grandes metas: **Mi Formación Profesional**, porque no hay herencia más grande ni más valiosa que el conocimiento y no hay regalo más grande para mí que el que ustedes sean mis padres.

GRACIAS por compartir este momento tan importante para mí, porque quiero que tengan presente que esta meta que hoy he alcanzado no es mía solamente sino suya también.

A mis hermanos: **ANGÉLICA, NORMA, JESÚS**, y a mi primo **JUAN** que ha sido como un hermano más.

Porque siempre me alentaron a continuar, a no dejarme vencer por las adversidades que se fueron presentando, porque me enseñaron con su ejemplo a luchar por lo que Yo quería y hoy que terminé mi formación profesional sólo me queda decir: **GRACIAS** por su confianza, apoyo y consejos.

AGRADECIMIENTOS

Á la Q. F. I. ANDREA ANGELA BECERRIL OSNAYA, por su ayuda desinteresada, por su amistad y apoyo y porque siempre impulso en nosotros el deseo de superación para poder alcanzar nuestra meta.

A la D. en C. ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ, por la gran ayuda prestada para la realización de este trabajo, por el apoyo y tiempo que a mí dedico.

A todos los profesores de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por sus enseñanzas y consejos con lo cual logran la formación profesional de los estudiantes.

A la Dra O. Espejo y al M. en C. Alfonso Lira del Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química por haberme proporcionado los extractos con los cuales fue posible realizar este trabajo.

Al Biólogo LUCIANO HERNÁNDEZ GOMEZ, Jefe del cepario del departamento de Biología de la Facultad de Química; Maestra ADRIANA MEJIA Jefa del Laboratorio de Medios de Cultivo; Departamento de Biología; a los laboratoristas del laboratorio 1 E de la Sección de Farmacología; Departamento de Farmacia de la Facultad de Química; por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

Al Ing. JUAN RAFAEL GARIBAY BERMUDEZ por su asesoría en el análisis estadístico de este trabajo.

Al Honorable Jurado por la mejor disposición que prestaron en la revisión de este trabajo.

A los integrantes del laboratorio de Investigación de Farmacología de la Facultad de Química que realizan su Servicio Social y/o tesis; especialmente a R. Enrique López Castro por su valiosa ayuda, amistad y enseñanzas en el manejo de la computadora con lo cual me fue posible la escritura de este trabajo.

Y finalmente un afectuoso saludo a los integrantes de la 15^{ma}. Generación de Q. F. B. que de una u otra forma han contribuido a la finalización de mi formación profesional, y a aquellas personas que además de compañeros me brindaron su amistad, cariño y apoyo en los momentos difíciles de mi carrera; especialmente a: Eva Eloina, Laura Lucila, Laura Irene, Guillermina, la Sra Irene Neri laboratorista de la Sección de Microbiología de la F. E. S. C., Elvira, Minerva, Norma Alicia, Lucia, Nery; Ernesto Toscano, Nacho, Tony Medina, Alejandro Castillo, Miguel Vargas, Antonio Guzmán.

INDICE

I . Resumen -----	1
II . Introducción -----	3
III. Generalidades	
<u>Aristolochia</u>	
Origen -----	5
Descripción -----	5
Localización -----	6
Efectos farmacológicos -----	8
Química -----	10
<u>Antimicrobianos</u>	
Definición -----	13
Clasificación	
Por su origen -----	13
Por su efecto antimicrobiano -----	14
Por su mecanismo de acción -----	15
Por su espectro de actividad -----	26
Por su estructura química -----	26
Resistencia bacteriana -----	27
Origen de la resistencia -----	27
Tipos de resistencia -----	27

Actividad antimicrobiana -----	31
Métodos " <i>in vitro</i> " -----	31
Métodos " <i>in vivo</i> " -----	32
Antibióticos utilizados -----	32
IV. Planteamiento del problema -----	34
V. Objetivos -----	35
VI. Parte experimental	
Material y Método -----	36
VII. Resultados y Discusión	
Resultados de las pruebas preliminares para estandarizar el método -----	47
Resultados de <u><i>Aristolochia littoralis</i></u> -----	50
Resultados de <u><i>Aristolochia grandiflora</i></u> -----	60
Análisis estadístico -----	66
VIII. Conclusiones -----	76
IX. Bibliografía -----	78

INDICE DE ABREVIATURAS

AA. Ácidos aristolóquicos

AA No. 11. Agar antibiótico número 11.

a. C. Antes de Cristo

A. littoralis. Aristolochia littoralis

A. grandiflora. Aristolochia grandiflora

AMH. Agar Müller-Hinton

ATCC. American Type Culture Collection

BBI. Bisbencilisoquinolínico

B. subtilis. Bacillus subtilis

d.C. Después de Cristo

DMS. Diferencia Mínima Significativa

DNA. Ácido Desoxirribonucleico

E. coli. Escherichia coli

Extr. Extracto

F Factor de fertilidad

Factor R. Factor de Resistencia bacteriana

g. Gramos

°.Grados (circunferencia)

°C. Grados centígrados

Gent. Gentamicina

Gram (-). Gram negativas

Gram (+). Gram positivas

hr. Horas

Lab. Laboratorio

Lugar A aminoacilo

Lugar P peptidilo

MIC Concentración mínima inhibitoria

µg. Microgramos

mg. Miligramos

ml. Mililitros

mm. Milímetros

Nist. Nistatina

PABA Ácido Paraaminobenzoico

P. aeruginosa Pseudomonas aeruginosa

PBP. Proteínas Fijadoras de las Penicilinas

Prom. Inhib. Promedio de Inhibición

RNA. Ácido ribonucleico

S. aureus. Staphylococcus aureus

tn. Transposones

UI. Unidades Internacionales

Vanc. Vancomicina

INDICE DE ILUSTRACIONES

Cuadro No. 1. Localización geográfica del género <i>Aristolochia</i> en México -----	7
Cuadro No. 2. Usos de las <i>Aristolochias</i> en México -----	9
Cuadro No. 3. Compuestos aislados del genero <i>Aristolochia</i> que han sido estudiados quimicamente -----	12
Cuadro No. 4 Manajo de los resultados obtenidos con los extractos para el análisis estadístico -----	41
Cuadro No. 5. Efecto de los extractos en pruebas preliminares sobre <i>E. coli</i> -----	47
Cuadro No. 6. Efecto de los extractos en pruebas preliminares sobre <i>E. coli</i> -----	48
Cuadro No. 7. Efecto de los extractos en pruebas preliminares sobre <i>E. coli</i> -----	48
Cuadro No. 8. Efecto de los extractos en pruebas preliminares sobre <i>P. aeruginosa</i> ----	49
Cuadro No. 9. Efecto de <i>A. littoralis</i> sobre <i>E. coli</i> -----	52
Cuadro No. 10. Efecto de <i>A. littoralis</i> sobre <i>P. aeruginosa</i> -----	54
Cuadro No. 11. Efecto de <i>A. littoralis</i> sobre <i>S. aureus</i> -----	56
Cuadro No. 12. Efecto de <i>A. littoralis</i> sobre <i>B. subtilis</i> -----	58
Cuadro No. 13. Efecto de <i>A. grandiflora</i> sobre <i>P. aeruginosa</i> -----	62
Cuadro No. 14. Efecto de <i>A. grandiflora</i> sobre <i>S aureus</i> -----	64
Diagrama No. 1. Flujograma experimental -----	42
Figura No. 1. Compuestos aislados del género <i>Aristolochia</i> -----	11
Figura No. 2 Puntos de acción de antimicrobianos en la célula bacteriana -----	15
Figura No. 3. Síntesis de la pared bacteriana y acción de algunos antibióticos sobre esta síntesis -----	18

Figura No. 4. Acción de algunos antibióticos sobre la membrana celular -----	20
Figura No. 5. Inhibición de la síntesis proteica -----	23
Figura No. 6. Sitios de inhibición por algunos antibióticos en la síntesis de los ácidos nucleicos -----	25
Figura No. 7. Inhibición de <u>A. littoralis</u> sobre <u>E. coli</u> -----	51
Figura No. 8. Inhibición de <u>A. littoralis</u> sobre <u>P. aeruginosa</u> -----	53
Figura No. 9. Inhibición de <u>A. littoralis</u> sobre <u>S. aureus</u> -----	55
Figura No. 10. Inhibición de <u>A. littoralis</u> sobre <u>B. subtilis</u> -----	57
Figura No. 11. Inhibición de <u>A. littoralis</u> sobre <u>Candida albicans</u> -----	59
Figura No. 12. Inhibición de <u>A. grandiflora</u> sobre <u>P. aeruginosa</u> -----	61
Figura No. 13. Inhibición de <u>A. grandiflora</u> sobre <u>S. aureus</u> -----	63
Figura No. 14. Inhibición de <u>A. grandiflora</u> sobre <u>Candida albicans</u> -----	65
Gráfica No. 1. Promedio de inhibición por tratamiento (<u>A. littoralis</u> y <u>A. grandiflora</u>) sobre <u>P. aeruginosa</u> y <u>S. aureus</u> -----	68
Gráfica No. 2. Promedio de inhibición por tratamiento sobre <u>P. aeruginosa</u> , <u>S. aureus</u> y <u>Candida albicans</u> -----	70
Gráfica No. 3. Promedio de inhibición de cada concentración utilizada (20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml) en el tratamiento 1 y tratamiento 2 sobre <u>P. aeruginosa</u> y <u>S. aureus</u> -----	73
Gráfica No. 4. Promedio de inhibición de cada concentración utilizada en el tratamiento 1 y tratamiento 2 sobre <u>P. aeruginosa</u> , <u>S. aureus</u> y <u>Candida albicans</u> -----	75

I. RESUMEN

Las Aristolochias son una familia de plantas de amplio uso en medicina tradicional en diversas partes del mundo. Entre los efectos que se les atribuyen tenemos: antibióticos, antiparasitarios, antisépticos, antídoto contra veneno de serpientes, anticonceptivos y abortivos. Sin embargo, los estudios sistemáticos de estas plantas se enfocan más al efecto antitumoral. En base a esto el presente estudio plantea demostrar el efecto antimicrobiano de las Aristolochias mexicanas (*A. littoralis* y *A. grandiflora*) para así tener otras alternativas de terapéutica diferente a los antibióticos sintéticos e impulsar un mejor aprovechamiento de nuestros recursos. Se utilizaron cinco cepas de cultivos puros (ATCC): *S. aureus* ATCC 29213, *B. subtilis* ATCC 6636, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 29922 y *C. albicans* ATCC 10231, empleando el método de difusión en agar cilindro-placa. De un cultivo de la cepa a probar con 24 hr de crecimiento a 37° C se realizó un lavado con SSI al 9%, este lavado se estandarizó con la misma solución hasta lograr una turbidez semejante al patrón No. 1 de McFarland. La suspensión se mezcló con la capa siembra (AA No. 11), esta mezcla se agrega a la caja Petri que contiene la capa base (AMH) se colocan los cilindros a una distancia aprox. de 60° entre sí, y se vierten en ellos las diferentes concentraciones del extracto las cuales fueron 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml y el control [antibiótico adecuado a cada cepa: NISTATINA (1.2 µg/ml), GENTAMICINA (10 µg/ml) y VANCOMICINA (30 µg/ml)], estas cajas se incubaron a 37° C por 24 hr. Se midieron los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento de cada concentración del extracto y del control. Los resultados muestran un efecto de inhibición de crecimiento de los microorganismos con ambos extractos siendo mayor para *S. aureus* (\bar{X} de Inhib. *A. littoralis* = 17.67 mm, \bar{X} de inhib. *A. grandiflora* = 15.92 mm) comparándolo con su control

(que para las bacterias Gram (+) fue Vancomicina \bar{X} de inhib. = 15.49 mm). La mayor inhibición observada con ambos extractos fue a la concentración de 50 mg/ml para las cepas Gram (+) y Gram (-), en la levadura no tuvieron efecto alguno; sin embargo el diámetro de halo de inhibición para Gram (-) con ambos extractos fue menor que el diámetro del control. Estos datos nos sugieren un mayor efecto antimicrobiano con A. littoralis que con A. grandiflora. Con este estudio concluimos que A. littoralis puede ser una alternativa como antimicrobiano de origen natural.

II. INTRODUCCION

Desde la década que siguió a 1500 d.C., se conoce el tratamiento de las enfermedades con sustancias quimioterapéuticas, pero solo a partir de 1935 se ha llevado a cabo este tipo de terapéutica (30).

En la actualidad existe una inmensa cantidad de fármacos antimicrobianos sintéticos, los cuales tienen la característica de que a pequeñas modificaciones en su estructura química amplían su espectro de acción, además, algunos presentan mayor actividad en presencia de otros (sinergismo). Sin embargo los microorganismos debido a diferentes mecanismos han logrado protegerse contra la acción de los fármacos tipo antibiótico (3, 4), por lo que muchas veces no es posible predecir la susceptibilidad de los microorganismos a cada uno de ellos.

Todo esto da como resultado el gran auge y uso indiscriminado de antimicrobianos, además esto les confiere el riesgo de producir resistencia no solo a uno sino a varios antimicrobianos (15). Por lo tanto, es necesario estudiar la sensibilidad individual de cada agente para así elegir el antibiótico más adecuado (más activo contra el microorganismo patógeno, menos tóxico para el huésped, con características farmacológicas apropiadas y más económico) (38).

Con el surgimiento de cepas resistentes es necesario buscar un método para probar la sensibilidad de un microorganismo patógeno a varios agentes antimicrobianos de diferente origen como son:

- de otros microorganismos
- de plantas

- de animales.(30)

De esta forma y en base a algunos estudios hechos con anterioridad sobre el género *Aristolochia* en las cuales se ha descubierto que tienen actividad antimicrobiana, se busca encontrar esta actividad en las *Aristolochias* mexicanas como son:

A. grandiflora y *A. littoralis* (13, 23, 24).

Todo este estudio surgió porque el uso de compuestos de origen vegetal por sus características farmacológicas no compiten con los fármacos utilizados clínicamente ya que estos en su mayoría son sintéticos y producen una resistencia antimicrobiana cuya latencia de aparición se está dando más rápida que en años anteriores; lo que da pauta a iniciar el estudio sistematizado y a la vez científico de los extractos con estas características.

III. GENERALIDADES.

ARISTOLOCHIA

Origen

Las primeras noticias del uso medicinal de las Aristolochias se remonta a los siglos IV-III a. C. con Teofrasto, posteriormente en el siglo I d. C. con Dioscórides, Plinio y Celso y después en el siglo II d. C. con Galeno; quienes se encargan de estudiar y clasificar a las plantas así como asignar sus usos medicinales (8, 16, 22).

La etimología griega del género Aristolochia quiere decir " que da a luz a los mejores hijos ", la palabra está formada por dos términos: aristos = óptimo, excelente y tokos = prole o criatura (2) y tiene que ver con uno de sus principales usos que es el de favorecer el parto y contribuir a la expulsión de la placenta (efecto uterocinético).

El nombre náhuatl de las Aristolochias es "tlacopatli" y proviene de dos palabras: tlacotl = vara y patli = medicina; este nombre describe principalmente la forma de la planta, es decir, medicina de vara o bejuco (18).

Descripción.

Esta familia de plantas crece a manera de bejuco y suele vivir en regiones cálidas, las hojas se disponen al parecer, sin orden a lo largo del tallo y carecen de apéndices estipulares, las flores del género Aristolochia solo pueden dividirse en dos partes simétricas cuando se cortan a lo largo, es decir, tienen solo un plano de simetría. La cubierta floral es de forma tubulosa terminada en lengüeta y el fruto en forma de corona incipiente que queda debajo de la flor.

Los estambres suelen ser seis, libres o unidos a una cápsula con numerosas semillas, las raíces son de sabor amargo y aromático, las cuales poseen cápsulas secretoras llenas de aceite (16).

Localización.

