

3196

1 1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES

IZTACALA

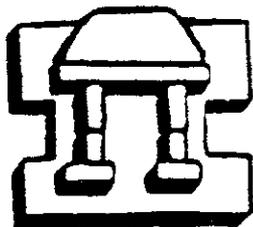
**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DE LA PLANTA**

***Alternanthera caracasana* HBK (Tianguis)**

TESIS QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOLOGIA DE RECURSOS VEGETALES
PRESENTA LA BIOLOGA

Ma. MARGARITA CANALES MARTINEZ

**DIRECTOR Y ASESOR:
M. EN C. JOSE GUILLERMO AVILA ACEVEDO**



IZTACALA

**LOS REYES IZTACALA, MEXICO
2000**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biología ,Tecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, bajo la dirección del M. en C. *José Guillermo Avila Acevedo*, a quien agradezco la conducción de esta investigación.

Este trabajo fue revisado por:

Dr. Ignacio Peñalosa Castro.

M. en C. José Guillermo Avila Acevedo.

M. en C. César Mateo Flores Ortiz.

M. en C. Eric Monroy Pérez.

M. en B. de R. V. Claudia Tzasná

Hernández Delgado,

a quienes agradezco profundamente las

observaciones realizadas.

A **MARCO**, mi amor de ayer, de hoy y de siempre.

A mis hijos; **MARCO** y **MARIO** por su profundo cariño y porque son la fuerza que me motiva en todo momento.

A la memoria de mi **PADRE**, por su ejemplo de lucha constante.

A mi **MADRE** por su profundo amor y apoyo constante.

A mis hermanos: **PEDRO**, **JOSE**, **RAUL** y **NATALIA**.

A mi amiga **TZASNA**, por todos los momentos compartidos.

INDICE GENERAL

Índice de tablas	iii
Índice de figuras	v
Abreviaturas	vi
Resumen	1
Introducción	2
Antibióticos	6
Resistencia a drogas antimicrobianas	9
Antimicrobianos de origen vegetal	12
Mecanismos de acción de compuestos bactericidas de origen vegetal	18
Descripción botánica de <i>Alternanthera caracasana</i>	30
Objetivos generales	35
Objetivos particulares	36
Metodología	37
Resultados y análisis	40
Discusión	70

Conclusiones	73
Apéndice 1. Cuantificación de sólidos solubles	74
Apéndice 2. Método de difusión en agar o de Kirby-Bauer	75
Apéndice 3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración bactericida media (CBM)	79
Apéndice 4. Microtécnica de dilución en caldo	81
Apéndice 5. Obtención de los extractos herbales	83
Bibliografía	85

INDICE DE TABLAS

Cuadro 1. Plantas con actividad antimicrobiana	14
Cuadro 2. Compuestos con actividad antimicrobiana aislados de diferentes plantas	16
Cuadro 3. Datos generales de la planta estudiada	40
Cuadro 4. Datos etnobotánicos de la planta estudiada	40
Tabla 1. Rendimiento obtenido de sólidos solubles de <i>A. caracasana</i> con Diferentes solventes	41
Tabla 2. Actividad antimicrobiana de la planta <i>A. caracasana</i>	42
Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria y bactericida media del extracto de metanol	45
Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria y bactericida media del extracto de acetato de etilo	46
Tabla 5. Rendimiento de las fracciones del extracto de acetato de etilo	48
Tabla 6. Actividad de las fracciones del extracto de acetato de etilo	49
Tabla 7. Bioensayo de las fracciones obtenidas al recromatografiar la fracción 2 activa del extracto de acetato de etilo	50
Tabla 8. Bioensayo de las fracciones obtenidas al recromatografiar la fracción II activa de la fracción 2 del extracto de acetato de etilo	51
Tabla 9. Bioensayo de las fracciones obtenidas al recromatografiar la fracción III activa de la fracción 2 del extracto de acetato de etilo	52
Tabla 10. Bioensayo de las fracciones obtenidas al recromatografiar la fracción VII activa de la fracción 2 del extracto de acetato de etilo	52
Tabla 11. Bioensayo de las fracciones 3, 4 y 5 activas del extracto de acetato de etilo	53
Tabla 12. Rendimiento de las fracciones activas del extracto de acetato de etilo	53
Tabla 13. Rendimiento de las fracciones del extracto de acetona lavado con acetato de etilo	54

Tabla 14. Actividad de las fracciones del lavado con acetato de etilo del extracto de acetona	55
Tabla 15. Rendimiento de la recromatografía de la fracción 4.	56
Tabla 16. Parámetros de la fracción activa pura obtenida de la planta <i>A. caracasana</i>	57
Tabla 17. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ¹ H	61
Tabla 18. Desplazamientos químicos del espectro de RMN ¹³ C	64
Tabla 19. Concentración mínima inhibitoria y bactericida media de la 7-metoxi-cumarina	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de una flavona, Apigenina	18
Figura 2. Ejemplo de fenilpropanos con esqueleto C ₆ -C ₃	23
Figura 3. Ejemplos de ácidos cinámicos	24
Figura 4. Posibles relaciones biosintéticas entre ácidos cinámicos, cumarinas y derivados del ácido salicílico	25
Figura 5. Algunos ejemplos de cumarinas	26
Figura 6. Fotografía de <i>Alternanthera caracasana</i>	31
Figura 7. Mapa de la distribución de <i>A. caracasana</i> en la República Mexicana	32
Figura 8. Espectro UV del compuesto con actividad antimicrobiana aislado de <i>A. caracasana</i>	58
Figura 9. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN ¹ H) del compuesto con actividad antimicrobiana aislado de <i>A. caracasana</i>	59
Figura 10. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece (RMN ¹³ H) del compuesto con actividad antimicrobiana aislado de <i>A. caracasana</i>	62
Figura 11. Termograma del compuesto con actividad antimicrobiana aislado de <i>A. caracasana</i>	65
Figura 12. Espectro de masas del compuesto con actividad antimicrobiana aislado de <i>A. caracasana</i>	66
Figura 13. Patrón de fragmentación del compuesto 7-metoxi-cumarina aislado de la planta <i>A. caracasana</i>	67
Figura 14. Estructura química del compuesto con actividad antimicrobiana obtenido de <i>A. caracasana</i>	68
Gráfica 1. Extractos activos sobre las cinco cepas bacterianas sensibles	44

ABREVIATURAS

+	Activo
CBM	Concentración bactericida media
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CPF	Cromatografía en placa fina
d	Doblete
m	Multiplete
na	No activo
RMN¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN¹H	Resonancia magnética nuclear de protones
s	Singulete
UV	Ultravioleta

ABREVIATURAS DE MICROORGANISMOS

B. sub	<i>Bacillus subtilis</i>
S. au	<i>Staphylococcus aureus</i>
S. epi	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
S. lu	<i>Sarcina lutea</i>
V. ch. No-01	<i>Vibrio cholerae</i> No-01

RESUMEN

La planta *Alternanthera caracasana* (tianguis) ha sido utilizada desde antes de la conquista como una planta medicinal, desde el siglo XVI fue empleada para curar heridas, úlceras de la boca, diarreas de probable origen infeccioso; sin embargo no se disponía de un análisis fitoquímico y farmacológico de esta especie, por ello en este trabajo se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana de esta planta, así como la elucidación de la estructura química del compuesto responsable de esta actividad.

Se obtuvieron 5 extractos (hexanos, cloroformo, acetato de etilo, acetona y metanol) de 7 Kg de planta seca que fue colectada durante los meses de julio-agosto (1996-1997) en la ENEP Iztacala. Utilizando el método de difusión de Kirby-Bauer se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de tianguis sobre 14 cepas de bacterias y una de hongos, se determinó que los extractos de acetato de etilo, acetona y metanol fueron activos sobre 5 cepas de bacterias (*Vibrio cholerae* No-01, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Sarcina lutea*). Se obtuvo la CMI y la CBM de cada extracto sobre cada cepa bacteriana. El extracto de acetato de etilo presentó la mayor actividad, ya que usando sensidiscos con una concentración de 2 mg/sensidisco, los halos de inhibición que se obtuvieron fueron para *S. aureus* y *S. epidermidis* 13.67 mm, *B. subtilis* 9.0 mm, *S. lutea* 11.0 mm y para *V. cholerae* No-01 de 8.0 mm. Este extracto se fraccionó utilizando cromatografías en columna, en placa fina y en placa preparativa, con lo cual se purificó el compuesto activo mayoritario que tuvo un rendimiento de 12.4 mg. Mediante estudios espectroscópicos de UV, RMN¹H, RMN¹³C y espectrometría de masas, se elucidó la estructura química la cual correspondió a la 7-metoxi-cumarina. Finalmente se obtuvo la CMI y la CBM para cada cepa con el compuesto activo, obteniendo para *S. aureus* y *V. cholerae* No-01 una CMI de 0.5 mg/ml, para *S. lutea*, *S. epidermidis* y *B. subtilis* una CMI de 0.75 mg/ml y para todos los tipos bacterianos antes mencionados la CBM estuvo por arriba de 1.0 mg/ml.

INTRODUCCION.

Los seres humanos siempre han dependido de las plantas para su alimentación y muchas otras necesidades, es posible que el hombre se haya llevado a la boca la mayoría de las plantas. Muchas eran inocuas, otras le enfermaban o mataban. Sin embargo, algunas de ellas aliviaban síntomas de indisposición y enfermedad, y unas pocas, por medio de alucinaciones, provocaban cambios en el comportamiento. Las plantas de estas dos últimas categorías se convirtieron en sus medicamentos.

Poco a poco el empleo de plantas curativas quedó vinculado a la superstición y la magia. A menudo cuanto más nauseabunda era la droga, más eficaz se consideraba. No es una coincidencia que las primeras plantas medicinales fueran drogas de acción directa es decir, eméticos, purgantes (Argueta, 1994).

Las sociedades primitivas creían en la curación por analogía. Una resina roja, por ejemplo, significaba que la planta era buena para la sangre.

Donde quiera que se consulten documentos históricos - de Babilonia, Egipto, India, China, Grecia, Roma -, las fuentes más antiguas contienen referencias numerosas a las plantas medicinales. Quizá los primeros documentos detallados y tangibles son los del Código de Hammurabi, rey de Babilonia (1728 a 1686 A.C). La farmacia mesopotámica era igualmente dependiente de las drogas vegetales, especificando unas 250 especies. En Egipto, el templo de Karnak tiene tallas de plantas medicinales llevadas desde Siria en 1500 a.C (Gallardo, 1983).

Entre los antiguos griegos, cuatro hombres contribuyeron de forma especial a la medicina botánica. Hipócrates, a fines del siglo V y principios del siglo IV a.C., mencionó una lista de 300 a 400 plantas medicinales. Hipócrates es notable, casi de un modo único, en no asociar la demonología a las propiedades curativas de las plantas. Aristóteles (384-322 a.C.) asignó a cada planta las propiedades y virtudes entonces conocidas. Teofrasto

(372-287 a.C.), fundamentalmente botánico, describió muchas plantas griegas y extranjeras describiendo su uso. Su tratado "Historia de las plantas" tuvo una fundamental influencia en el desarrollo de la botánica y la medicina durante casi veinte siglos. Sin embargo, el escritor médico-botánico más influyente fue Dioscórides (primer siglo d.C.) cuya obra "De Materia Médica" no solo sienta las bases para los grandes herbarios europeos de la Edad Media, sino que se convirtió en el prototipo de nuestras grandes farmacopeas. La influencia de Dioscórides es abrumadora: hasta el Renacimiento, fue la autoridad infalible tanto en medicina como en botánica. Gran parte del conocimiento europeo de plantas surge directamente de los escritos de Dioscórides.

Los conceptos modernos de las plantas curativas empezaron en Europa con la aparición de herbarios en el siglo XVI.

En el Continente Americano, una serie de refugios en Coahuila, México, con unos 8000 años de ocupación, han proporcionado material del cacto peyote, mezcal y semillas de castaño mexicano (*Ugnadia speciosa*). Todo ello puede haber sido usado medicinalmente por los habitantes primitivos, ya que se sabe que todos estos vegetales poseen principios activos. Un número de plantas medicinales, la mayoría de ellas con historia de uso legendario entre los indios son originarias de Norteamérica (Lozoya, 1988).

En el "Manuscrito Badiano" de 1552, se describen los valores medicinales de casi 200 especies; un aspecto interesante de esa obra es que su autor era el indio mexicano Martín de la Cruz, médico azteca. En 1865, un médico español, Juan Bautista Monardes, escribió un extenso libro sobre drogas vegetales mexicanas, basado parcialmente en su experimentación con pacientes. El rey de España envió a su propio médico, el doctor Francisco Hernández, a estudiar las drogas vegetales aztecas: el resultado fue una obra enciclopédica sobre la historia natural de la "Nueva España", en la cual se estudiaban unas 1200 plantas curativas, algunas con gran detalle, y muchas de ellas ilustradas con tal minuciosidad que raramente se puede poner en duda su identificación (Gallardo, 1983).

Fue en México donde el uso de las “supermedicinas” de las plantas psicoactivas - los alucinógenos- se desarrolló a un nivel extraordinario en los rituales médicos y mágico-religiosos (Thomson, 1980).

En México, la medicina tradicional ocupa un importante lugar en la realidad médica del país. Mientras la medicina alópata cubre el 40% de los servicios de salud, cerca de 20 millones de habitantes recurren a las plantas medicinales o a otros recursos de la medicina tradicional para poder curarse. Gran parte de la medicina tradicional mexicana es aún rescatable y puede ser un importante campo para implementar nuevos planes de salud, que combinen el conocimiento popular con el conocimiento científico (Tascon, 1997).

En la actualidad La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor del 80% de los habitantes del planeta recurren principalmente a remedios tradicionales. Esta afirmación se había hecho ya en los años sesenta. En aquella época, la OMS sugería que esta tendencia podría invertirse en el año 2000 a fin de que, para entonces, el ochenta por ciento de la población pudiera tener acceso a las atenciones primarias de la salud en los dispensarios, y que sólo la quinta parte de la población fuera tratada con la medicina tradicional. Pero, muy pronto, la OMS tuvo que percatarse de que este objetivo no era realista, por lo que la estrategia tuvo que cambiarse y, a partir de 1977, lo que se ha promulgado es una persuasión a la integración de las medicinas tradicionales en los programas de salud. La OMS recomienda a los países en vías de desarrollo que, por una parte, incidan en programas centrados en la identificación, la preparación, el cultivo y la conservación de las plantas medicinales utilizadas por la medicina tradicional, y, por otra parte, que mediante transferencia de tecnología, evalúen la calidad y eficacia de estas medicinas con la ayuda de técnicas modernas (Fleurentin, 1981).

La fitoquímica se ha desarrollado como una disciplina independiente, que relaciona la química orgánica de los productos naturales y la bioquímica de la planta. Se interesa por la enorme variedad de sustancias orgánicas que son elaboradas y almacenadas por

las plantas, la estructura química de esos compuestos, su biosíntesis, metabolismo, su distribución natural y su función biológica (Harbone, 1973).

Durante los últimos diez años ha surgido en el sector público y privado una búsqueda e interés impresionante sobre el descubrimiento de productos naturales, esto posiblemente se debe al desarrollo de la ciencia, a la real amenaza de la desaparición de la biodiversidad, persistencia de viejas enfermedades y al surgimiento de nuevas enfermedades, a los precedentes históricos para los productos naturales como fuentes de medicinas útiles (Boyd, 1996).