El género *Aristolochia* comprende cerca de 500 especies ampliamente distribuidas en el mundo desde Norte y Sudamérica, Europa, Asia y África excluyendo a Australia donde no se han encontrado. Predominan en clima tropical, subtropical y aún se pueden encontrar en clima templado, su abundancia disminuye conforme desciende la temperatura ya que este tipo de plantas no soporta los climas fríos (31).

México es un país donde existe un gran número de especies de *Aristolochias*, debido a que cuenta con grandes extensiones territoriales que reúnen las condiciones ideales para su desarrollo (cuadro No. 1).

Cuadro No. 1

En este cuadro se enlista la localización geográfica de las plantas de este género en nuestro país (Herbario del Instituto de Biología, U.N.A.M).

ESPECIE	ESTADO DE LA REPUBLICA
- <i>A. littoralis</i>	Edo.de México, Guerrero, Oaxaca, Tamaulipas, Querétaro y Nuevo León.
- <i>A. pentandra</i>	Veracruz y Yucatán.
- <i>A. odoratissima</i>	Michoacán, Oaxaca, Veracruz, Colima, Tabasco y Chiapas.
- <i>A. elegans</i>	San Luis Potosí.
- <i>A. foetida</i> HBK	Guerrero, Morelos, Edo. de México, Michoacán, Jalisco y Guanajuato.
- <i>A. grandiflora</i>	Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Chiapas y Yucatán.
- <i>A. subclausa</i>	Puebla, Oaxaca, Guerrero y Colima.
- <i>A. schipii</i>	Veracruz.
- <i>A. ovalifolia</i> Ducharte	Veracruz, Oaxaca y Edo. de México.
- <i>A. taliscana</i> Hook	Jalisco, Michoacán, Guerrero y Colima.
- <i>A. watsonii</i>	Sonora y Guerrero.
- <i>A. veracruzana</i> J.Ortega	Veracruz.
- <i>A. tentaculata</i> schmidt	Jalisco y Michoacán.
- <i>A. maxima</i>	Chiapas.
- <i>A. arborea</i>	Veracruz y Tabasco.
- <i>A. argentea</i>	Morelos.
- <i>A. brevipes</i> benth	Guerrero, Baja California Sur, Durango, Sinaloa, Edo. de México, Hidalgo y San Luis Potosí.
- <i>A. carterae</i> pfeifer	Jalisco.
- <i>A. inflata</i> HBK	Chiapas.
- <i>A. guadalajarana</i> wats	Jalisco.
- <i>A. longiflora</i>	Coahuila.

Efectos farmacológicos.

De las muchas especies de *Aristolochia* reportadas en México 39 tienen uso en medicina tradicional y éstas, geográficamente se encuentran distribuidas en zonas tropicales y subtropicales del país (12).

De estas 39 especies, sólo 15 tienen propiedades antibióticas, antiparasitarias y antisépticas, las cuales se clasifican como el primer grupo de actividades biológicas y se han utilizado para la curación de la blenorragia, sífilis, diarrea, disenteria, vaginitis, oftalmía purulenta y cólera (12).

Como segundo grupo de actividades biológicas se encuentra su propiedad alexitere (antídoto contra veneno de serpientes y alacranes); sin embargo, actualmente no existen estudios farmacológicos que apoyen esta actividad (22).

Como tercer grupo de actividades de estas plantas es el uterocinético, debido a su efecto emenagogo y su capacidad de controlar metrorragias y flujos por el efecto que tienen sobre músculo liso y se han utilizado como anticonceptivas y abortivas (19, 21) por lo que en China e India las investigaciones farmacológicas sobre este género se han enfocado principalmente a su estudio como anticonceptivo para el control de la sobrepoblación (12).

Otra actividad importante de estas plantas es su actividad antitumoral la cual es mencionada principalmente en el caso de *A. grandiflora* y *A. odoratissima*. (1, 31). En el cuadro No. 2 se enlistan las plantas de *Aristolochias* y los usos que se les dan en México.

CUADRO No. 2
Usos de las Aristolochias en México (6).

USOS	ESPECIES
Antiblenorrágico	<i>A. foetida</i> , <i>A. fragantissima</i> , <i>A. microphylla</i> , <i>A. odoratissima</i>
Antisifilítico	<i>A. mexicana</i> , <i>A. odoratissima</i> .
Antidisentérico	<i>A. foetida</i> , <i>A. fragantissima</i> , <i>A. grandiflora</i> , <i>A. microphylla</i> , <i>A. uhdeana</i>
Antidiarreico	<i>A. foetida</i> , <i>A. microphylla</i> , <i>A. uhdeana</i> .
Antiséptico	<i>A. foetida</i> , <i>A. fragantissima</i> , <i>A. microphylla</i> .
Anticólera	<i>A. foetida</i> .
Contra oftalmia purulenta	<i>A. fragantissima</i> , <i>A. microphylla</i> .
Contra vaginitis	<i>A. fragantissima</i> , <i>A. glandiflora</i> , <i>A. odoratissima</i> .
Antiponzoñoso	<i>A. fragantissima</i> , <i>A. mexicana</i> , <i>A. odoratissima</i> , <i>A. subclausa</i> , <i>A. grandiflora</i>
Anticrotálico	<i>A. mexicana</i> , <i>A. pilosa</i> .
Emenagogo	<i>A. mexicana</i> , <i>A. fragantissima</i> , <i>A. grandiflora</i> , <i>A. macrantha</i> , <i>A. pentandra</i> .
Para controlar metrorragias	<i>A. foetida</i> , <i>A. microphylla</i> , <i>A. uhdeana</i> .
Para controlar flujos	<i>A. grandiflora</i> .
Antitumoral	<i>A. grandiflora</i> , <i>A. odoratissima</i> .
Antipirético	<i>A. grandiflora</i> , <i>A. odoratissima</i> , <i>A. pentandra</i> .
Antiespasmódico	<i>A. fragantissima</i> , <i>A. grandiflora</i> , <i>A. mexicana</i> , <i>A. odoratissima</i> , <i>A. subclausa</i> .
Antirreumático	<i>A. fragantissima</i> , <i>A. grandiflora</i> , <i>A. pentandra</i>
Astringente	<i>A. fragantissima</i> , <i>A. grandiflora</i> , <i>A. odoratissima</i> , <i>A. uhdeana</i> .
Diaforético	<i>A. fragantissima</i> , <i>A. mexicana</i> , <i>A. odoratissima</i> .
Estimulante	<i>A. grandiflora</i> , <i>A. longa</i> , <i>A. mexicana</i> , <i>A. rotunada</i> , <i>A. odoratissima</i> , <i>A. subclausa</i> .
Tónico	<i>A. grandiflora</i> , <i>A. odoratissima</i> , <i>A. pentandra</i> , <i>A. serpentaria</i> .
Analgésico	<i>A. fragantissima</i> , <i>A. grandiflora</i> .
Eupéptico	<i>A. grandiflora</i> , <i>A. odoratissima</i> .
Carminativo	<i>A. grandiflora</i> , <i>A. mexicana</i> .
Para disolver cálculos de la vesícula	<i>A. grandiflora</i> .
Para disolver cálculos renales	<i>A. grandiflora</i> .

Química.

El alcaloide más común encontrado en estas plantas es la base cuaternaria de amonio llamada magnoflorina que pertenece al grupo de alcaloides cuyo nombre genérico es el de aporfínas.

Otros alcaloides muy importantes por su actividad farmacológica son los del tipo *bis-bencilisoquinolínico*, de los cuales se han reportado cinco para ésta familia que son: alcaloides *bis-bencilisoquinolínicos* (BBI), aporfínicos, fenantrénicos, ácidos aristolóquicos (AA) y aristolactamas, de los cuales los compuestos más estudiados y a los que se les atribuyen muchas actividades biológicas son los AA, (7), que tienen una estructura nitrofenantrénica con un puente metilendioxi entre las posiciones 3 y 4, y sustituyentes oxigenados que pueden estar presentes generalmente en la posición 6, 7 y 8 en diversas combinaciones (16, 27).

De los compuestos del AA se han identificado al menos 19 derivados como ácidos y otros tantos derivados lactámicos (7).

Por otro lado, el marcador taxonómico de estas especies es el ácido aristolóquico (9) ya que este y sus derivados solo se han encontrado en la familia Aristolochiaceae o en escasas especies de familias cercanamente relacionadas con aquellas como Anonaceae, Monimiaceae y Minispermaceae (26, 27, 28).

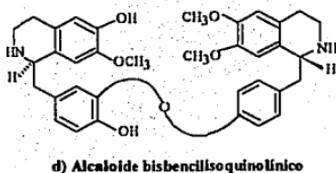
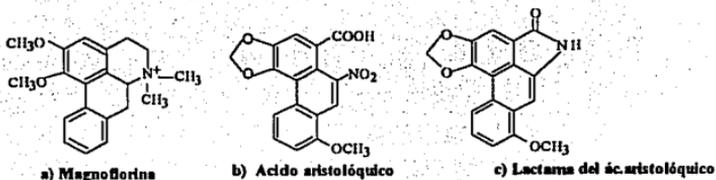


Figura No. 1 Compuestos aislados del género *Aristolochia*

Los metabolitos secundarios que acumulan las especies del género *Aristolochia* son de diversos tipos: compuestos terpénicos, esteroides, ácidos grasos, lignanos, etc., siendo los más utilizados por su actividad farmacológica los alcaloides y los productos nitrofenantrénicos, como el ácido aristolóquico y sus derivados que han demostrado ser eficaces anticancerígenos (7).

De las especies estudiadas hasta el momento se han aislado diferentes compuestos, entre los cuales tenemos varios tipos de ácidos aristolóquicos, sustancias de composición alcaloidea, esteroides y otros productos.

De las 39 especies de Aristolochias que hay en México sólo 8 se han estudiado químicamente y los compuestos que se han aislado de ella se dan en el cuadro No. 3.

Cuadro 3. Compuestos aislados del género Aristolochia que han sido estudiados químicamente (7).

ESPECIE	COMPUESTO AISLADO
<i>A. asclepiadifolia</i>	β -sitosterol, alantoína, ácido aristolóquico
<i>A. littoralis</i>	β -sitosterol, ácido aristolóquico y una bisbencilisoquinolina
<i>A. taliscana</i>	taliscanina, dehidroisoeugenol
<i>A. mexicana</i>	substancias antibacterianas
<i>A. serpentaria</i>	ác. aristolóquico 1, β -sitosterol, rojo de aristoloquia
<i>A. rotunda</i>	ác. aristolóquico 1, 2, aristolactama 1, β -sitosterol, L-asparagina
<i>A. máxima</i>	ácido aristolóquico
<i>A. longa</i>	piranos, β -cariofileno, linalool, acetato de bornilo, sesquiterpenos tetracíclicos: calareno, maaliol, y 1-(10)-aristolén-2-ona poliprenoles, 2-ona poliprenoles, ácidos grasos y sus ésteres metílico, etílico, isobutílico y fitílico.

ANTIMICROBIANOS.

Definición.

Los antimicrobianos son un grupo de fármacos que están continuamente en uso pues constituyen la base fundamental del tratamiento de enfermedades infecciosas entendiéndose por antimicrobiano como aquellos compuestos obtenidos a partir de microorganismos ya sean bacterias, hongos, levaduras, etc., (antibiótico) y los producidos por síntesis química (quimioterapéutico).

El término antibiótico fue propuesto inicialmente para definir a sustancias que ocasionan la destrucción de la vida, tomando en cuenta lo anterior se puede decir que cualquier agente mecánico, físico o químico capaz de matar sería un antibiótico, pero no puede tomarse en cuenta dicho concepto puesto que según los estudios de Waksman un "antibiótico" se define como una sustancia química derivada o producida por microorganismos que tienen la capacidad de inhibir el desarrollo o destruir bacterias y otros microorganismos (25).

Clasificación.

Existen diversos criterios para agrupar a los antimicrobianos, entre los cuales tenemos :

Por su origen : Natural o Biológico, Semisintético y Sintético.

- Natural o Biológico : Cuando son obtenidos a partir de microorganismos, bien sean bacterias (Bacillus, Streptomyces, etc.) u hongos (Penicillium, Cephalosporium, Micromonospora, etc.) este es el caso de la Polimixina, Cloramfenicol, por un lado y Penicilina, Cefalosporina y Gentamicina por el otro (17).

- **Semisintético:** Es cuando el núcleo fundamental de un determinado antimicrobiano producido por un microorganismo se modifica en el laboratorio para conseguir propiedades diferentes que mejoren el espectro, las características farmacocinéticas o disminuyen los efectos secundarios. Un ejemplo de este grupo lo constituyen las aminobencilpenicilinas (ampicilinas, amoxicilina, piperacilina, etc.) que tienen en el ácido 6-aminopenicilánico, obtenido de Penicillium chrysogenum al cual se le han incorporado diferentes cadenas laterales, obteniéndose así compuestos con mayor espectro, superior actividad o de diferentes propiedades farmacocinéticas (17).

- **Sintético:** Cuando se obtienen de manera total por procesos de síntesis químicas como por ejemplo, las sulfamidas y quinolonas (17).

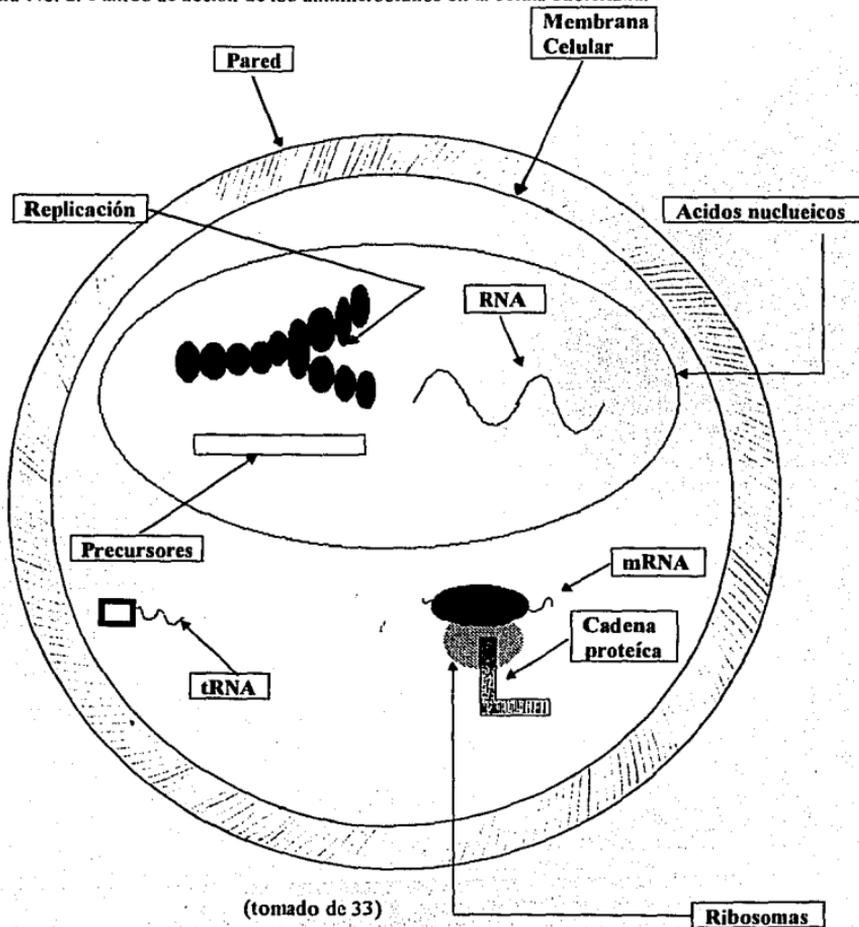
Por su efecto antimicrobiano : Bacteriostático, Bactericida

- **Bacteriostático :** Este efecto se da cuando las concentraciones del antimicrobiano que se alcanzan en suero y tejido, detienen el desarrollo y multiplicación de las bacterias sin destruirlas, por lo que al retirar el medicamento el microorganismo puede multiplicarse nuevamente. Con este tipo de antimicrobianos, es fundamental la activación de los mecanismos defensivos del huésped.

- **Bactericida:** En este efecto la acción es letal produciendo la lisis bacteriana, con efectos irreversibles para el microorganismo. El prototipo de agentes bactericidas lo constituyen los que actúan sobre la pared (betalactámicos) o sobre la membrana celular de la bacteria (polimixina).

Por su mecanismo de acción : a). Los que actúan sobre la pared celular, b). Los que actúan sobre la membrana celular, C). Los que inhiben la síntesis proteica y, d). Los que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos (20).

Figura No. 2. Puntos de acción de los antimicrobianos en la célula bacteriana.



a). Los agentes que actúan sobre la pared celular. La pared es un elemento existente en todas las bacterias que las protege contra los cambios osmóticos impidiendo el estallido de la misma. La pared contiene elementos patógenos característicos de cada especie, en donde el proceso formativo esta integrado por pasos sucesivos en el cual en cada uno de estos puede actuar un antibiótico (33).

La síntesis parietal constituye un proceso complejo en el que intervienen al menos treinta enzimas y tiene lugar en cuatro etapas :

- 1- formación del precursor
- 2- transporte del precursor a través de la membrana
- 3- formación del polímero lineal
- 4- transpeptidación

Existen antimicrobianos tales como la fosfomicina y cicloserina que interfieren la síntesis de la pared en la primera etapa (ver figura No. 3). La fosfomicina bloquea la unión de fosfoenol piruvato con el UDP-NaG, mientras que la cicloserina, por su analogía estructural con la D-alanina impide el proceso de L-alanina a D-alanina y la formación del dipéptido D-alanina-D-alanina a partir de la D-alanina.

La VANCOMICINA (antimicrobiano utilizado) y la ristocetina se unen al extremo D-alanina-D-alanina del pentapéptido, impidiendo así la transferencia del disacárido pentapéptido al lípido portador de la membrana citoplásmica con lo que se impide el alargamiento de las cadenas (ver figura No. 3).

En el caso de la VANCOMICINA se sabe que también altera la permeabilidad de la membrana y bloquea la síntesis de RNA.

Como consecuencia la célula bacteriana sin pared no resiste los cambios osmóticos se hincha y estalla.

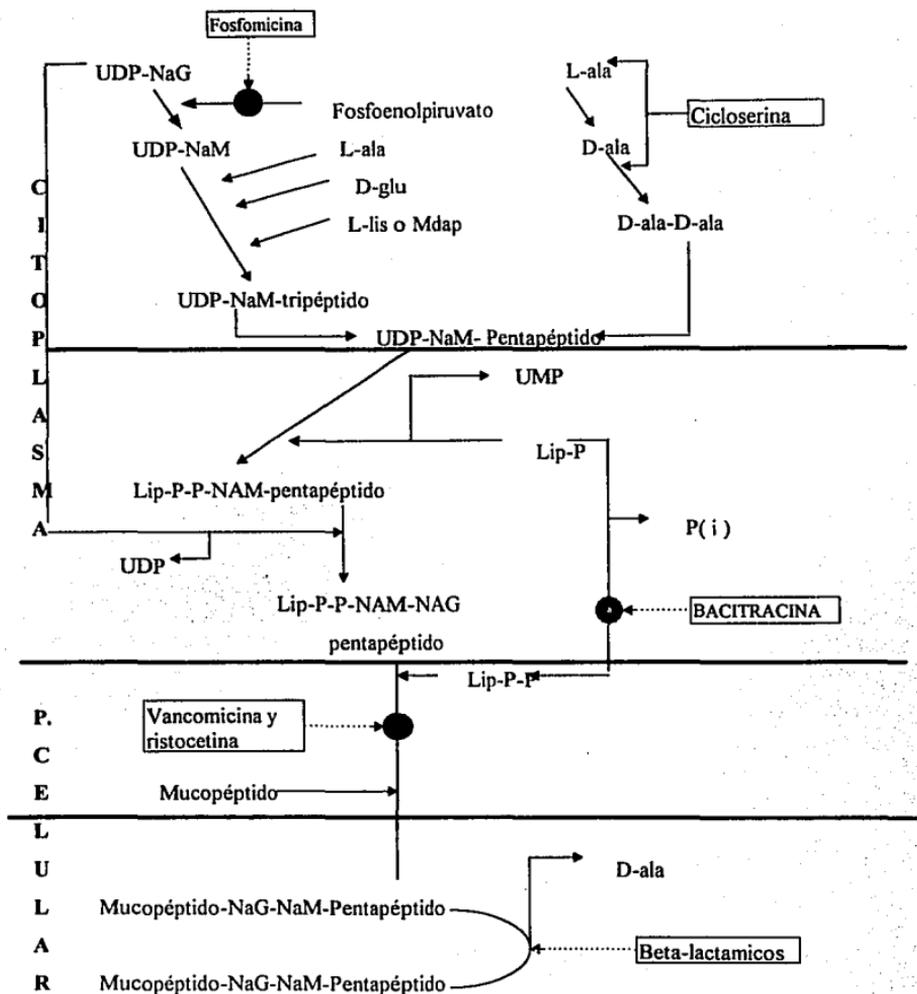
Los antimicrobianos betalactámicos se unen a receptores enzimáticos que están situados en la cara externa de la membrana bacteriana y que llevan a cabo la transpeptidación.

Estos receptores son proteínas que reciben el nombre de proteínas fijadoras de las penicilinas ó PBP (Penicillin-Binding Proteins) y son transpeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas implicadas en las fases finales de formación de la pared bacteriana, así como en la organización de la misma durante los procesos de división y crecimiento bacteriano. Los antibacterianos betalactámicos se unen a una o varias de estas PBP, que pueden ser diferentes para cada uno de ellos (33).

Los betalactámicos son el prototipo de antimicrobianos bactericidas, estos fármacos además de ser capaces de interrumpir la síntesis de la pared bacteriana, provocan la pérdida de un inhibidor de alguna enzima responsable de la lisis celular. Por lo tanto, el efecto lítico se manifiesta en las bacterias que poseen autolisinas (mureína-hidrolasas), mientras que en las que no las tienen, los betalactámicos producen solamente un alargamiento celular.

Los antimicrobianos activos sobre la pared bacteriana son bactericidas, ejercen su acción de manera fundamental cuando la bacteria se encuentra en fase de crecimiento activo, poseen mayor eficacia sobre las bacterias Gram (+) y son poco tóxicos (33).

Figura No. 3. Síntesis de la pared bacteriana y acción de algunos antibióticos sobre esta.



(tomado de 33)

b). Acción sobre la membrana celular. La membrana bacteriana tiene como propiedad más importante la de actuar como una barrera selectiva controlando la composición del medio interno celular ya que regula esencialmente la entrada y salida de los metabolitos celulares. Por esta razón cuando se modifica se alteran los procesos de permeabilidad y la célula pierde proteínas, iones y ácidos nucleicos, lo que da lugar a la lisis bacteriana (33).

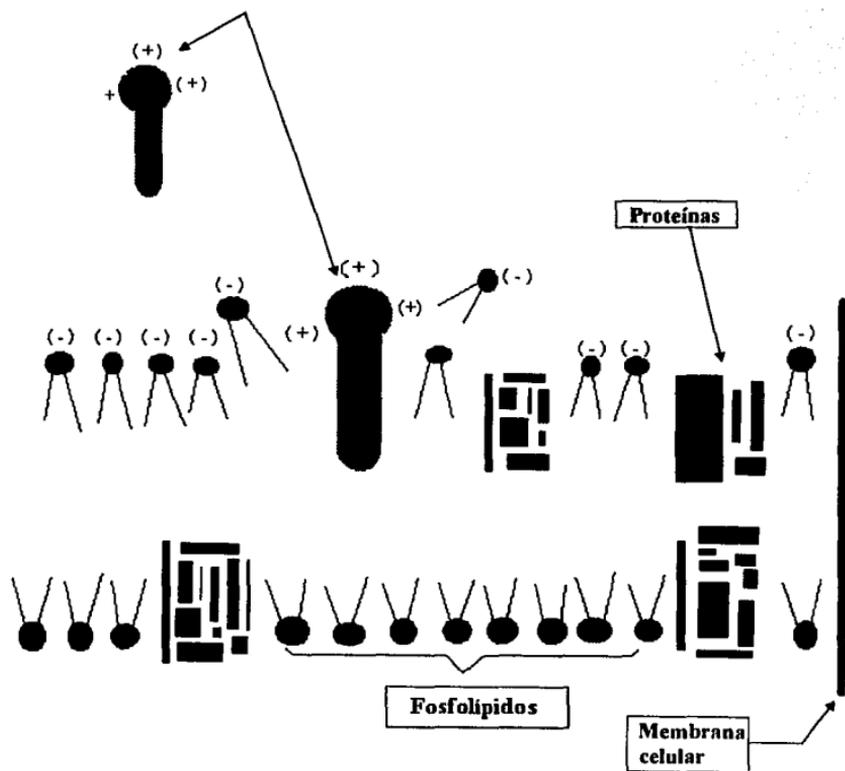
Los principales antimicrobianos que actúan a nivel de la membrana celular son las polimixinas (antibacterianos) y los poliénicos (antifúngicos) (ver figura No. 4).

Las polimixinas tienen un extremo liposoluble que se une a los fosfolípidos de la membrana y un extremo hidrosoluble que penetra en la parte hidrofílica. Se comportan, por tanto, como detergentes catiónicos y desorganizan la membrana bacteriana (33).

Los poliénicos (como la NISTATINA y la anfotericina) actúan de forma similar, pero se combinan con los esteroides de la membrana, compuestos que solamente existen en hongos y micoplasmas.

Los antibacterianos que actúan sobre la membrana bacteriana se caracterizan por ser más activos sobre las bacterias Gram (-) que Gram (+) y su efecto es bactericida (33).

Figura No. 4. Acción de algunos antimicrobianos sobre la membrana celular



(tomado de 33)

c). Inhibición de la síntesis proteica. La síntesis de proteínas es fundamental para la vida bacteriana y los diferentes pasos químicos para obtenerlos pueden ser interferidos por los antibióticos. La síntesis de proteínas comienza con la transcripción de la información genética en el DNA bacteriano a mRNA, por intervención de una RNA-polimerasa.

El proceso de síntesis proteica como tal se realiza en tres etapas:

1) **INICIACIÓN**: comienza con la unión del tRNA iniciador a la señal de partida del mRNA.

Este tRNA iniciador ocupa el lugar P (peptidilo) en el ribosoma.

2) **ELONGACIÓN**: que comprende tres fases que son reconocimiento, transferencia y translocación. Este proceso comienza con el acoplamiento de un aminoacil-tRNA al otro lugar de unión del tRNA en el ribosoma al que se le llama lugar A (aminoacilo). Se forma entonces un enlace peptídico entre el grupo amino del aminoacil-tRNA recién incorporado y el grupo carboxilo de la formilmetionina transportada por el tRNA iniciador. El dipeptidil-tRNA resultante se transloca entonces desde el lugar A hasta el P, mientras que la otra molécula del tRNA abandona el ribosoma. El acoplamiento del aminoacil-tRNA, el movimiento del peptidil-tRNA desde el lugar A hasta el P, y el movimiento asociado del mRNA hasta el siguiente codón, requieren la hidrólisis de GTP. Un aminoacil-tRNA se une entonces al lugar A vacío para iniciar un nuevo paso en la elongación, que se realiza como se acaba de describir.

3) **TERMINACIÓN**. Tiene lugar cuando una señal de terminación es leída en el mRNA por un factor proteico de liberación, lo que conduce a la liberación del ribosoma de la cadena polipeptídica completa (37).

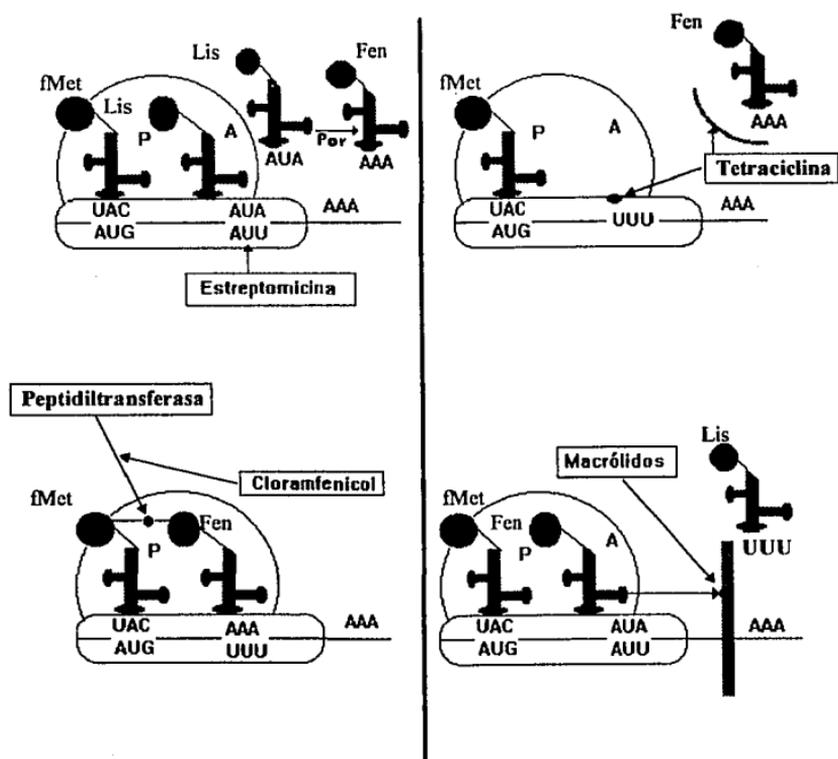
Son diversos los antimicrobianos que inhiben la síntesis proteica. El prototipo lo constituyen los AMINOGLUCOSIDOS dentro de los cuales se encuentra la GENTAMICINA (que es el antimicrobiano que utilice) siendo la estreptomycinina el más conocido (32).

La estreptomycinina se une a la subunidad 30 S del ribosoma, de forma irreversible, alterando la fase de reconocimiento y distorsionando el codón del lugar A, con lo que se detiene la síntesis proteica lo que da lugar a la formación de proteínas defectuosas las cuales no son funcionales. Los otros aminoglucósidos se unen a otras proteínas de ribosomas diferente de las que se fija la estreptomycinina. Las tetraciclinas actúan de forma similar a los aminoglucósidos (ver figura No. 5) (32).

El mecanismo por el que actúan el cloramfenicol y las lincosamidas es en la fase de transferencia por unión al ribosoma 50 S e inhiben la enzima peptidiltransferasa, con lo que impide la transpeptidación (ver figura No.5) (32).

Los macrólidos y el ácido fusídico también se fijan a la subunidad 50 S, pero no bloquean la transpeptidación sino la translocación, pues modifican los factores que suministran la energía necesaria para el proceso de la translocación (ver figura No. 5) (32).

Figura No. 5. Inhibición de la síntesis proteica por algunos antimicrobianos.