La medicina tradicional es una fuente importante de compuestos nuevos potencialmente usados para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos (Paz, 1995). La medicina herbolaria se ha desarrollado en diferentes países, no sólo para rescatar las tradiciones ancestrales, sino como una solución alterna a grandes problemas (Martínez, 1996).

El uso de compuestos antimicrobianos de origen vegetal podría tener una gran impacto en la preservación de comida almacenada y en el control de enfermedades de origen microbiano (Verástegui, *et al.* 1996).

Con lo antes expuesto queda claro que existe una gran aplicación de la medicina tradicional, por lo cual surge la necesidad de comprobar dicha información, de tal manera que en este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de la planta *Alternanthera caracasana* (tianguis), ya que esta planta se reporta como un excelente remedio para el tratamiento de diarreas de probable origen infeccioso.

ANTIBIOTICOS

En la actualidad los antibióticos se han definido como compuestos químicos derivados de organismos vivos o producidos por ellos, que son capaces, a pequeñas concentraciones, de inhibir los procesos vitales de los microorganismos, pero el concepto de que sustancias derivadas de un microorganismo vivo pueden matar a otro (antibiosis) es casi tan antiguo como la misma ciencia microbiológica. Más aún, la aplicación de la terapéutica antibiótica, sin saber que era tal, es mucho más antigua. Los chinos ya conocían desde hace más de 2500 años las propiedades terapéuticas de la cáscara enmohecida de la soya aplicada a carbuncos, furúnculos e infecciones similares y usaban este material para tratamientos estándar de estos trastornos. Durante muchos siglos, la literatura médica ha ofrecido descripciones de efectos benéficos, medicamentos preparados con tierra y diversos vegetales, en su mayoría muy probablemente fuente de mohos y bacterias formadoras de antibióticos, o de sustancias inherentes a la química de las plantas (Castiglioni, 1941). En 1619 aparece el primer registro del tratamiento de la malaria con un extracto de la corteza de cinchona, en el Perú. Otro descubrimiento realizado a partir de la flora sudamericana lo constituyó la eficacia de la raíz de la ipecacuana contra la disentería amebiana. Hasta los primeros años de este siglo los extractos de esta raíz y en tiempos más recientes los alcaloides, quinina y emetina, y sus derivados, proporcionaban la única quimioterapia curativa conocida (Avila, 1996).

El primer registro científico de actividad antibiótica fue realizado por Luis Pasteur y Jaubert, quienes comunicaron en 1877 que no se había desarrollado el carbunco en animales inyectados con un inóculo que contenía *Bacillus anthracis* y otros bacilos comunes. Dichos autores comentaron que la vida destruye a la vida entre las especies inferiores, más aún que en los animales y vegetales superiores, llegando a la conclusión de que los bacilos de ántrax podían administrarse al animal en gran número sin enfermarlo, siempre que se dieran al mismo tiempo bacterias “ordinarias” y declararon que esta observación podía significar una gran promesa para la terapéutica. (Moellering,

1990). En 1881, Tyndall en su "Ensayos sobre la Materia Flotante del Aire, en Relación con la Putrefacción y la Infección", estableció que en algunos tubos que contenían una infusión nutritiva con bacterias y que se habían contaminado también con *Penicillium glaucum* las bacterias se precipitaban en el fondo del tubo. Tyndall interpretó este fenómeno como debido a la suspensión del suministro de oxígeno a las bacterias por las películas formadas por el moho. Diez años después del descubrimiento de Pasteur, Emmerich (1878), descubrió accidentalmente que un cobayo al que previamente se había inyectado con *Streptococcus erysipelatis* no padeció el cólera al inyectarle cultivos virulentos de *Vibrio cholerae*. Reconoció inmediatamente el significado del descubrimiento y logró evitar el ántrax en animales de laboratorio administrando *S. erysipelatis* previamente a la inyección de *Bacillus anthracis*.

En 1889, Bauchard comunicó que *Pseudomonas aeruginosa* evitaba el desarrollo del ántrax en el conejo, observación que fue ampliada por Woodhead y Wood en 1889, al descubrir que cultivos esterilizados de *P. aeruginosa* ejercían el mismo efecto protector frente al ántrax. La acción lítica de algunos actinomicetos sobre diversos microorganismos fue observada por Brunel. Poco después, Emmerich y Low establecen la acción protectora de cultivos filtrados de *P. aeruginosa*, concentraron estos filtrados, desprovistos de células, a un décimo de su volumen inicial y demostraron que destruían al *Corynebacterium diphtheriae*, estafilococos, estreptococos, neumococos, gonococos, *Vibrio cholerae* y *Shigella dysenteriae in vivo*. Las observaciones de todos los investigadores habían establecido el fenómeno de antibiosis, Sir Alexander Fleming observó en 1928 la inhibición de crecimiento de bacterias por una colonia de *Penicillium notatum* que se había desarrollado como contaminante sobre una caja de Petri dentro de sus cultivos. Fleming en sus publicaciones del año de 1929 propuso el posible uso clínico de la sustancia producida por el cultivo de *P. notatum*.

Al estallar la Segunda Guerra Mundial se inicia un programa a gran escala para la producción y ensayo de la sustancia conocida en la actualidad como penicilina; así mismo, la industria y las instituciones académicas se dedicaron al estudio de esta sustancia y a la búsqueda de otros antibióticos. Esto tuvo como consecuencia el

descubrimiento de la estreptomina, aureomicina y cloromicetina, entre otros (Trease, 1993).

En los inicios de la producción de antibióticos, se pensó que éstos no eran más que el resultado de una relación ecológica fundamental (antibiosis) entre organismos competitivos, es decir, un fenómeno opuesto a la simbiosis. Sin embargo, existen varias razones para descartar este punto de vista, puesto que: los microorganismos capaces de producir antibióticos constituyen tan solo una mínima parte de la totalidad de la población microbiana que se encuentra en las muestras de suelo, por lo que la producción de estos compuestos no parece constituir ventaja alguna, desde el punto de vista evolutivo; las cepas que se encuentran en la naturaleza producen sólo cantidades mínimas de antibióticos. Para que la producción sea rentable es necesaria la selección de mutantes producidos por el hombre; la mayoría de los antibióticos se producen sólo después de que se interrumpe el crecimiento, y no durante los procesos competitivos que se dan en la fase de mayor crecimiento (Atlas & Bartha, 1981.).

De los antibióticos de empleo clínico, la mayor parte son de origen bacteriano o fúngico. Entre las bacterias es especialmente importante el género ***Streptomyces***, pues produce antibióticos como estreptomina, cloramfenicol, clorotetraciclina, tetraciclina, eritromicina y neomicina. Otros antibióticos de origen bacteriano son tirotricina, bacitracina y polimixina. Entre los antibióticos que son producidos por hongos se encuentran las penicilinas, la griseofulvina y la cefaloridina (Davis, 1984).

RESISTENCIA A DROGAS ANTIMICROBIANAS

La capacidad de las bacterias para resistir la acción de los agentes antimicrobianos es un problema importante en la microbiología médica. En términos prácticos, se dice que existe resistencia a algún agente antimicrobiano cuando la bacteria no es inhibida a las concentraciones de droga que se pueden administrar a pacientes, con base en estudios toxicológicos. El término resistencia a los antimicrobianos no hace generalmente referencia a la resistencia natural (también llamada resistencia intrínseca) de una especie la cual se refiere a la insensibilidad natural de la bacteria ante cierta droga y como característica innata compartida por la mayoría o todos los miembros de una especie, sino a cambios genotípicos adquiridos que persisten durante el cultivo en ausencia del fármaco. El cambio puede ser producido ya sea por mutación, que altera un componente celular, o por la presencia de un plásmido, que aporta genes para nuevas enzimas. El fármaco desempeña solamente un papel selectivo, no directivo. Algunos antibióticos, sobretodo la estreptomina, seleccionan a los mutantes.