(tomado de 32)

d). Bloqueo de la síntesis de ácidos nucleicos. Los antimicrobianos pueden bloquear la síntesis de ácidos nucleicos de tres formas:

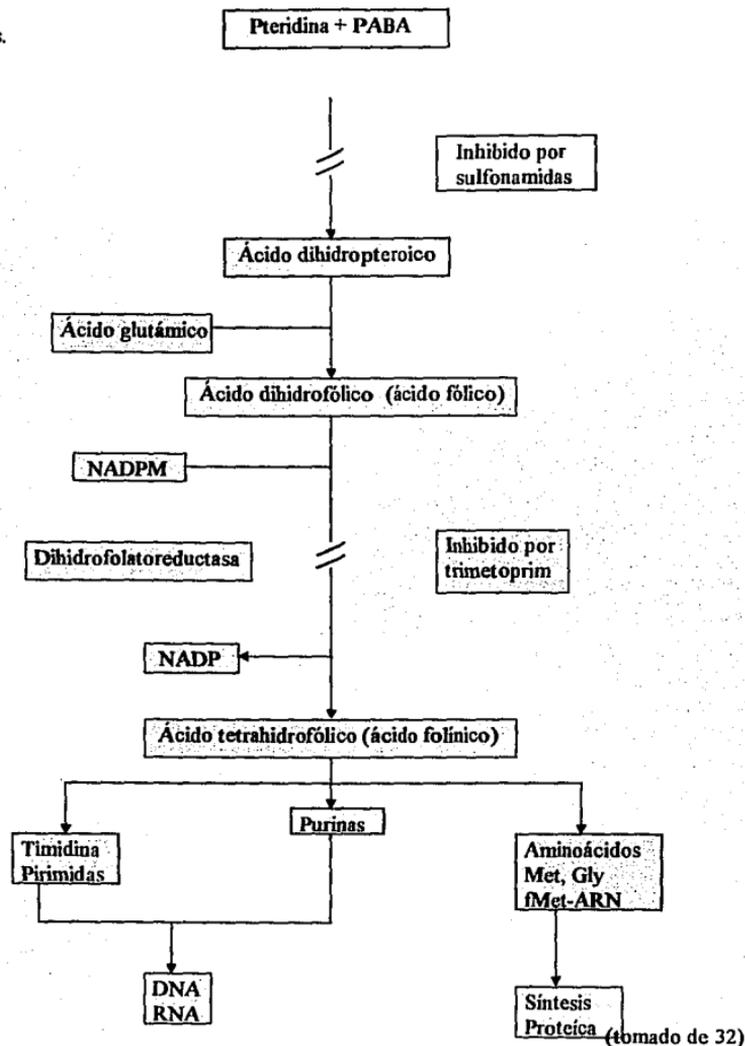
- 1) Interfiriendo la replicación del DNA,
- 2) Impidiendo la transcripción
- 3) Inhibiendo la síntesis de metabolitos esenciales.

Las quinolonas son sustancias que interfieren en la replicación porque inhiben la acción de la enzima DNA-girasa o topoisomerasa II. Se les conoce, por lo tanto, como inhibidoras de las girasas. Esta enzima es la que corta la doble hélice del DNA cromosómico en fragmentos a los que superenrolla en sentido negativo, para posteriormente proceder al sellado de los extremos de DNA que fueron cortados.

La girasa del DNA consta de cuatro subunidades (2 subunidades alfa y 2 subunidades beta) las subunidades alfa son las responsables de los cortes y del nuevo cierre de los puntos de ruptura, mientras que las subunidades beta inducen los superenrollamientos negativos.

Las quinolonas impedirían el cierre de los puntos de ruptura anteriormente citados. La síntesis de ácido nucleico se interrumpe cuando se bloquea la síntesis de bases púricas o pirimídicas. Las sulfamidas, por ejemplo, impiden la formación de ácido fólico por un mecanismo competitivo, pues son análogas estructuralmente del ácido paraaminobenzoico (PABA) (40).

Figura No. 6. Sitios de inhibición por algunos antimicrobianos sobre la síntesis de los ácidos nucleicos.



Por su espectro de actividad : Se le denomina espectro bacteriano a la agrupación de microorganismos constituida por Rickettsias, Bacterias Gram (-) Bacterias Gram (+), Cocos Gram (-), Cocos Gram (+), Actinomicetos, Espiroquetas, entre otros. Los agentes antimicrobianos se dividen por su espectro de actividad en Amplio espectro, Espectro intermedio y Espectro reducido.

- Amplio espectro : Son aquellas moléculas activas sobre un gran número de especies bacterianas (tetraciclinas).

- Espectro intermedio: Son aquellas que tienen acción sobre un número limitado de especies bacterianas (macrólidos).

- Espectro reducido: Solamente son activos sobre un número pequeño de especies bacterianas (polimixina) (20).

Por su estructura química : Los diferentes antibióticos y quimioterapéuticos se agrupan en familias de acuerdo a las características que tienen en común, como son: composición química, efectos farmacológicos, mecanismo de acción, etc. Se dividen en :

Betalactámicos	Lincosamidas
Aminociclitolos	Rifampicinas y Quinolonas
Tetraciclinas	Fosfomicina
Polipéptidos	Nitroimidazoles
Sulfamidas	Poliénicos
Cloramfenicol y derivados	Pirimidinas
Macrólidos	Imidazólicos

Resistencia bacteriana

Ya se ha hecho referencia al desarrollo de resistencia de los microorganismos antes susceptibles a las sustancias quimioterápicas, hecho que fue demostrado por Ehrlich, dicha resistencia adquirida puede demostrarse *in vitro* o *in vivo* y se produce por el contacto de la sustancia con las bacterias.

En general la quimioresistencia es específica para ciertos fármacos, sin embargo, existen numerosos ejemplos de resistencia cruzada.

Origen de la resistencia

Por algún tiempo se discutió si el origen de aparición de formas resistentes a los fármacos quimioterápicos se debía a factores genéticos o de adaptación, pero actualmente se sabe que la resistencia se debe a factores genéticos, la resistencia se puede dar de dos tipos.

Tipos de resistencia.

I - Resistencia cromosómica.- El criterio actual de como aparece la resistencia en una gran población de células bacterianas expuestas a un agente antimicrobiano es algo simple. Si esta gran población es poco resistente genotípicamente (poseen resistencia constitutiva al antibiótico en cuestión) la habilidad de esas células para crecer en presencia del antibiótico conlleva a una nueva población de progenie que son más resistentes genotípicamente. La cuestión es que la resistencia genotípica está altamente relacionada al proceso de mutagénesis microbiana general.

Algunos agentes tales como radiaciones y luz ultravioleta, producen cambios genéticos espontáneos en el DNA, esto puede ocurrir como el resultado de la exposición al agente físico al cual la célula está expuesta.

Estos cambios mutacionales pueden darse en presencia o ausencia de un antimicrobiano, ocurriendo mutaciones en un solo punto. Si el cambio es de resistencia a un agente antimicrobiano, la resistencia puede aparecer por cualquiera de las dos siguientes vías:

a). Si el cambio está específicamente relacionado al antibiótico (ejemplo: un aumento en la cantidad de una enzima, como la beta-lactamasa, la cual hidroliza a la penicilina) un alto nivel de resistencia puede ser observada inesperadamente.

b). Si el cambio genético está relacionado indirectamente a una acción bioquímica del antibiótico, pequeños aumentos en la resistencia pueden ocurrir, pero si el pequeño aumento aparece varias veces en la población bacteriana un desarrollo gradual de la resistencia al antibiótico puede ser observada (35).

II - Resistencia extracromosómica.- En este tipo de resistencia el DNA externo puede ser introducido a la célula bacteriana. Si este codifica a enzimas que afectan la sensibilidad de los antibióticos se llega a un cambio en la resistencia del microorganismo, estos elementos extracromosómicos son llamados plásmidos.

Los plásmidos son moléculas de DNA circular cerrado y superhelicoidal que se reproducen independientemente del cromosoma bacteriano.

El factor de resistencia extracromosómica de las bacterias Gram (-) se denomina factor R. El factor R contiene dos unidades funcionales distintas:

- 1). " Factor de Transferencia de Resistencia " el cual posee la información necesaria para la replicación autónoma y la transferencia por conjugación.
- 2). " Determinante r " que codifica para la resistencia al antibiótico así también puede contener a su vez varias unidades y codificar para producir multirresistencia, la cual puede ser adquirida por otras bacterias si los determinantes son transferidos en bloque.

Los genes con información para la resistencia están contenidos frecuentemente en elementos genéticos conocidos como transposones (tn), reciben este nombre por su capacidad de ser transferidos de una posición a otra dentro de un replicón o pueden ser transportadas a un replicón diferente.

La transferencia del factor R durante el acoplamiento depende de un apéndice externo de tipo piloso, denominado pelo sexual, que facilita la transferencia de plásmidos de las bacterias macho (dadoras) a las bacterias hembra (receptora) las cuales no tienen pelo. El número de determinantes de resistencia unidos a los factores de transferencia de la resistencia determinan el número de antibióticos a los que la bacteria se hace resistente.

Un factor R puede tener varios genes, cada uno de los cuales es responsable de la resistencia a un antibiótico diferente (6, 36).

El material genético y los plásmidos pueden ser transmitidos mediante los siguientes mecanismos:

Transformación:

En esta la exposición bacteriana a un DNA aislado de diferente especie proporciona la posibilidad de que algunos de esos fragmentos de DNA's entren a la célula viable y pueda ser incorporados al cromosoma. El proceso opera con una eficiencia relativamente baja y muchos DNA's extraños provienen de cepas con las cuales tienen algo en común. Esto puede ocurrir espontáneamente o a través de la manipulación en el laboratorio (5).

Transducción:

Los fagos de células Gram (-) y Gram (+) pueden entrar a células receptoras sensibles a fagos de cepas bacterianas relacionadas.

El DNA de fagos infecciosos puede ser insertado al genoma bacteriano, y en seguida se replica con el DNA bacteriano. Si el DNA codifica para proteínas que confieren resistencia a los antibióticos, esa acción puede ser un mecanismo por el cual la célula infectada adquiere inesperadamente resistencia a un antibiótico, es un factor observado que el fago puede acarrear simultáneamente determinantes de resistencia a más de un antibiótico, y la explicación a la resistencia que de pronto aparece a dos o más antibióticos algunas veces no está relacionado con los otros en términos de estructura o modo de acción (5).

Conjugación:

Ocurre una transferencia unilateral del material, entre bacterias del mismo género o de diferentes géneros, durante el proceso de conjugación. Esta transferencia está mediada por un factor de fertilidad (F) que resulta en la extensión del pelo sexual de la célula donadora a la receptora, el plásmido o algún otro DNA es transferido a través de estos túbulos de proteínas del donador al receptor.

Una serie de genes estrechos, determina cada uno la resistencia a un antibiótico entre los géneros de bacterias Gram (-) (5).

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana es el poder que presentan los diferentes antibióticos de atacar a microorganismos patógenos que se encuentren causando una infección en el hospedero.

Tal actividad se expresa generalmente como la concentración mínima inhibidora (MIC) del antimicrobiano que destruirá al microorganismo sometido a prueba. La actividad antimicrobiana puede determinarse, como ya se dijo, por métodos "*in vitro*" e "*in vivo*" (38).

MÉTODOS "*in vitro*".

Estos métodos son útiles para determinar:

1. La potencia de un agente antibacteriano en solución
2. Su concentración en los líquidos corporales o en los tejidos
3. La sensibilidad de un microorganismo dado, a concentraciones conocidas de antibiótico.

El descubrimiento y ensayo de antibióticos y la determinación de la sensibilidad a ellos por parte de las bacterias lleva consigo generalmente la exposición de una suspensión estandarizada de bacterias a los efectos de diversas concentraciones del antibiótico o sustancia sospechosa de contenerlo.

Se emplean dos métodos generales.

I - Dilución en tubo.

II - Difusión en agar llamado de los "pocillos" o "cilindros" (37).

En el presente trabajo se empleó el método de difusión en agar cilindro-placa, por medio de este método se pueden probar simultáneamente un microorganismo frente a más de un agente antimicrobiano (37).

MÉTODOS “*in vivo*”.

La actividad “*in vivo*” y la toxicidad de nuevos antibióticos es un estudio rutinario en modelos experimentales usando animales pequeños tales como ratones, ratas, cobayos o conejos, estos estudios no son directamente transferibles al hombre, pero este es poco común que se le utilice como modelo experimental debido al costo y a la poca disposición por parte del ser humano.

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana son un dato importante a considerar para la elección terapéutica, aunque por sí mismas se deben manejar cuidadosamente de acuerdo a su farmacocinética; tomando en cuenta que la concentración de un antibiótico puede verse afectada (38).

ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS.

Los antibióticos que se emplearon se eligieron en base a lo reportado en la literatura (3, 15, 17, 20, 25, 29) buscando que fueran antimicrobianos a los cuales las bacterias utilizadas fueran sensibles a estos antibióticos:

Gentamicina que es del grupo de los antibióticos aminoglucósidos los cuales actúan sobre el ribosoma bacteriano en síntesis proteica con un efecto irreversible; este antibiótico ha demostrado tener efecto sobre Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa; bacterias Gram (-) utilizadas.

Vancomicina que es un antibiótico que inhibe la síntesis de pared celular, lo que provoca la muerte de la célula bacteriana, por lo tanto de efecto irreversible, además de que este antibiótico tiene efecto sobre las dos bacterias Gram (+) utilizadas, las cuales fueron Staphylococcus aureus y Bacillus subtilis

Finalmente el antimicrobiano utilizado para la levadura Candida albicans fue **Nistatina** el cual es el antibiótico de elección para esta levadura, la nistatina es un poliénico que actúa sobre la membrana celular debilitandola y dejando escapar el contenido celular lo que provoca la muerte celular.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La medicina ha realizado enormes avances en la prevención y tratamiento de las enfermedades en el transcurso de este siglo y hoy se puede esperar la recuperación del paciente a quienes hasta hace poco (algunas décadas) nada se les podía ofrecer.

De todos es conocido que los antibióticos ocupan un lugar predominante en el tratamiento de las enfermedades infecciosas y el éxito o fracaso de la terapia depende de varios factores (dosis del medicamento empleado, automedicación, uso irracional del antibiótico, resistencia al antibiótico, etc.).

La aparición de cepas resistentes a los antimicrobianos es un problema siempre presente, al mismo tiempo el surgimiento de nuevos antibióticos en el mercado (la gran mayoría de tipo sintético) impone la revisión periódica de los patrones de resistencia, así como la necesidad de buscar nuevos antibióticos de origen natural de la gran inmensidad de plantas utilizadas en medicina tradicional que tienen propiedades antimicrobianas pero que hasta ahora no se les ha dado la importancia debida y por consiguiente tampoco se han estudiado a nivel científico. En base a estos antecedentes planteamos un estudio sistematizado de los extractos metanólicos obtenidos de las plantas de Aristolochia littoralis y Aristolochia grandiflora comparando el efecto que tuvieron estos extractos con el efecto de sustancias con actividad antimicrobiana probadas por el método de difusión en agar como son: Vancomicina, Gentamicina y Nistatina.

OBJETIVOS

- 1) - Demostrar el efecto antimicrobiano de los extractos metanólicos totales de Aristolochia littoralis y Aristolochia grandiflora.
- 2) - Analizar comparativamente el efecto antimicrobiano de los extractos totales de ambas aristolochias con antibióticos control para las cepas a utilizar.
- 3) - Determinar la concentración de cada extracto a la cual se inhiba el desarrollo de los microorganismos de prueba.
- 4) - Verificar la potencia de los antibióticos comerciales que se utilizan con la potencia reportada en la literatura.

V. PARTE EXPERIMENTAL.

MATERIAL Y MÉTODO.

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron los microorganismos enlistados con el número de identificación de "American Type Culture Collection":

- Escherichia coli ATCC 25922
- Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
- Staphylococcus aureus ATCC 29213
- Bacillus subtilis ATCC 6636
- Candida albicans ATCC 10231

(2 Gram (-), 2 Gram (+) y una levadura respectivamente)

EXTRACTOS

Se utilizaron los extractos metanólicos totales de dos aristolochias mexicanas que son A. littoralis y A. grandiflora. En el diagrama de flujo siguiente se realiza la descripción de la obtención del extracto.

COLECCIÓN

El material fue colectado en las cercanías de Tamaulipas durante los meses de noviembre y diciembre.

IDENTIFICACIÓN

La identificación la realizó el Biólogo Francisco González Madrano del Instituto de Biología de la UNAM. Una muestra fue depositada (No. de registro 16858) en el herbario del Instituto de Biología de la UNAM.