Cuando un agente antimicrobiano se añade a un cultivo en crecimiento, el proceso de muerte es inicialmente exponencial, pero después de algún tiempo se nivela debido a que las muestras sucesivas contienen durante horas un pequeño número de células que generan colonias cuando son transferidas a un medio sólido fresco. Tales organismos persistentes manifiestan una resistencia fenotípica en lugar de genotípica, pues su progenie no muestra aumento de resistencia. Se han observado varios mecanismos de resistencia fenotípicos. La resistencia al mismo fármaco depende de diferentes mecanismos en cepas diferentes, entre los cuales se pueden mencionar: 1. El aumento en la destrucción del antimicrobiano, el cual es el más frecuentemente utilizado en los casos de resistencia producidos por un plásmido. 2. La disminución en la actividad de la droga que se observa en mutantes resistentes a sustancias análogas a las purinas o pirimidinas, que pueden convertirse en nucleótidos antes de que hayan podido interferir las reacciones fundamentales. Dado que las enzimas que participan en la conversión no son esenciales

para la célula, su supresión no altera la viabilidad y por lo tanto se pueden producir mutantes resistentes (compuestos de esta clase se usan en la quimioterapia del cáncer). Los agentes antimicrobianos de uso común en clínica son todos activos sin posterior alteración química. 3. La formación de un receptor alterado, constituye un mecanismo de resistencia importante. Un ejemplo consiste en la alteración de una proteína ribosómica específica como consecuencia de una mutación simple que aumenta la resistencia del mutante. Mediante el uso de análogos de metabolitos se ha observado que los mutantes resistentes forman enzimas alteradas, que distinguen entre el sustrato normal y el análogo. 4. La disminución de permeabilidad, en mutantes resistentes a los análogos de aminoácidos, implica la pérdida o la alteración de un sistema de transporte de membrana que transporta también el correspondiente aminoácido normal. Las barreras de permeabilidad normales son responsables de muchas "resistencias naturales" contribuyendo así la membrana externa a la menor sensibilidad de los gérmenes gramnegativos. 5. El nivel aumentado de una enzima puede incrementar la resistencia. Este mecanismo puede implicar, ya sea la formación aumentada del metabolito competitivo o a un número de copias aumentado de la enzima inhibida (resultante de la ampliación genética en los plásmidos) (Raw, 1988).

Se ha demostrado que la resistencia a los medicamentos surge en los cultivos puros por mutaciones espontáneas, cada una específica frente a un solo fármaco y seleccionada por éste, la rápida difusión de la resistencia múltiple, fue observada por primera vez en el Japón. Después de unos años de quimioterapia ampliamente difundida contra la disentería bacilar, las cepas del germen y de otras bacterias entéricas, empezaron a presentar resistencia múltiple frente a diferentes fármacos muy utilizados, como por ejemplo; las sulfamidas, estreptomina, cloranfenicol, etc. La resistencia múltiple puede ser transferida de una sola vez por contacto celular (conjugación) entre cepas resistentes y cepas sensibles. Este fenómeno se da en cultivos mixtos y aún en el tubo gastrointestinal. (Davis, 1985).

Los factores responsables llamados factores R presentan gran variedad en cuanto a su contenido en genes, que confieren resistencia a diversos antibióticos. Los factores R

son miembros del amplio grupo de los plásmidos, elementos genéticos extracromosómicos. Los plásmidos R codifican para su transmisión por conjugación, pero otros muchos plasmidos no lo hacen. Los plásmidos de resistencia son de gran importancia clínica y teórica.

La transferencia de DNA entre bacterias por contacto célula-célula es conocida como conjugación. La mayoría de estos sistemas de transferencia son codificados por plásmidos. El proceso de conjugación ha sido extensamente estudiado en bacterias gramnegativas como por ejemplo *E. coli* (Willets y Skurray, 1980.). Las células que contienen el plásmido donante (cepa resistente) presentan apéndices filamentosos en su superficie llamados *pili sexualis* que se requieren para la transferencia. Una vez que los *pili sexualis* entran en contacto con la bacteria receptora se forma un puente sexual por donde se llevará a cabo la transferencia. Sólo una cadena del DNA del plásmido se transfiere a la célula receptora (cepa sensible), el DNA monocatenario presente en ambas células sirve como patrón para la síntesis de la cadena complementaria, de esta manera ambas células cuentan con una copia del plásmido. Otro mecanismo a través del cual se puede transferir resistencia a antibióticos es la transducción, proceso mediante el cual algunos genes de resistencia de un plásmido o de un cromosoma son incorporados a las partículas de un bacteriófago e introducidas en otra bacteria durante la infección viral. Algunos fagos pueden realizar la trasducción de un plásmido completo de resistencia a fármacos siempre y cuando el tamaño de la molécula de DNA no exceda al tamaño de la cápside del fago. Es de hacer notar que el rango de hospederos está limitado para la infección por fagos ya que éstos generalmente sólo infectan una especie o algún género de bacterias. Otra manera de que las bacterias puedan adquirir resistencia a fármacos es por medio de la introducción de fragmentos de DNA libres en el entorno celular e incorporación a su cromosoma por recombinación homóloga, este proceso es llamado transformación (Old, 1989).

ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL

Al igual que algunos hongos y bacterias, hay plantas que también producen antimicrobianos, a este tipo de compuestos se les incluye dentro de los llamados "metabolitos secundarios", que son biosintetizados a partir de metabolitos primarios, esta clasificación es arbitraria, así los metabolitos primarios comprenden aquellas sustancias de muy amplia difusión en la naturaleza y que se encuentran en todos los organismos vivos, siendo por lo tanto metabólicamente esenciales. Un grupo reducido de estos metabolitos primarios sirven como precursores de todas las otras sustancias que no pertenecen a esta categoría. Estas otras sustancias, que comprenden la gran mayoría de los llamados productos naturales, son consideradas como metabolitos secundarios. Lo de "secundarios" no hace justicia a la frecuentemente compleja naturaleza de sus diversas estructuras moleculares, aunque no es la complejidad estructural lo que los distingue de los metabolitos primarios. La característica más importante de muchos metabolitos secundarios es su distribución relativamente restringida a la naturaleza que, en algunos casos, se limita a especies o subespecies únicas; en consecuencia son una manifestación de la individualidad del organismo que los contiene. Se ha atribuido a estos compuestos una gran variedad de funciones.

En la actualidad se han realizado numerosas investigaciones sobre el tema de antimicrobianos de origen vegetal y el resultado ha sido la identificación de una gran cantidad de compuestos que se han aislado de plantas.

Se han realizado estudios con plantas terrestres inferiores como Briofitas (musgos y hepáticas), Líquenes, etc. lográndose aislar e identificar algunos compuestos. En cuanto a las monocotiledóneas, la planta que ha sido más estudiada es el ajo cuya acción bactericida se debe al aminoácido azufrado aliina (Treace, 1993). Las dicotiledóneas son el grupo más estudiado debido a que son las que generalmente se utilizan desde el punto de vista de la medicina tradicional.

Se ha estudiado un gran número de plantas que presentan actividad antimicrobiana , y se ha logrado determinar las bacterias que son sensibles a éstas, pero aun no se ha logrado identificar los compuestos responsables de dicha actividad. En la el cuadro 1 se muestran ejemplos de plantas con actividad antimicrobiana.