PLANTA SECA MOLIDA

3000 g

EXTRACTO METANÓLICO

120 g

MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- Agar antibiótico # 11
 - Agar Müller-Hinton
 - Agar Dextrosa sabouraud
- } BIOXON. Hecho en México por:
} BECTON DICKINSON DE
} MÉXICO, S.A. DE C.V.
- Solución Salina Isotónica (0.9 %) Lab. ABBOTT
 - Nefelómetro Macfarland No. 1
 - Vancomicina Lab. Lilly
 - Gentamicina Lab. Schering Plough
 - Nistatina Lab. SQUIBB

MATERIAL DE VIDRIO Y EQUIPO

Tubos de ensayo con tapón de rosca : 16 X 150

Caja de Petri : 100 X 20

Tubos de ensayo : 16 X 150

Pipetas graduada : 1, 5, 10, 25 ml

Probeta graduada : 50, 100, 1000 ml

Matraz Erlenmeyer : 125, 250, 500, 1000 ml

Vasos de precipitados : 50, 250 ml

Matraces aforados : 25 ml

Mecheros con tripie y telas de asbesto

Gradillas

Espátula

Pinzas de disección

Estufa, Incubadora, Refrigerador.

MÉTODO

La prueba consistió en determinar la susceptibilidad de los microorganismos a los extractos metanólicos por el método de difusión en agar llamado cilindro-placa, el cuál consiste en la difusión del antibiótico por un cilindro vertical a una capa de agar solidificado en una caja de Petri hasta una extensión tal que el crecimiento del microorganismo adicionado se impide completamente en una área circular o zona alrededor del cilindro que contiene una solución de la sustancia antimicrobiana (37), utilizando para esto el agar de Müller-Hinton como medio de difusión del producto natural previamente disuelto en agua a diferentes concentraciones y contenido en los cilindros de acero.

Esta prueba requirió de :

- **Pocillos o cilindros** : Estos son de acero inoxidable con dimensiones de 10 mm de longitud, 6 mm de diámetro interno, 8 mm de diámetro externo tienen una precisión de 1 mm., se conocen como pocillos de Heatley.

- **Cajas de Petri de vidrio** : Con medidas de 20 mm de altura X 100 mm de diámetro.

- **Medio de cultivo** : Se utilizaron medios comerciales ideados para trabajos de ensayo a fin de obtener resultados reproducibles. Se requirieron de dos medios de cultivo para la capa base y de otro para la capa siembra.

Capa base : Müller - Hinton para el caso de bacterias.

Dextrosa sabouraud para el caso de levadura.

Capa siembra : Antibiótico # 11 para todas las cepas.

- Microorganismo : Se realizaron bioensayos con dos tipos de microorganismos estos fueron bacterias y levaduras, las cuales para ser utilizadas en este tipo de pruebas no deben tener una respuesta previsible de susceptibilidad y además deben ser de crecimiento rápido cuyo punto terminal pueda determinarse en 18 a 24 hr.

El grupo de bacterias se dividió en microorganismos Gram (+) y microorganismos Gram (-); utilizando dos especies de cada grupo las cuales fueron: Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, respectivamente, y una levadura que fue Candida albicans.

- Suspensión bacteriana : Se mantuvieron los microorganismos sobre tubos inclinados del medio siembra (Agar antibiótico No. 11). Se prepararon las suspensiones que se emplearon lavando los microorganismos de un cultivo en tubo inclinado el cual tenía 24 hr de incubación, con 2-3 ml de solución salina isotónica estéril al 0.9 %, se adicionaron al medio de capa siembra comparando la suspensión bacteriana con el patrón de turbidez de Macfarland No. 1 (0.1 ml de $BaCl_2$ al 1% y 9.9 ml de H_2SO_4), con lo cual se obtuvo una concentración aproximada de 3×10^8 células/ml, posteriormente se adicionó 1.5 ml de la suspensión estandarizada a 100 ml de medio siembra (10, 25), quedando de esta forma una concentración final de 4.5×10^6 células/ml.

De cada extracto se midieron 6 diámetros por concentración (5 concentraciones) para cada cepa que se manejo, y 6 diámetros que responden al control correspondiente según la cepa.

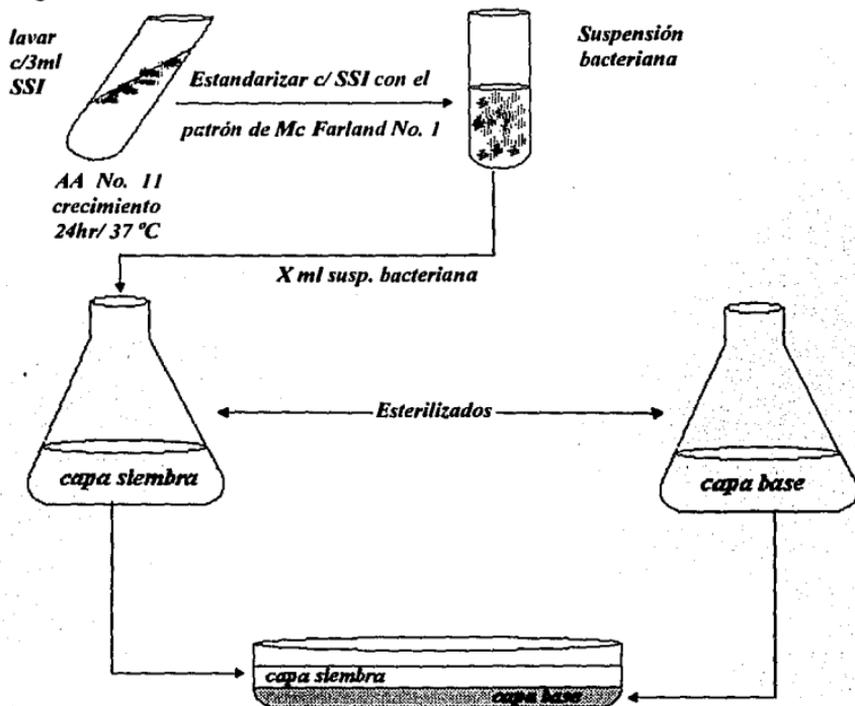
En el siguiente cuadro se muestra como se manejo cada extracto para poder analizar los resultados estadísticamente:

Cuadro No. 4. Manejo de los resultados obtenidos con cada extracto para el análisis estadístico.

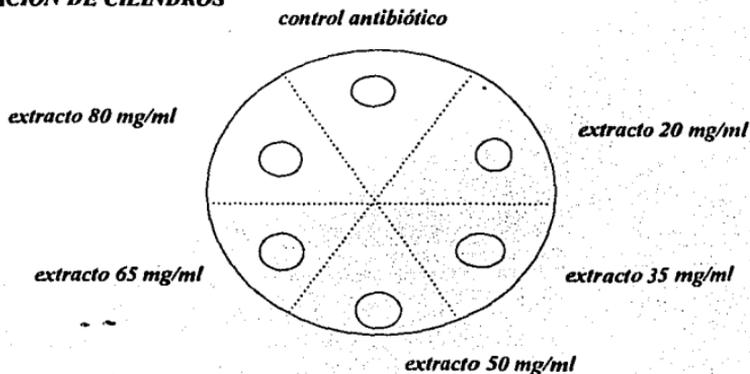
CONTROLES:	No. DIÁMETROS	n PARA C/PROM.	No. CEPAS
GENTAMICINA 10µg/ml	12	6 por cepa	2: <u>E.coli</u> , <u>P.aeruginosa</u>
VANCOMICINA 30 "	12	6 por cepa	2: <u>S. aureus</u> , <u>B. subtilis</u>
NISTATINA 1.2 "	6	6	1: <u>C. albicans</u>
EXTRACTO mg/ml			
20	6	6	5
35	6	6	5
50	6	6	5
65	6	6	5
80	6	6	5

Total de diámetros medidos: 90 para cada extracto (6 por cada concentración 5 concentraciones son 30 diámetros, para el análisis se utilizaron los datos de 3 cepas que fueron los de una bacteria Gram (+) una bacteria Gram (-) y una levadura)

Diagrama No. 1. FLUJOGRAMA DEL METODO



COLOCACIÓN DE CILINDROS



DILUCIONES ESTANDAR DE LOS ANTIBIÓTICOS Y DE LOS EXTRACTOS.

Las diluciones se prepararon en base al valor de la potencia reportada en la literatura (25, 34), la preparación de las soluciones se realizó de la siguiente manera:

GENTAMICINA

Potencia 590 $\mu\text{g}/\text{mg}$

10 μg producen halo de inhibición de 13 mm

590 μg ----- 1000 μg

10 μg ----- X

X= 16.94915 μg (10ml) volumen que se desea

preparar

= 169.4915 $\mu\text{g}/\text{ml}$

1000 μg ----- 1 mg

169.4915 μg ----- X

X= 0.169491 mg/ml

El inyectable utilizado contiene 10 mg de gentamicina / ml

10 mg ----- 1 ml

0.1694915 mg ----- X

X= 0.01694 ml del inyectable para preparar

10 ml de solución con una concentración de

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

NISTATINA

Potencia no menos de 4400 unidades/mg

1.2 µg/ml es la concentración mínima inhibidora

$$1000 \mu\text{g} \text{ ---- } 4400 \text{ UI}$$

$$1.2 \mu\text{g} \text{ ---- } X \quad X = 5.28 \text{ UI/ml}$$

La suspensión utilizada contiene 100,000 UI

$$\frac{1\text{mg}}{4400\text{UI}} \times 100,000 \text{ UI} = 22.7272 \text{ mg/ml}$$

$$22.7272 \text{ mg} \text{ ---- } 1 \text{ ml}$$

$$1.2 \text{ mg} \text{ ---- } X \quad X = 0.0528 \text{ ml}$$

$$\frac{(1.2\text{mg} / \text{ml})(10\text{ml})}{22.7272\text{mg} / \text{ml}} = 0.5280 \text{ ml de la suspensión comercial para preparar}$$

10 ml de solución con una concentración de 1.2 µg/ml.

VANCOMICINA

Potencia aproximadamente 1000 µg/mg

30 µg/ml producen una zona de inhibición con diámetros entre 15 - 19 mm.

$$1000 \mu\text{g} \text{ ---- } 30 \mu\text{g}$$

$$1000 \mu\text{g} \text{ ---- } X \quad X = 30 \mu\text{g} (25 \text{ ml }) \text{ volumen que se preparó}$$
$$= 750 \mu\text{g/ml}$$

1000 μg ---- 1 mg

750 μg ---- X X= 0.75 mg/ml

El inyectable utilizado contiene 50 mg / ml

50 mg ---- 1 ml

0.75 mg ---- X X= 0.015 ml del inyectable para preparar

25 ml de solución con una concen-

tración de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$

DILUCIÓN DE LA SUSTANCIA PROBLEMA (EXTRACTOS)

Se prepararon soluciones de los dos extractos con diferentes concentraciones las cuales fueron: 20, 35, 50, 65, 80 mg/ml.

Todas las diluciones se aforaron con agua estéril hasta los volúmenes deseados.

PRUEBAS DE ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO.

Se prepararon diluciones con los extractos a las concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 10, 20, 40, 80, 100 mg/ml con las cuales se realizaron pruebas preliminares (con la finalidad de estandarizar el método) consistentes en colocar en los cilindros aproximadamente 0.5 ml las diluciones anteriores, los cilindros previamente se habían colocado en las cajas Petri que contenían agar Müller-Hinton el cuál había sido inoculado con una suspensión de 10^6 bacterias/ml (utilizando patrón No. 1 de Mcfarland de turbidez),

los cilindros se colocaron en las cajas a una distancia aproximada de 60° entre sí. En estas cajas se utilizó un control que fue el de Gentamicina (10 µg/ml) el cual es conocida su actividad antimicrobiana; se utilizó para el ensayo una presentación comercial que fue GARAMICINA (inyectable). Después de 24 hrs de incubación a 37°C se efectuó en las placas la medición de los diámetros del halo de inhibición en la periferia de los cilindros utilizando para ello un Vernier que es un instrumento graduado que nos proporciona una medición exacta.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES PARA ESTANDARIZAR

EL MÉTODO

De estas pruebas preliminares las concentraciones utilizadas más bajas (0.1 - 1.0 mg/ml) no produjeron halos de inhibición mayores que el control (cuadro 5), sin embargo, de las concentraciones de 10 - 100 mg/ml se observaron mayores inhibiciones de crecimiento (cuadro 6) pero, las inhibiciones obtenidas a 10 y 100 mg/ml produjeron inhibiciones similares, lo que nos llevo a realizar cambios en las concentraciones utilizando ahora las concentraciones que estuvieron en el rango comprendido de 20 a 80 mg/ml, estas concentraciones fueron de 20, 35, 50, 65, 80 mg/ml con las cepas de Escherichia coli y Pseudomona auruginosa de los cuales se obtuvieron los resultados que se muestran en los cuadros 7 y 8.

Cuadro 5. Resultados obtenidos con el extracto de A. littoralis sobre un microorganismo (E. coli), utilizando las concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg/ml de extracto y un control (antibiótico). Resultados para estandarizar el método.

CAJA	1	2	3	4	5	6
GENT 10	11.0	11.5	12.0	15.0	15.0	12.5
EXTR 0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.8	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1.0	13.0	0.0	0.0	11.0	0.0	0.0

Cuadro 6. Resultados obtenidos con el extracto de *A. littoralis* sobre un microorganismo (*E. coli*), utilizando las concentraciones de 10, 20, 40, 80 y 100 mg/ml de extracto y un control (antibiótico). Resultados para estandarizar el método.

CAJA	1	2	3	4	5	6
GENT 10	10.0	10.5	11.5	11.5	13.5	12.0
EXTR 10	0.0	0.0	9.0	0.0	11.0	0.0
20	10.0	0.0	13.0	0.0	13.0	11.0
40	12.0	0.0	11.0	0.0	11.0	14.0
80	13.0	0.0	13.0	0.0	12.0	11.0
100	0.0	0.0	0.0	0.0	11.0	0.0

Cuadro 7. Resultados obtenidos con el extracto de *A. littoralis* sobre *E. coli*, utilizando las concentraciones de 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml de extracto y un control (antibiótico). Resultados para estandarizar el método.

CAJA	1	2	3	4	5	6
GENT 10	15.0	15.0	0.0	0.0	0.0	0.0
EXTR 20	13.0	15.0	0.0	0.0	0.0	0.0
35	0.0	16.0	0.0	0.0	0.0	0.0
50	12.0	16.0	0.0	0.0	0.0	0.0
65	13.0	15.0	0.0	0.0	0.0	0.0
80	10.0	14.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Cuadro 8 Resultados obtenidos con el extracto de A. littoralis sobre P. aeruginosa, utilizando las concentraciones de 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml de extracto y un control (antibiótico). Resultados para estandarizar el método.

CAJA	1	2	3	4	5	6
GENT 10	10.0	14.0	14.0	13.0	0.0	0.0
EXTR 20	15.0	11.0	12.0	16.0	0.0	0.0
35	12.0	14.0	12.0	18.0	0.0	0.0
50	12.0	15.0	13.0	17.0	0.0	0.0
65	11.0	13.0	12.0	18.0	0.0	0.0
80	10.0	0.0	10.0	14.0	0.0	0.0

Posterior a las pruebas preliminares se probaron las siguientes concentraciones del extracto (20, 35, 50, 65, 80 mg/ml), para las cinco cepas. Se utilizaron controles que consistieron en formas farmacéuticas de sustancias con actividad antimicrobiana evaluada por método de difusión, estos controles fueron:

GENTAMICINA- 10 µg/ml la cual produce una inhibición de 13 mm o más. Lab. Schering Plough, inyectable 20 mg/ml."Garamicina". Se utilizó este control para las cepas de Escherichia coli y Pseudomonas aeruginosa.

VANCOMICINA- 30 µg/ml que producen una inhibición de 15 - 19 mm. Lab. Lilly, inyectable 500 mg. "Vancocin C.P.". Se utilizó este control para las cepas de Staphylococcus aureus y Bacillus subtilis.

NISTATINA- 1.2 µg/ml mínima concentración inhibidora. Lab. SQUIBB, polvo para suspensión 100,000 UI "Micostatin". Se utilizó este control para la cepa de Candida albicans.

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL EXTRACTO METANÓLICO DE Aristolochia littoralis.