CUADRO 1. PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

ORIGEN	ACTIVO CONTRA	REFERENCIA
<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>	<i>E. coli</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. aureus</i> <i>S. faecalis</i> <i>V. cholerae</i>	Silva, 1996
<i>Terminalia macroptera</i>	<i>S. dysenteriae</i> <i>V. cholerae</i> <i>S. aureus</i>	
<i>Guiera semegalensis</i>	<i>V. cholerae</i> <i>S. aureus</i> <i>S. faecalis</i>	Silva, 1996.
<i>Gardenia ternifolia</i>	<i>S. aureus</i>	
<i>Schinus terebinthifolius</i>	<i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	Martínez, 1996.
<i>Agave lechuguilla</i>	<i>S. dysenteriae</i>	
<i>Boharis glutinosa</i>	<i>P. vulgaris</i>	
<i>Larrea tridentata</i>	<i>S. dysenteriae</i> <i>P. vulgaris</i>	Verástegui, 1996
<i>Capsicum (C. annuum, C. baccatum, C. chinese, C. pubescens)</i>	<i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. pyogenes</i> <i>E. coli</i>	Cichewicz, 1996
<i>Helichrysum pedunculatum</i>	<i>B. cereus</i> <i>S. aureus</i> <i>E. cloacae</i>	Meyer, 1996.
<i>Helichrysun aureonitens</i>	<i>S. aureus</i> <i>B. cereus</i> <i>B. subtilis</i>	Meyer, 1995
<i>Asteraceae auriculata</i>	<i>S. aureus</i>	
<i>A. africanus</i>	<i>S. aureus</i>	Salie, 1996.

**PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
(CONTINUACIÓN)**

ORIGEN	ACTIVO CONTRA	REFERENCIA
<i>Conyza bonariensis</i>	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i>	Olano, 1996
<i>Eryngium aniculatum</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i> <i>B. subtilis</i>	
<i>Limonium brasiliense</i>	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	
<i>Schinus molle</i>	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	
<i>Sesbania punicea</i>	<i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	

En el cuadro 2 se muestran algunos ejemplos de plantas que han sido estudiadas recientemente donde se ha determinado la naturaleza química del compuesto responsable de la actividad, clasificándolas por grupo químico y mencionando los microorganismos frente a los cuales se ha presentado actividad antimicrobiana.

CUADRO 2. COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA AISLADOS DE DIFERENTES PLANTAS

ORIGEN	ACTIVIDAD CONTRA	TIPO DE COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Tanacetum densum</i>	<i>B. subtilis</i> <i>K. pneumoniae</i>	Terpeno	Goren. 1992.
<i>Tanacetum</i> <i>Argyrophyllum</i>	<i>B. aureus</i> <i>S. magatemun</i> <i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i>	Terpeno	Goren, 1992.
<i>Picea glauca</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Terpeno	Ritch-Kro, 1996.
<i>Pinus contorta</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Terpeno	Ritch-Kro, 1996.
<i>Vochysia divergens</i>	<i>S. aureus</i>	Terpeno	Hess, 1995.
<i>Haplopappus</i> <i>diplopappus</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. vulgaris</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Terpeno	Urzúa, 1995
<i>H. anthylloides</i>	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>P. vulgaris</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Terpeno	Urzúa, 1995
<i>H. uncinatus</i>	<i>E. coli</i> <i>P. vulgaris</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Terpeno	Urzúa, 1995.

CUADRO 2. CONTINUACION...

ORIGEN	ACTIVIDAD CONTRA	TIPO DE COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Psidia trinataria</i>	<i>B. cereus</i>	Flavonoide	Wang, 1989.
<i>Elaeagnus glabra</i>	<i>P. vulgaris</i> <i>S. aureus</i>	Flavonoide	Mori, 1987.
<i>Gossypium arborescens</i>	<i>P. maltophilia</i> <i>E. cloacae</i>	Flavonoide	Waage, 1984.
<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella ssp.</i>	Flavonoide	Vijaya, 1995.
<i>Euphorbia hirta</i>	<i>Shigella ssp. .</i>	Flavonoide	Vijaya, 1995
<i>Sophora exigua</i>	<i>S. aureus</i>	Flavonoide	Tsuchiga, 1996.
<i>Poliurus spina</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. faecalis</i> <i>S. sonnei</i> <i>E. coli</i>	Flavonoide	Brantner, 1996.
<i>Haplopappus multifolius</i>	<i>P. vulgaris</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Flavonoide	Urzúa, 1995
<i>Karwinskia humboldtiana</i>	<i>S. aureus</i> <i>M. smegmatis</i>	Quinona	Mitscher, 1985.
<i>Ipomoea bahiensis</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. faecalis</i> <i>B. subtilis</i>	Glucósido	Bieber, 1987
<i>Rhynchosia suaveolens</i>	<i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Lignano	Khan, 1984.
<i>Scrophularia frutescens</i>	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Lignano	Fernández, 1996
<i>Erythrina milodhraedi</i>	<i>S. aureus</i> <i>M. smegmatis</i>	Pterocarpano	Mitscher, 1988.
<i>M. floribundum</i>	<i>P. maltophilia</i>	Tanino	Waage, 1984

MECANISMOS DE ACCIÓN DE COMPUESTOS BACTERICIDAS DE ORIGEN VEGETAL.

De la gran cantidad de plantas que poseen actividad antimicrobiana que se han estudiado, se ha aislado un número importante de compuestos activos, pero sólo a pocos de ellos se les ha determinado su mecanismo de acción. Dentro de éstos se pueden citar a los flavonoides, los taninos, los terpenos y las cumarinas.

FLAVONOIDES

En estudios realizados por Mori, A. et al en 1987, se determinó que las características de los flavonoides que presentan actividad antimicrobiana son: presencia de grupos hidroxilo libres y una estructura planar, ya que en los flavonoides sin grupos hidroxilos libres no se presentó actividad. Se ha observado que existe muerte bacteriana cuando hay flavonas en el medio de cultivo debido a que se inhibe fuertemente la síntesis de DNA y RNA. Se ha propuesto que debido a la estructura planar de los flavonoides (semejante a la de las bases púricas y pirimídicas) hay una intercalación entre las bases de la doble hélice, además de poder formar puentes de hidrógeno con ellas, las flavonas que han mostrado tener un mayor efecto inhibitorio en la síntesis de ácidos nucleicos son aquellas que presentan tres grupos hidroxilo en el anillo B (Figura 1). El anillo B juega un papel muy importante en la intercalación de puentes de hidrógeno con las bases de los ácidos nucleicos y esto se ve reflejado en la inhibición de la síntesis de éstos.

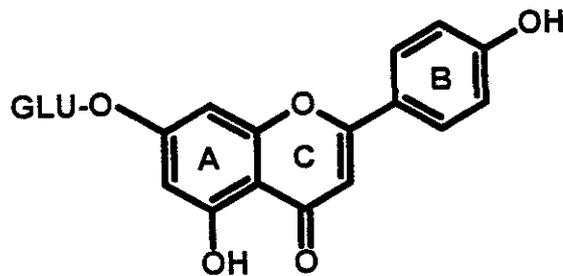


FIGURA 1. ESTRUCTURA DE UNA FLAVONA, APIGENINA.

TANINOS

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles que tienen un peso molecular comprendido entre 500 y 3,000 Da ó más, que presentan, junto a las reacciones clásicas de los fenoles, la propiedad de precipitar alcaloides y proteínas.

Históricamente, la importancia de los taninos está ligada a sus propiedades curtientes, es decir a la propiedad que tienen de transformar la piel fresca en un material imputrescible: el cuero. Esta propiedad ha sido utilizada y explotada por el hombre. Los taninos pueden inducir la formación de complejos insolubles de enzimas y sustratos que las bacterias requieren para su crecimiento normal, la combinación entre los taninos y las macromoléculas se establece, probablemente, por medio de enlaces de puentes de hidrógeno entre los grupos fenólicos de los taninos y determinados lugares de las proteínas y otros polímeros. Muchas enzimas microbianas han sido inhibidas en cultivos libres de células o bien en ensayos con enzimas purificadas cuando son mezcladas con taninos. Las enzimas en las cuales se ha visto este efecto son las peroxidasas y glicosiltransferasas. (Bruneton, 1991)

La aplicación de las drogas con taninos deriva de sus propiedades astringentes, por vía interna ejercen un efecto antidiarreico y antiséptico, por vía externa impermeabilizan las capas más externas de la piel y mucosas, protegiendo así las capas subyacentes. Al precipitar las proteínas, los taninos presentan un efecto antimicrobiano y antifúngico, además como precipitan los alcaloides pueden servir como antídoto en caso de intoxicación.

Se ha observado que los taninos presentan cierta acción deletérea sobre las membranas de los microorganismos. En estudios realizados por Konishi y colaboradores en 1987, se demostró que concentraciones de 50 mg/l de ácido tánico inhiben el transporte electrónico membranal de *Photobacterium*. Se ha sugerido que las

propiedades antisépticas de estas especies se puede atribuir a la presencia de ácidos fenólicos en su composición fitoquímica (Islam, et al, 1989. citado por Fernández, 1996).

Otro mecanismo de toxicidad de los taninos es su capacidad para formar complejos con los metales. Los sistemas biológicos, incluyendo los microorganismos, son altamente dependientes de los iones metálicos presentes en el medio ambiente. Por ejemplo, la infección en humanos por *E coli* se inhibe por la presencia de la lactoferrina. Muchos de estos compuestos presentan más de dos grupos o-difenol en su molécula. Los taninos pueden formar quelatos con varios iones metálicos, como los iones férricos o cúpricos. La naturaleza multicatecólica de los taninos permite la reticulación y con esto la formación de un precipitado metal-tanino que hace inaccesible, de esta forma, los iones metálicos para el consumo bacteriano (Scalbert, 1991).

En resumen la acción inhibitoria de los taninos sobre el crecimiento de los microorganismos se debe a los siguientes efectos: astringencia, acción sobre las membranas y competencia por metales.

TERPENOS

Dentro de este grupo, los compuestos más estudiados son las lactonas sesquiterpénicas ya que muestran, tanto *in vivo* como *in vitro*, propiedades antimicrobianas, como por ejemplo la helenalina. Las moléculas activas poseen grupos funcionales reactivos: epóxidos, ésteres o cetonas α , β -insaturadas. Todos estos compuestos actúan por alquilación de los centros nucleófilos de las moléculas biológicas; las α -metilén γ -lactonas son muy reactivas frente a tioles y aminas, provocando una alquilación irreversible de estos grupos, bloqueando así numerosas enzimas necesarias para las funciones metabólicas viables (Bruneton. 1991). Los estudios de estructura-actividad han demostrado que las enzimas bacterianas como la fosfofructoquinasa, la DNA polimerasa y la timidilato sintetasa de *E. coli* son inhibidas por estas lactonas (Fisher, 1991).

FENILPROPANOS

Los fenilpropanos son sustancias aromáticas que tienen funciones oxigenadas (hidroxilos, metoxilos, metilendioxis) en posiciones *orto*, *para* y *meta*: están muy difundidas en el reino vegetal y provienen del metabolismo de los hidratos de carbono.

Desde el punto de vista biogénico los fenilpropanos son derivados del ácido shiquímico. Dentro de los fenilpropanos están incluidos los siguientes compuestos aromáticos:

1. Sustancias que poseen esqueleto $C_6 - C_3$ inalterado o bien repetido, por ejemplo: ácidos cinámicos, alilbencenos y propenilbencenos, cumarinas, fenilpropanos, prenilados y lignanos.

2. Sustancias con esqueleto $C_6 - C_2$, $C_6 - C_1$ o C_6 , es decir, fenilpropanos con la cadena lateral acortada, por ejemplo: ácidos benzoicos y derivados, hidroquinonas, α -tocoferoles (vitamina E).

3. Derivados del ácido cinámico o de un esqueleto $C_6 - C_1$ y de una o de varias unidades isoprénicas, por ejemplo: naftaquinonas, antraquinonas, benzofenonas, xantonas y canabinoides.

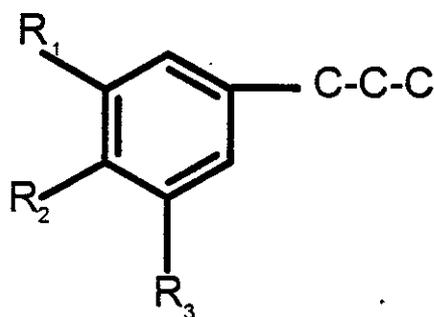
Además de las condensaciones y reacciones de degradación que ocurren en cada grupo, los compuestos aromáticos también experimentan descarboxilación, oxidación, reducción, hidroxilación, metilación o glicosidación. Es posible que las hidroxilaciones ocurran en gran parte ya al nivel del ácido cinámico.

Fenilpropanos con esqueleto C₆ – C₃ o repetido.

a. Acidos cinámicos, alilbencenos y propenilbencenos.

Este grupo (esqueleto C₆ – C₃) comprende los ácidos cinámicos, y también compuestos que difieren en el grado de oxidación de la cadena lateral y los sustituyentes del anillo bencénico. En la figura 2 se muestran ejemplos de este tipo de compuestos

El tipo de sustitución aromática más común es 4, 3, 4 ó 3, 4, 5, la más frecuente es la 3, 4-dihidroxiación



R₁, R₂, R₃ = H ó HO ó OMe

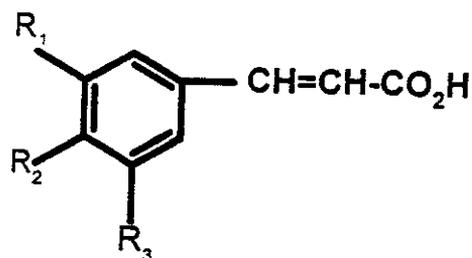
R₁ + R₂ = -OCH₂O-

FIGURA 2. EJEMPLO DE FENILPROPANOS CON ESQUELETO C₆ – C₃

La cadena lateral varía su grado de oxidación como sigue:

Tipo ácido cinámico	-CH=CH-COOH
Tipo alcohol coniferílico	-CH=CH-CH ₂ OH
Tipo isoeugenol	-CH=CH-CH ₃ (resto 1-propenilo)
Tipo eugenol	-CH ₂ -CH=CH ₂ (resto alílico)
Tipo fenilpropano	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (resto n-propilo)

Son las sustancias presentes en los aceites esenciales del tipo de apiol, miristicina, eugenol, anetol o safrol. En la figura 3 se muestran ejemplos de compuestos derivados del ácido cinámico.



$R_1 = R_2 = R_3 = H$ ácido cinámico

$R_1 = R_3 = H; R_2 = OH$ ácido p-cumárico

$R_1 = H; R_2 = R_3 = OH$ ácido cafeico

$R_1 = H; R_2 = OH; R_3 = OMe$ ácido ferúlico

$R_1 = R_3 = OMe; R_2 = OH$ ácido sinápico

FIGURA 3. EJEMPLOS DE ACIDOS CINAMICOS.

b. Cumarinas

Las cumarinas son benzo- α -pironas o α -cromonas y, por lo tanto, poseen el mismo esqueleto carbonado que los ácidos cinámicos. En realidad, son lactonas de los ácidos o-hidroxicinámicos.

El nombre "cumarina" proviene de un árbol nativo de Guayana, "coumarouna" (*Dipterix odorata*); de sus semillas se obtuvo cristalizada la primera benzo- α -pirona no sustituida.

No está claro en qué consiste el mecanismo de conversión de ácidos cinámicos en cumarinas. Ante todo, debe tenerse en cuenta que los ácidos cinámicos naturales son *trans*, por lo que para convertirlos en cumarinas deben isomerizarse a *cis* y, además, experimentar una o-hidroxilación. Como es muy raro encontrar o-hidroxifenilpropanos naturales, se supone que ha ocurrido una isomerización *trans-cis* acompañada de una o-hidroxilación.