Después de 24 hrs de incubación a 37° C, se efectuó la lectura de los diámetros de inhibición en la periferia de los cilindros. Los resultados obtenidos nos muestran, para: Escherichia coli : La inhibición en las seis cajas con cinco diferentes concentraciones del extracto y el control correspondiente, la inhibición que se obtuvo fue gradual y proporcional a la concentración del extracto utilizado llegando a un máximo con la concentración de 50 mg/ml (Figura No. 7) ; posteriormente disminuyó el halo de inhibición; esto concuerda con los diámetros medidos en las seis placas los cuales se presentan en el cuadro No. 9. También observamos que el halo de inhibición del control es mayor que el que presenta el extracto, siendo el promedio del control = 14.667 mm. y promedio del extracto a 50 mg/ml 14.5 mm.

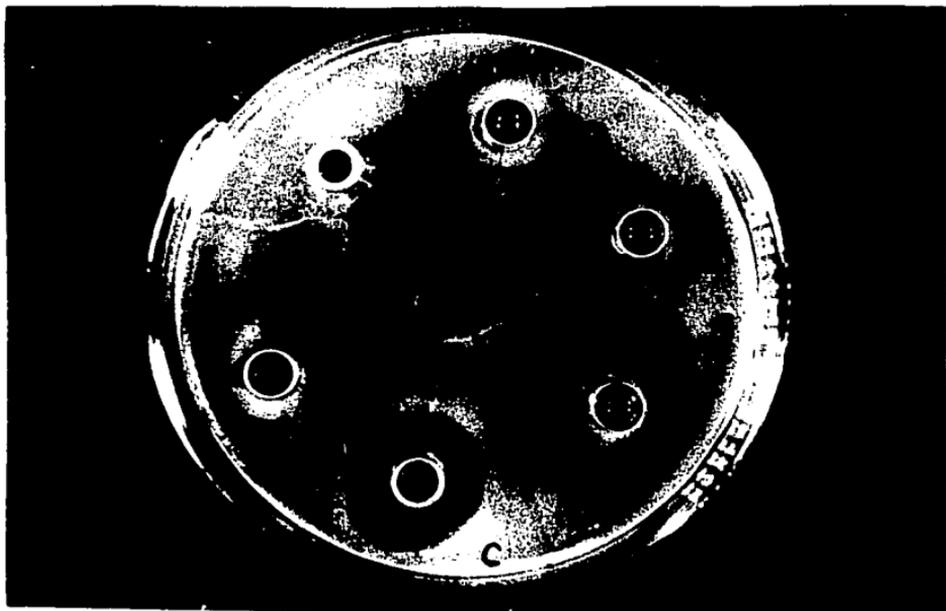


Figura No. 7. Caja sembrada en la superficie con una cepa estándar de E. coli. En los cilindro abiertos se puso una cantidad de diferentes concentraciones del extracto metanólico de A. littoralis que contenían 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml y una cantidad de un control que fue de Gentamicina que contenía 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, se incubaron posteriormente las cajas durante toda la noche.

Cuadro 9. Resultados obtenidos con el extracto de *A. littoralis* sobre *Escherichia coli*, utilizando las concentraciones de 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml de extracto y Gentamicina como control (10 µg/ml). Resultados para el análisis estadístico.

CAJA	1	2	3	4	5	6	Promedio
GENT 10	15.0	15.0	17.0	14.0	14.0	13.0	14.667
EXTR 20	13.0	15.0	11.0	11.0	14.0	9.0	12.167
35	0.0	16.0	14.0	11.0	15.0	13.0	11.5
50	12.0	16.0	14.0	14.0	16.0	15.0	14.5
65	13.0	15.0	11.0	10.0	12.0	0.0	10.16
80	10.0	14.0	9.0	0.0	0.0	0.0	5.5

Pseudomonas aeruginosa. Con el mismo número de cajas (6) se observa visualmente una mayor inhibición que con la cepa de *E. coli* con las diferentes concentraciones del extracto (Figura No. 8) que concuerda con los diámetros medidos, al igual que con *E. coli*, la inhibición aumenta en forma gradual y disminuye a partir de 50 mg/ml (cuadro 10). Con estos resultados se observa una mayor inhibición con la sustancia control que con el extracto.

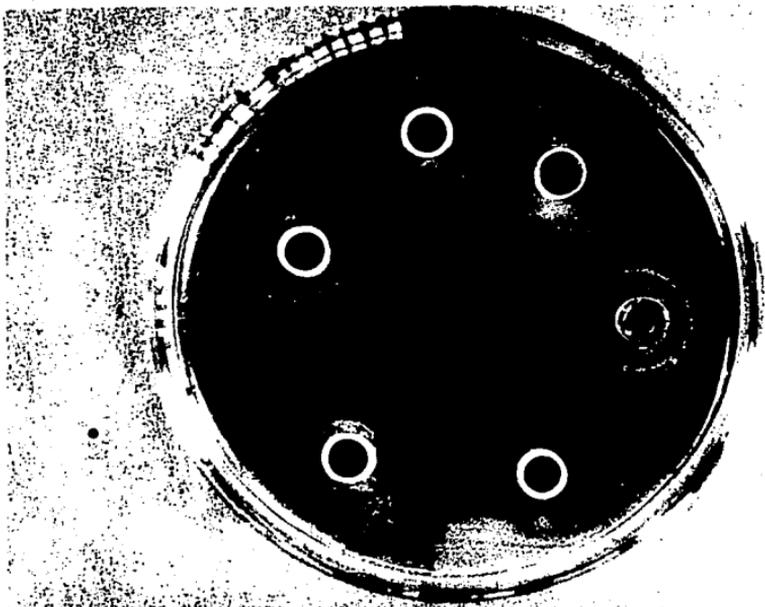


Figura No. 8. Caja sembrada en la superficie con una cepa estándar de *P. aeruginosa*. En los cilindros abiertos se puso una cantidad de diferentes concentraciones del extracto metanólico de *A. littoralis* que contenían 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml y una cantidad de un control que fue de Gentamicina que contenía 10 μ g/ml, respectivamente, se incubaron posteriormente las cajas durante toda la noche.

Cuadro 10. Resultados obtenidos con el extracto de *A. littoralis* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando las concentraciones de 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml de extracto y Gentamicina como control (10 µg/ml). Resultados para el análisis estadístico.

CAJA	1	2	3	4	5	6	Promedio
GENT 10	10.0	14.0	14.0	13.0	14.0	14.0	13.167
EXTR 20	15.0	11.0	12.0	16.0	9.0	9.0	12.000
35	12.0	14.0	12.0	18.0	10.0	11.0	12.830
50	12.0	15.0	13.0	17.0	10.0	11.0	13.000
65	11.0	13.0	17.0	18.0	0.00	00.0	9.000
80	10.0	0.00	10.0	14.0	0.00	0.00	5.667

Staphylococcus aureus. En estos resultados el halo de inhibición formado por el extracto es mayor que el halo de inhibición producido por la sustancia control; además de que como se observa en la figura No. 9 los halos formados están más marcados que los halos de las cepas Gram (-), de igual forma los diámetros medidos son mayores que los del control en donde el extracto tiene un halo de inhibición promedio de 17.67 mm para la concentración de 50 mg/ml que fue la concentración que mayor inhibición produjo y el control tuvo una inhibición promedio de 15.83 mm (ver cuadro 11), con esta cepa al igual que con las Gram (-) la inhibición disminuye a partir de la concentración de 50mg/ml.

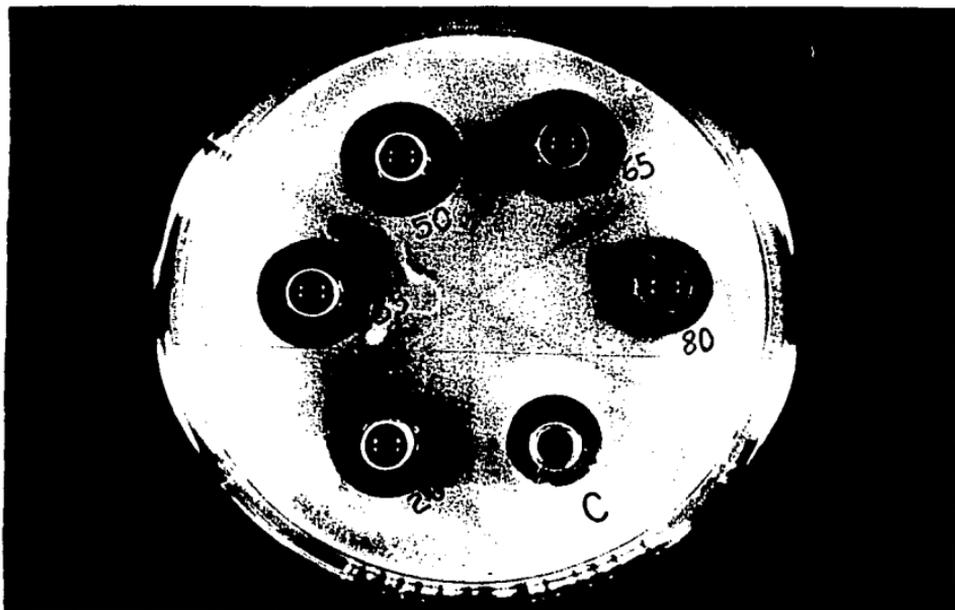


Figura No. 9. Caja sembrada en la superficie con una cepa estándar de S. aureus. En los cilindros abiertos se puso una cantidad de diferentes concentraciones del extracto metanólico de A. littoralis que contenían 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml y una cantidad de un control que fue de Vancomicina que contenía 30 μ g/ml, respectivamente, se incubaron posteriormente las cajas durante toda la noche.

Cuadro 11. Resultados obtenidos con el extracto de *A. littoralis* sobre *Staphylococcus aureus*, utilizando las concentraciones de 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml de extracto y Vancomicina como control (30 µg/ml). Resultados para el análisis estadístico.

CAJA	1	2	3	4	5	6	Promedio
VANC 30	14.0	14.0	14.0	18.0	17.0	18.0	15.830
EXTR 20	17.0	17.0	16.0	14.0	18.0	15.0	16.167
35	18.0	16.0	16.0	17.0	16.0	18.0	16.830
50	16.0	15.0	18.0	20.0	18.0	19.0	17.670
65	15.5	14.0	17.0	17.0	17.00	17.0	16.250
80	16.0	15.0	14.0	17.0	16.00	16.5	15.750

***Bacillus subtilis*.** Con esta bacteria los halos de inhibición producidos por el extracto fueron menores que los del control (Figura No. 10), en donde esta sustancia tuvo un promedio del halo de inhibición de 18.5 mm y el extracto a una concentración de 50mg/ml tuvo un promedio de 11.416 mm, en general los diámetros medidos del extracto son menores al diámetro del control como se puede observar en el cuadro 12.

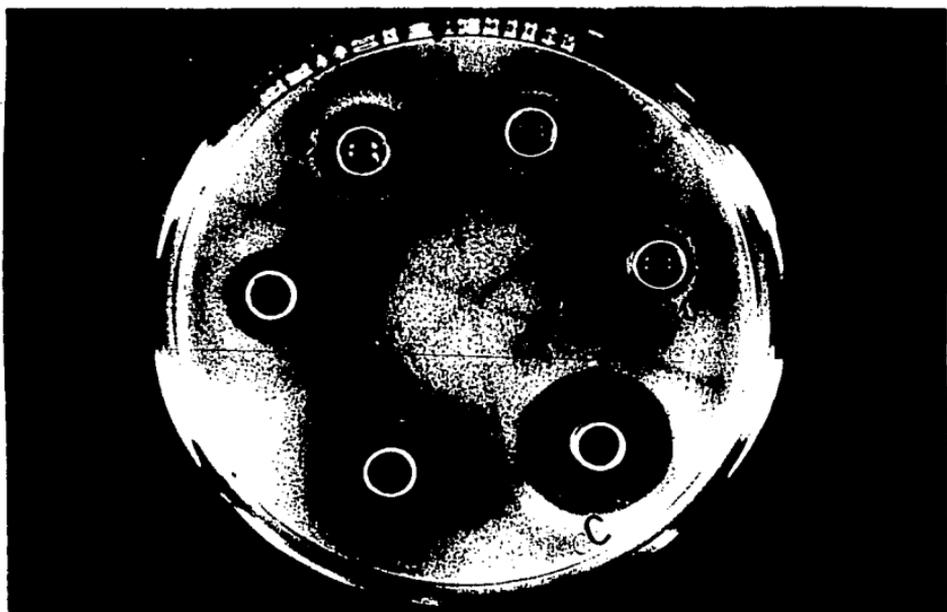


Figura 10. Caja sembrada en la superficie con una cepa estándar de B. subtilis. En los cilindros abiertos se puso una cantidad de diferentes concentraciones del extracto metanólico de A. littoralis que contenían 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml y una cantidad de un control que fue de Vancomicina que contenía 30 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, se incubaron posteriormente las cajas durante toda la noche.

Cuadro 12. Resultados obtenidos con el extracto de *A. littoralis* sobre *Bacillus subtilis*, utilizando las concentraciones de 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml de extracto y Vancomicina como control (30 µg/ml). Resultados para el análisis estadístico.

CAJA	1	2	3	4	5	6	Promedio
Vanco. 30	17.0	16.0	21.0	15.0	24.0	18.0	18.500
EXTR. 20	13.0	13.0	15.0	15.0	14.0	14.0	14.000
35	16.0	14.0	14.0	16.0	15.0	14.0	14.830
50	11.0	9.00	14.0	10.5	13.0	11.0	11.410
65	10.5	11.0	11.0	12.0	13.00	13.0	11.677
80	10.0	10.0	10.0	12.0	13.00	12.5	11.167

Candida albicans. El extracto a esta levadura no produjo efecto alguno, la inhibición observada es con la sustancia control como se puede observar en la figura No. 11, y cuyo diámetro en promedio fue de 15.83 mm.

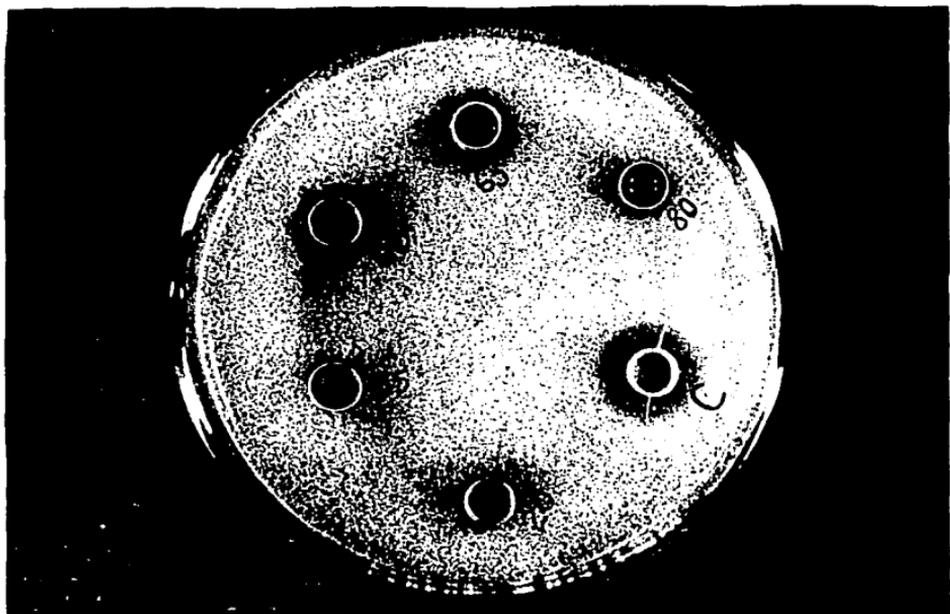


Figura No. 11. Caja sembrada en la superficie con una cepa estándar de *C. albicans*. En los cilindros abiertos se puso una cantidad de diferentes concentraciones del extracto metanólico de *A. littoralis* que contenían 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml y una cantidad de un control que fue de Nistatina que contenía 1.2 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, se incubaron posteriormente las cajas durante toda la noche.

Con los resultados anteriores se decidió que cepas debería utilizar para el extracto de Aristolochia grandiflora llegando a la conclusión de sólo utilizar las cepas que habían mostrado más susceptibilidad, estas fueron una Gram (-), Pseudomonas aeruginosa; una Gram (+), Staphylococcus aureus y Candida albicans que aunque no mostró susceptibilidad alguna se eligió por ser la única levadura que se trabajó.

RESULTADOS OBTENIDOS CON EL EXTRACTO METANÓLICO DE Aristolochia grandiflora

Los resultados obtenidos con este extracto se compararon con las sustancias control utilizadas para el extracto de A. littoralis (gentamicina, vancomicina, nistatina).

Después de 24 hrs de incubación a 37^o C se efectuó la medición de los halos de inhibición de crecimiento en la periferia de los cilindros utilizando para ello un Vernier.

De los resultados obtenidos tenemos que:

Pseudomonas aeruginosa. Muestra una susceptibilidad al extracto de Aristolochia grandiflora, semejante a la mostrada con el extracto de Aristolochia littoralis, la inhibición es gradual a la concentración, sin embargo, se observa una mayor inhibición con el control (Figura No. 12); con el extracto la mayor inhibición se obtiene con la concentración de 50 mg/ml, en donde el promedio del control es de 13.83 mm y del extracto a 50 mg/ml es de 5.5 mm) estos resultados se muestran en el cuadro No. 13.

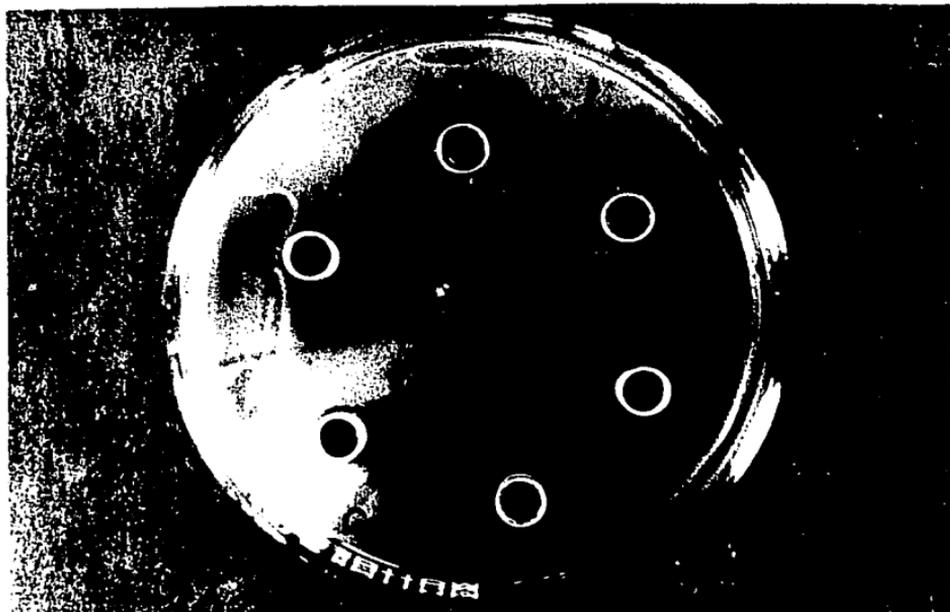


Figura No. 12. Caja sembrada en la superficie con una cepa estándar de *Pseudomonas aeruginosa*. En los cilindros abiertos se puso una cantidad de diferentes soluciones del extracto de *A. grandiflora* que contenían 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml y un control que fue de Gentamicina el cual contenía 10 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, posteriormente se incubaron las cajas durante toda la noche.

Cuadro 13. Resultados obtenidos con el extracto de *A. grandiflora* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando las concentraciones de 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml de extracto y Gentamicina como control (10 µg/ml). Resultados para el análisis estadístico.

CAJA	1	2	3	4	5	6	PROM.
GENT 10	12	12	15	14	14	16	13.83
EXTR 20	--	--	--	--	--	--	--
35	9	--	--	--	--	9	3
50	12	10	--	--	--	11	5.5
65	12	9	--	--	11	9	6.83
80	11	9	--	--	10	9	6.5

Staphylococcus aureus. Los halos de inhibición con este microorganismo son claramente observables ya que están perfectamente definidos, como sucedió con *Aristolochia littoralis*, pero los diámetros de *Aristolochia grandiflora* fueron más pequeños que con ésta (Figura No. 13). Con *Aristolochia grandiflora* la inhibición va aumentando hasta la concentración de 50 mg/ml y posteriormente disminuye; al calcular los promedios tenemos que la inhibición del extracto a la concentración de 50 mg/ml es mayor que la inhibición del control (cuadro No. 14) ya que los valores son, para el control de 15.167 mm y para el extracto a esta concentración de 15.9167 mm .

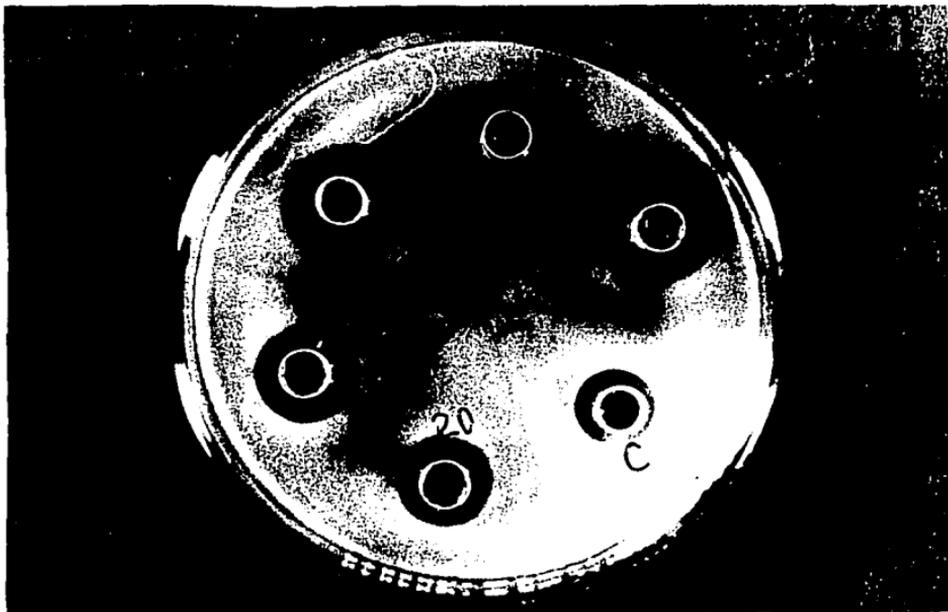


Figura No. 13. Caja sembrada en la superficie con una cepa estándar de Staphylococcus aureus. En los cilindros abiertos se puso una cantidad de diferentes soluciones del extracto de A. grandiflora que contenían 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml y un control que fue de Vancomicina el cual contenía 30 μ g/ml, respectivamente, posteriormente se incubaron las cajas durante toda la noche.

Cuadro 14. Resultados obtenidos con el extracto de *A. grandiflora* obre *Staphylococcus aureus*, utilizando las concentraciones de 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml de extracto y Vancomicina como control (30 µg/ml). Resultados para el análisis estadístico.

CAJA	1	2	3	4	5	6	PROM.
VANC30	12	14	14	16	18	17	15.157
EXTR 20	14	15	15	15	15	15.5	14.9167
35	15.5	16	16	16	15	16	15.75
50	17	16.5	16	15	17	14	15.9167
65	18	15	15	15	15.5	13	15.25
80	16	16	16	17	16	12	15.5

Candida albicans. El extracto no mostró inhibición en la periferia de los cilindros con esta cepa, el halo de inhibición que se observó fue obtenido con la sustancia control (Figura No. 14) y cuyo valor promedio fue de 17.66 mm.

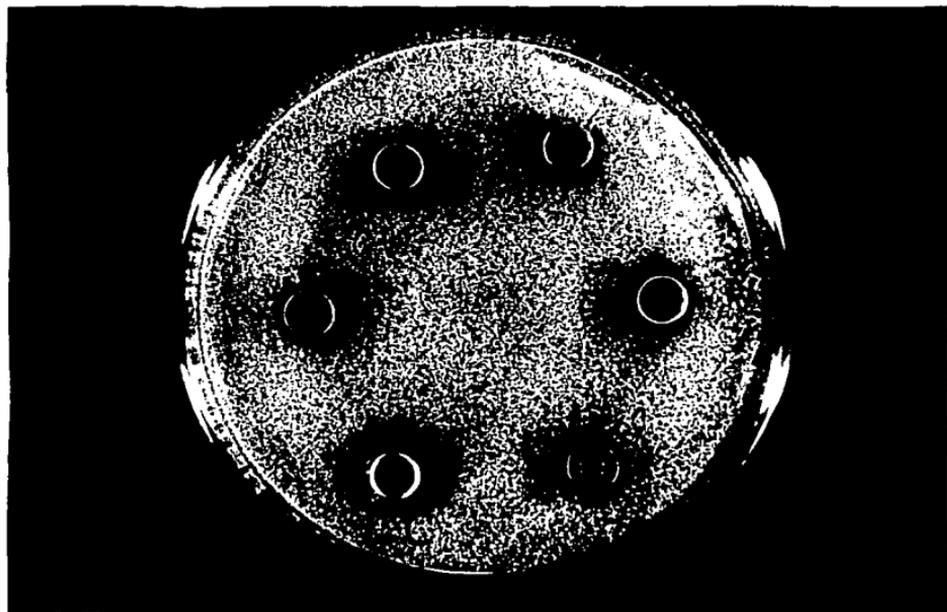


Figura No. 14. Caja sembrada en la superficie con una cepa estándar de Candida albicans. En los cilindros abiertos se puso una cantidad de diferentes soluciones del extracto de A. grandiflora que contenían 20, 35, 50, 65 y 80 mg/ml y un control que fue de Nistatina el cual contenía 1.2 μ g/ml, respectivamente, posteriormente se incubaron las cajas durante toda la noche.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó por medio de un diseño en bloques aleatorios y posteriormente se utilizó la prueba de TUKEY, ya que esta prueba no exige homogeneidad en las varianzas además de que es aplicable a modelos experimentales carentes de ortogonalidad, es decir, es aplicable en los contrastes dependientes de una muestra testigo bien identificada para medir, así, las diferencias que pudieran existir en las otras muestras (10).

El análisis estadístico se realizó como a continuación se describe:

1er. diseño:

Tratamiento = especies : 1-Aristolochia littoralis - A1

2-Aristolochia grandiflora - A2

3-Control : Vancomicina - A3

Gentamicina

Bloque = bacteria : 1-Pseudomonas aeruginosa - B1

2-Staphylococcus aureus - B2

La variable de respuesta fue el efecto de inhibición de crecimiento de los extractos sobre los microorganismos trabajados, este efecto fue medido en milímetros.

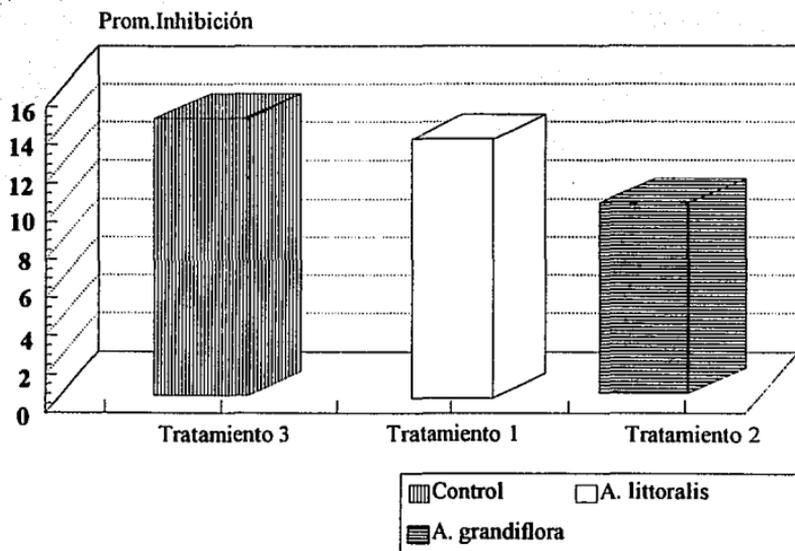
Se utilizaron promedios totales, es decir, de las cinco concentraciones del extracto y de total de los diámetros obtenidos con el control.

BLOQUE	B1	B2
TRATAMIENTO		
A1	10.5	16.555
A2	4.367	15.467
A3	13.5	15.5

El tratamiento estadístico que se empleó para analizar los datos fue un diseño en bloques aleatorios.

La DMS no se da por lo que esta prueba no es significativo, $P > 0.05$ (Gráfica 1).

DISEÑO 1



GRÁFICA 1. En esta gráfica se muestra el promedio de inhibición con las 2 Aristolochias (tratamientos) y el control (antibiótico) para *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* se tomo el promedio de 60 diámetros medidos (6 cajas, 5 concentraciones por cepa) para cada tratamiento y el promedio de 12 diámetros para el control, los datos obtenidos al compararlos con el control, estadísticamente no son significativos; $P > 0.05$ (Prueba de Tukey).

2o. diseño:

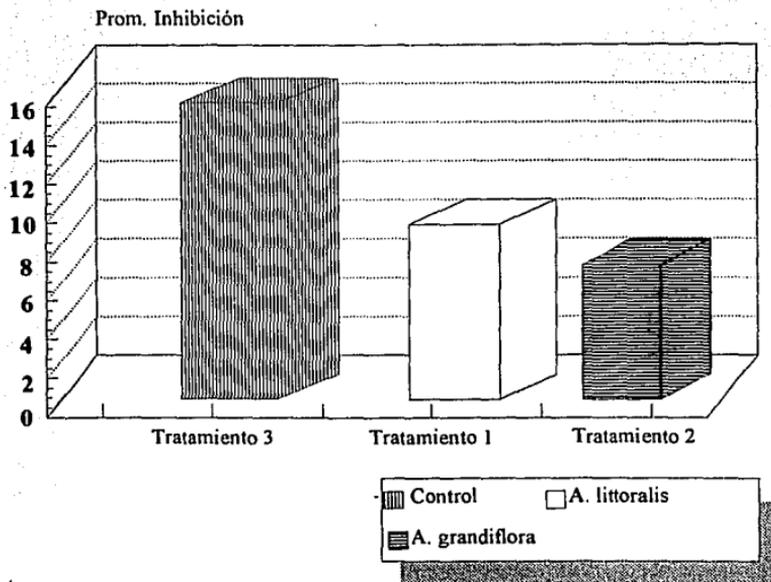
En este diseño se aumentaron los resultados obtenidos con Candida albicans (B3) y de su control que fue nistatina.

BLOQUE	B1	B2	B3
TRATAMIENTO			
A1	10.500	16.533	0.000
A2	4.367	15.467	0.000
A3	13.500	15.500	16.75

El tratamiento estadístico que se empleo para analizar los datos fue un diseño en bloques aleatorios.

La diferencia entre ellos es de 6.239, 8.639 y 2.4, estas diferencias son mayores a la DMS; por lo que este diseño no es significativo $P > 0.05$ (Gráfica 2).

DISEÑO 2



GRÁFICA 2. En esta gráfica se muestra el promedio de inhibición con las 2 Aristolochias (tratamientos) y el control (antibiótico) para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* se tomó el promedio de 90 diámetros medidos (6 cajas, 5 concentraciones por cepa) para cada tratamiento y el promedio de 18 diámetros para el control, los datos obtenidos al compararlos con el control, estadísticamente no son significativos $P > 0.05$ (Prueba de Tukey).