La hidroxilación del anillo bencénico, de la que se obtiene umbeliferona o esculetina, ocurre en el nivel del ácido cinámico.

Con frecuencia, la cumarina no sustituida está presente en la planta fresca como O-glucósido del ácido o-hidroxi-*trans* o *cis*-cinámico (melilotósido) y es inodora. A partir de éste, al marchitarse o secarse el material vegetal, se forma la cumarina. Tal proceso ocurre cuando se seca el pasto recién cortado, liberándose un típico "olor a heno". Por ello se supone que las cumarinas son productos que por acción enzimática, dan lugar a glicósidos intermediarios. Los derivados del ácido salicílico se formarían por β -oxidación de cumarinas o precursores de éstas (Figura 4).

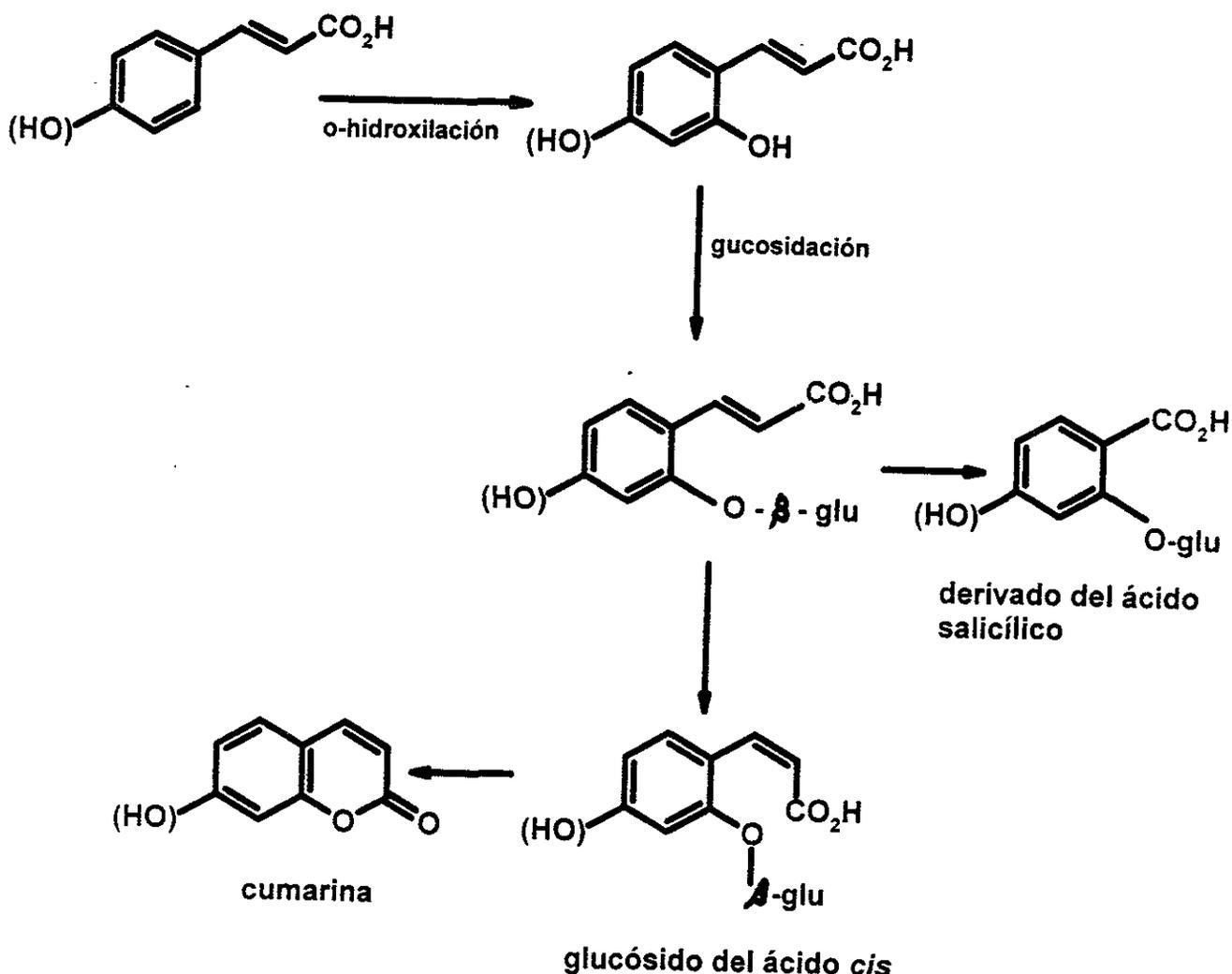
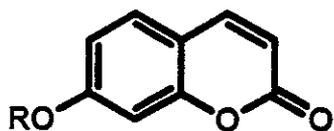
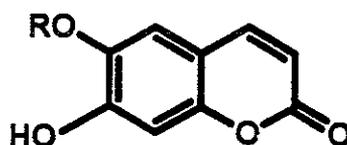


FIGURA 4. POSIBLES RELACIONES ENTRE ACIDOS CINAMICOS, CUMARINAS Y DERIVADOS DEL ACIDO SALICILICO

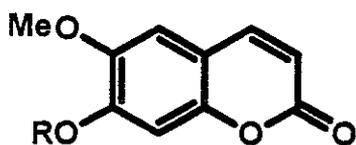
La mayoría de las cumarinas simples poseen un hidroxilo en C-7, otro hidroxilo o metoxilo puede encontrarse en C-6 y, con menos frecuencia, en C-4, C-5 o C-8. Los glucósidos más comunes son los 7-o-monoglucósidos, en la figura 5 se pueden observar algunos ejemplos de cumarinas. Las cumarinas presentan, en general, una intensa fluorescencia azul o azul-verdosa, por lo que es muy fácil detectarlas cromatográficamente.



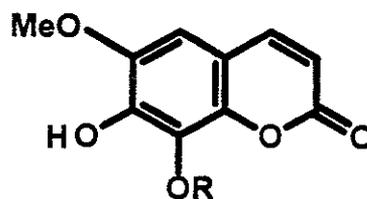
R = H: umbeliferona
R = Me: herniarina



R = H: esculetina
R = glu: esculina



R = H: escopoletina
R = glu: escopolina



R = H: fraxetina
R = glu: fraxina

FIGURA 5. ALGUNOS EJEMPLOS DE CUMARINAS.

Las cumarinas se encuentran muy difundidas en las siguientes familias de plantas: Apiaceae, Papilionaceae, Rutaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Solanaceae y Gramineae. En particular, la concentración es mayor en raíces, frutos y semillas.

Acción y uso de las cumarinas.

La síntesis de los fenilpropanoides es afectada por el medio ambiente, las condiciones nutricionales y hormonales, así como varios factores de estrés, los cuales han sido estudiados por Rhodes (1985). Algunos ácidos hidroxicinámicos y cumarinas simples han sido reportados como poseedores de diferentes manifestaciones biológicas como antibióticos, actividad fitotóxica, inhibidores de la germinación de semillas e inhibidores del crecimiento de plantas y de microorganismos que causan dermatitis (Harbone, 1982), daño hepático y carcinogénesis (Murray, 1982; Brown, 1985): Como por ejemplo el dicumarol (3, 3'-metileno-bis-[4-hidroxycumarina]) es conocido por su potencia anticoagulante causando hemorragia.

La acumulación de grandes cantidades de fenilpropanoides constituyentes, o la elaboración de compuestos nuevos, ha sido reconocida como parte del mecanismo de defensa usado por las plantas en respuesta al ataque de patógenos (Swain, 1977; Bell, 1981; Harbone, 1982; Surico, 1987, citados en Harbone, 1989)

Por otro lado, en su papel general como agentes antimicrobianos muchos ésteres fenilpropanoides glicosilados poseen actividad farmacológica o biológica (Abdary, 1980 y Cooper, 1980 citados en Harbone, 1989).