3er. diseño:

Es un diseño factorial 2 X 5 donde el primer factor son los extractos de estudio con 2 niveles (tratamientos) que fueron:

Tratamiento : A1 - Aristolochia littoralis para Gram (-) y Gram (+)

A2 - Aristolochia grandiflora para Gram (-) y Gram (+)

El segundo factor es la concentración de estos extractos con 5 niveles que fueron:

C1 = 20 mg/ml

C2 = 35 mg/ml

C3 = 50 mg/ml

C4 = 65 mg/ml

C5 = 80 mg/ml

El arreglo de las unidades experimentales fue en bloques al azar; donde los bloques son:

B1 = Pseudomonas aeruginosa bacteria Gram (-)

B2 = Staphylococcus aureus bacteria Gram (+)

A continuación se reportan los promedios de cada concentración (6 lecturas por cepa) :

CONC.	C1	C2	C3	C4	C5	BLOQUE
A1*	12.000	12.833	13.000	9.000	5.667	G (-)
	16.667	16.830	17.670	16.250	15.750	G (+)
A2^		3.000	5.500	6.830	6.500	G (-)
	14.916	15.750	15.916	15.250	15.500	G (+)

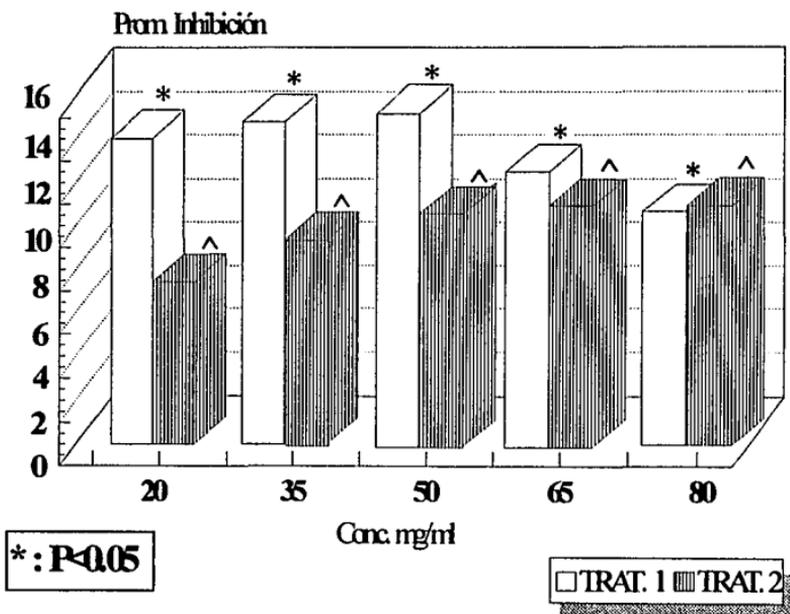
Con el análisis estadístico se observó que los datos obtenidos con el tratamiento A1* (A. littoralis) fueron significativos con relación a los del tratamiento A2^ (A. grandiflora); $P < 0.05$. Ver gráfica 3.

El análisis posterior que se realizó en primer lugar fue en base al tratamiento, y en segundo lugar en base a la concentración utilizando para ello la prueba de Tukey.

Del análisis en base al tratamiento tenemos que la diferencia entre uno y otro es de 3.6 esta es mayor a la DMS por lo que este diseño si es significativo $P < 0.05$ (Gráfica 3).

Del análisis estadístico en base a las concentraciones tenemos que la diferencia entre ellos no es mayor a 6.1625 (DMS) por lo que este diseño no es significativo $P > 0.05$.

DISEÑO 3



GRÁFICA 3. En esta gráfica se muestra el promedio del diámetro de inhibición de cada concentración para el tratamiento 1 (*A. littoralis*) y el tratamiento 2. (*A. grandiflora*) Cada tratamiento corresponde a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* con 12 diámetros medidos por concentración para cada tratamiento (6 diámetros por cepa), los datos obtenidos al compararlos entre si estadísticamente si son significativos esto es que $P < 0.05$ (Prueba de Tukey).

4o. diseño.

En este se aumentaron los resultados de Candida albicans como un bloque más siendo el mismo diseño y los dos tratamientos que el anterior.

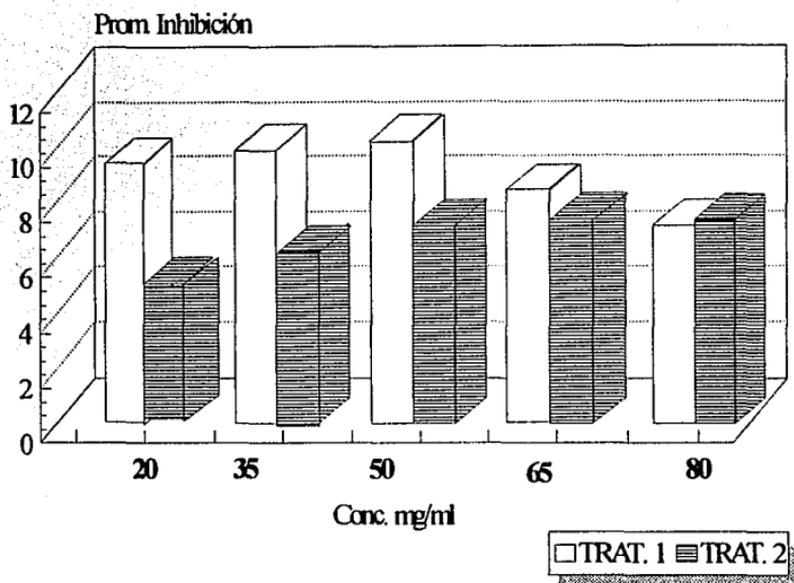
CONC.	C1	C2	C3	C4	C5	BLOQUE
A1	12.000	12.833	13.000	9.000	5.667	G (-)
	16.167	16.833	17.667	16.250	15.570	G (+)
	----	----	----	----	----	LEV.
A2	----	3.000	5.500	6.830	6.500	G (-)
	14.916	15.750	15.916	15.250	15.500	G (+)
	----	----	----	----	----	LEV.

El análisis estadístico que se realizó fue un diseño factorial 2 X 5, posteriormente se realizaron 2 pruebas de Tukey en base al tratamiento y en base a la concentración.

Para el análisis en base al tratamiento tenemos que la diferencia entre uno y otro es de 2.4 y esta es menor a la DMS por lo que este diseño es significativo; $P < 0.05$ (Gráfica 4).

Para el análisis en base a las concentraciones tenemos que la DMS entre ellos no es mayor a 4.0665 por lo que este diseño no es significativo ($P > 0.05$).

DISEÑO 4



GRÁFICA 4. En esta gráfica se muestra el promedio del diámetro de inhibición de cada concentración para el tratamiento 1 (*A. littoralis*) y el tratamiento 2 (*A. grandiflora*). Cada tratamiento corresponde a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* con 18 diámetros medidos para cada tratamiento (6 diámetros por cepa), los

VII. CONCLUSIONES

- El extracto de A. littoralis a la concentración de 50 mg/ml sobre bacterias Gram (-) produjo halos de inhibición con un diámetro en promedio de 14.5 mm para E. coli y de 13.0 mm para P. aeruginosa.
- La gentamicina a la concentración de 10 µg/ml sobre bacterias Gram (-) con el extracto de A. littoralis produjo halos de inhibición con un diámetro en promedio de 13.917 mm, este resultado concuerda con lo reportado en literatura.
- El extracto de A. littoralis a la concentración de 50 y 35 mg/ml sobre bacterias Gram (+) produjo halos de inhibición con un diámetro en promedio de 17.67 mm para S. aureus y de 14.83 mm para B. subtilis.
- La vancomicina a la concentración de 30 µg/ml sobre bacterias Gram (+) con el extracto de A. littoralis produjo halos de inhibición con un diámetro en promedio de 17.165 mm, este resultado concuerda con lo reportado en literatura.
- El extracto de A. grandiflora a la concentración de 50 mg/ml produjo halos de inhibición con un diámetro en promedio de 5.5 mm para las bacterias Gram (-) y de 15.916 mm para las bacterias Gram (+).
- Los controles con este extracto produjeron halos de inhibición que fueron de : Gentamicina = 13.83 mm para las bacterias Gram (-); y Vancomicina = 15.157 mm para las bacterias Gram (+).

- La vancomicina produjo halos de inhibición sobre bacterias Gram (+) menores que los halos de inhibición producidos por el extracto de A. littoralis y de A. grandiflora.
- Los halos de inhibición obtenidos en el laboratorio con ambos controles fueron similares a los reportados en la literatura con lo que se comprobó la potencia de los fármacos utilizados.
- Los extractos totales de A. littoralis y A. grandiflora provocaron la inhibición del crecimiento de las bacterias utilizadas, estos datos concuerdan con el efecto antimicrobiano obtenido con otras especies Aristolochias.
- Al concluir este trabajo nos damos cuenta de la importancia que tiene el conocer la medicina tradicional del país así como el de hacer un estudio profundo de ella, puesto que México es un país rico en plantas medicinales las cuales pueden ser utilizadas como alternativas en el tratamiento de las enfermedades producidas por microorganismos para el mejoramiento de la salud humana.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Achary B.; Chakrabarty S.; Bandyop S. y Pakrashi S. C.; " *Studies on Indian medicinal plants. Part 69. A. New 4,S-dioxoaporphire and other constituents of A. indica Heterocycles* ". 1982; 19 (7) : 1203-1206.
2. Bailey, L. H. y Hortus, t. a. " *Concile dictionary of plantas cultivated in USA and Canada* " Millan Publishing, Co. Inc. N. Y. 1980; pp 449.
3. Baurer, A.W. ; Lampe, M. F. and Turck, M. " *Antibiotic susceptibility testing by standardizer single disk method* ". *Am. Journal Clin. Pathol.*; 1966; 45:493-496.
4. Barry, A.L., García, F. and Thrupp, L. D. " *An improved single disk method for testing the antibiotic susceptibility of rapidly growing phatogens* ". *Am. Journal Clin. Pathol.*; 1970; 53:149-158.
5. Braude Abrahn. E. Davis Carles. " *Microbiología Clínica* ". Ed. Medica Panamericana S.A. 1984; pp: 3-40.
6. Brettman L.R. " *Pathogenesis of urinary tract infections host susceptibility and bacterial virulence factors* ". *Urology*. 1988; 32[supl.]:9-11.

7. Camacho, U. D.; " *Estudio Químico de Aristolochia litoralis* "; Tesis de Maestría en Química Farmacéutica; U.N.A.M 1990.
8. Carboni, S.; Livi, O.; Segnini, D.; Mazzanti, L. " *Constituentes of A. rotunda* ". Gazz. Chim. Ital. 1966; 96 (5): 641-661.
9. Carreras, L.M. " *Quaternary bases and nitrophenanthrenes in A. baetica* " . An. Inst.Bot. A. J. Cavanilles. 1973; 30: 253-265.
10. Castilla Serna L., Travioto J., " *Estadística Simplificada para la Investigación en Ciencias de la Salud* " ,1991. De. Trillas
11. Collins, C.H. M. I. Biol FIMLT, " *Metodos Microbiológicos* " ; Ed. Acribia; 1987. pp 366-377.
12. Díaz J.L.; " *Usos de las plantas medicinales en México* "; Monografías Científicas IMEPLAM. México, D.F. 1976 ; pp 132.
13. Enriquez R. G., Chavez M. A., Reynolds W. F., " *Phytochemical Investigations of the genus Aristolochia* " , J. Nat. Prod. Sep-Oct 1984. 47:896-899.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

14. " *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* ".Secretaria de Salud; Quinta Edición; 1988. pp 72-85.
15. Finland, M. Changing. " *Patterns of susceptibility of common bacterial pathogens to antimicrobial agents* ". *Ann. Intern. Med.* , 1972; 76:1009.
16. Font, Q.P.; El discóridos renovado. " *Plantas Medicinales; Fam. 43ª Aristolochiaceas* "; Ed. Labor; Barcelona,1980, pp 193.
17. García Rodríguez J. A. " *Antimicrobianos, Microbiología y Parasitología Médica* " Barcelona, Ed. Salvat. 1987; pp 120-152.
18. Garibay A. M. " *Nombres Nahuas en Libellus Medicinalibus Indorum herbis* " ; de Martín de la Cruz, IMSS, México. 1972.
19. Gaspard, U. S. ; " *Metabolic effects of oral contraceptives* " . *Ann. J. Obstet. Gynecol.* 1987; 1029-1041.
20. Goodman-Gilman, A. " *Las bases farmacológicas de la terapéutica* "; Ed. Panamericana; 6ª edición México, 1990; pp 150-170.

21. Goodman, A., " *Las bases farmacológicas de la terapéutica* " Ed. Panamericana. México. 1991; pp 922, 1357-1358.
22. Hernández, F.; " *Historia Natural de Cayo Plinio II. Obras completas* ". Tomo IV, Volúmen I, Libro XXIV. UNAM. 1960.
23. Hinou J., Demetzos C., Harvala C., Roussakis C., " *Citotoxic and antimicrobial principles from the roots of Aristolochia longa* " , Int. J. Crude Drugs Res. Jun 1990. 28:149-151.
24. Lee H. S., Han D. S., " *New Acylated N-glycosyl lactam from Aristolochia contorta* " , J. Nat. Prod. 1992. 55:1165-1169.
25. Litter M.; " *Farmacología Experimental y Clínica* "; 5ª edición; Ed. El Ateneo. Argentina. 1977; pp 1510-1516.
26. Mahmood, K. ; Kaicheong, Ch. ; Nyung, H. P. ; Yong, N. H. ; Byung, H. H. " *Aristolactams of Orophea enterocarpa* " Phytochem. 1986; 25 (4):965-967.
27. Mix, D. B.; Guinaudeau, H.; Shamma, M.; " *The aristolochic acids and aristolactams* ". J. Nat. Prod. 1982; 45 (6) : 657-666.

28. Munavalli, S. ; Viel, C. " *Chemical, taxonomic and Pharmacologic study of Aristolochiaceae* ". An. Pharm. Fr. 1969; 27 (6) : 449-469, (7-8) : 519-533, (9-10) : 601-614.

29. National Committee for Clinical Laboratory Standards. " *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test* ". Approved Standards. Villanova. Pa. 1979.

30. Pelczar Jr, M.J., Reid, R.D., and Chan, E.C.S. "*Microbiología*"; 4ª Edición; ; Ed. McGraw-Hill México, D.F.; 1984; pp 408-432.

31. Pfeifer, H.W. : "*Revisión of north and central american hexandrous species of Aristolochia*". An. Missouri; 1966; 53 (2) : 115-196.

32. Dr. Romeo Gonzalez Constandse; "*Tratado de Medicina Práctica* ". México , tercera edición ; 1991; pp 2093-2098.

33. Dr Romeo Gonzalez Constandse; "*Tratado de Medicina Práctica* ". México, tercera edición; 1992; pp 2509-2515.

34. Rosenstein Ster E. " *Diccionario de Especialidades Farmacéuticas; P.L.M.* " Ed. Ediciones PLM,S.A. de C.V.; 1993; pp: 640-642, 917, 1511-1514.

35. Sahn D.F. " *Current concepts and approaches to antimicrobial agent susceptibility testing* ". J. American. Society for Microbiology, Washington D.C. 1988; pp: 310-312.
36. Sahn D.F. " *Mecanismos de resistencia antimicrobiana* " . Clinical. Microbial Rev. 1988; 1:9-14.
37. Stryer Lumbert. " *Bioquímica* " 3ª edición; Ed. Reverté, S. A.; Tomo 2; España 1990; pp 739-740.
38. Toshiaki Kamimura, Mine Yasuhiro " *In vitro and In vivo Antibacterial Activities of FR-31564, A New fosfonic Acid Antibiotic* " . The Journal of Antibiotic. Vol. XXXIII. 1980. No. 1:36-43.
39. William J.M., Sidney M.F., Bailey-Scott., " *Diagnóstico Microbiológico* " 7ª edición; Ed. Médica Panamericana; Argentina. 1989; pp 190-200.
40. Wolson J. S. " *Quinolone antimicrobial agent: adverse effect and bacterial resistance* " Eur. Jour. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1989; 8:1080-1092.