Se han comprobado propiedades antitumorales en algunas cumarinas y psoralenos, actividad antimicrobiana y propiedades biológicas en cumarinas, naturales y sintéticas, sustituidas con heterociclos en C-3.

La cumarina se usó durante mucho tiempo como corrector de olor y sabor en productos farmacéuticos y en la industria alimenticia, pero debido a que en experimentos con animales se observaron lesiones hepáticas y propiedades cancerígenas, está prohibido su uso. Presentan, además, acción espasmolítica, dilatadora de vasos, sedante central y bactericida.

La cumarina umbeliferona, esculetina y herniarina se agregaron a los preparados de protección solar principalmente por su capacidad de absorción en la región UV (280 – 315 nm), cuya radiación causa la formación de eritemas en la piel.

Betina, 1984 reporta que hay hongos que sintetizan cierto tipo de isocumarinas (ocratoxinas). Estos hongos contaminan comida y semillas y se ha observado que causan nefropatía en humanos y cerdos, muerte fetal en ratas y producen efectos teratogénicos. En pollos producen daños en el sistema inmune y en la coagulación. En células epiteliales de changos su efecto tóxico se lleva a cabo en la metafase, Tteyn et al (citado en Betina, 1984) concluye que la mitosis anormal resulta en la formación de células multinucleadas o células muertas.

Cumarinas condensadas.

Cumarinas diméricas. De las hojas descompuestas de *Mellilotus albus* se aisló dicumarol (3, 3' –metilen-bis-4-hidroxycumarina) que se origina por acción bacteriana sobre la cumarina presente en el material vegetal húmedo.

El dicumarol inhibe la formación de protombina, proconvertina y del factor Stuart-Power en el hígado, interrumpiendo así la capacidad de coagulación de la sangre. Su acción consiste en desalojar a la vitamina K (importante para la coagulación de la sangre) de su complejo con la apoenzima, que es el activo. Se usa por vía oral como anticoagulante en casos de posibles trombosis; existen, además, anticoagulantes sintéticos de estructura similar.

Furanocumarinas. Se conocen furanocumarinas con el anillo furano unido a 6, 7 (tipo psoraleno) y las que poseen el anillo furano unido a 7, 8 (tipo angelicina). Los carbonos de anillo furano de estos compuestos provienen del isopreno. Se encuentran en las familias de Fabaceae, Rutaceae, Apiaceae y Moraceae.

Las furanocumarinas, en especial psoraleno, bergapteno y xantoxina, exhiben notablemente propiedades “fotosensibilizantes” al ser colocadas sobre la piel y luego expuestas a la luz solar.

DESCRIPCION BOTANICA DE *Alternanthera caracasana* (tianguis)

Alternanthera caracasana H B K.

Nombre común. Verdolaga cimarrona, verdolaga de puerco. Estado de México: nxiga (otomí). Michoacán: tianguistumina. Puebla: tianguispepetla, tlalpetate (nahua), tianguistepetl, tianguistepetla. Chihuahua; bachcerl'i (rarámuri). Tlaxcala: tiankispepetl (náhuatl).

Descripción. *Alternanthera caracasana* H B K. Hierba rastrera perenne; tallos ramificados, pubescentes, de 10 a 50 cm de largo; pecíolos de 3 a 10 mm de largo, hojas rómbico-ovaladas, elípticas u ovaladas, de 0.5 a 2.5 cm de largo por 0.3 a 1.5 cm de ancho, pero por lo general las dos correspondientes a un nudo son desiguales entre sí; cabezuelas ovoides o cortamente cilíndricas, de 0.5 a 1.5 cm de largo, axilares, sésiles, blanquecinas, con numerosas flores; brácteas y bracteolas más cortas que los tépalos, éstos desiguales: los extremos ovalados, de 3 a 5 mm de largo, agudos y cortamente aristados, trinervados, vellos sobre los nervios, especialmente cerca de la base, los internos linear-subulados; filamentos linear-triangulares, estaminodios generalmente más cortos que los filamentos enteros o a veces denticulados; estilo muy corto; semilla ovado-orbicular, de 1 a 1.5 mm de largo, brillante, oscura. "Verdolaga de puerco". Maleza muy común en el Valle de México a la orilla de veredas, en las calles de las poblaciones y en algunos cultivos. Alt. 2250 - 2500 m. Desde el sureste de Estados Unidos hasta Argentina. También en Asia y en el sur de Europa (Rzedowski, 1979). En México se distribuye en los estados de Baja California Sur, Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, Durango, Nayarit, Jalisco, Guanajuato Querétaro, Hidalgo, Estado de México, D.F, Veracruz, Puebla y Chiapas



FIGURA 6. *Alternanthera caracasana*



**FIGURA 7. MAPA DE LA DISTRIBUCION DE *Alternanthera caracasana*
EN LA REPUBLICA MEXICANA**

Botánica y ecología. Hierba rastrera con los tallos ramificados parecen alfombra. Con las hojas más largas que anchas de color verde oscuro; los grupos de flores están en cabezuelas de color blanquecino, parecen estrellitas que están colocadas entre las hojas.

Probablemente originaria de América tropical y subtropical, presente en climas cálido, semicálido y templado desde el nivel del mar hasta los 2700 m. Asociada a terrenos de cultivo, bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, matorral xerófilo, bosque mesófilo de montaña, de encino, de pino y mixto de pino encino.

Etnobotánica y antropología. Aunque se menciona que las fiebres o calenturas (Puebla, Veracruz, Michoacán) son el principal padecimiento para el que se emplea esta planta, también es de gran importancia en malestares digestivos, dolor de estómago, estreñimiento, empacho, infección e inflamación intestinal, cólicos, vesícula sucia y diarrea. Se informa, que en caso de tifoidea, se hierva la raíz en suficiente agua y luego se desechan las ramas. Al agua se le agrega limón y se da un lavado, usando medio litro para los niños y un litro para los adultos. Se reporta también como purgante.

El tianguis kijoso es utilizado por los grupos mixe, zapoteca y totonaca para la curación del empacho y la disentería.

También puede emplearse en enfermedades como sarampión, viruela o escarlatina; para el dolor de riñones, tifo, alferecía y mal de ojo, y como antiespasmódico.

Historia. En el siglo XVI, Francisco Hernández dice que “la raíz purga todos los humores por el conducto inferior”.

Francisco Flores, en el siglo XIX, menciona que los chichimecas lo empleaban para combatir las heridas causadas por flechas envenenadas bebiendo los zumos de esta

yerba, y agrega, que el zumo de las hojas era de utilidad para las almorranas así como en colutorios para las úlceras de la boca, en la gingivitis, cuando la inflamación no era intensa y como refrigerante para los accesos febriles.

En el siglo XX, Maximino Martínez enumera lo siguiente: anticatarral, anticrotálico, antipirético, antiséptico intestinal, astringente, arroja los cálculos, desflema, diaforético, diurético, eupéptico, expulsa los gusanos de las úlceras, verrugas y vómitos de sangre. Luis Cabrera, la registra como aperitivo, diurético, para enfermedades exantémicas, fiebre tifoidea, tifus exantemático y como un tónico. Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México la indica sin uso contra el tabardillo.

La *Alternanthera caracasana*, también conocida en México como tianguis, en la actualidad se recomienda con frecuencia para fiebres, y afecciones del aparato digestivo y de la piel.

No existe información experimental que valide los usos, sin embargo es probable que su acción en el aparato digestivo, tenga cierta efectividad ya que se indica desde el siglo XVI y ha trascendido hasta el presente (Argueta, 1994).

OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta *Alternanthera caracasana*.
2. Purificar el principio activo y elucidar su estructura química.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realización de bioensayos preliminares para determinar la actividad biológica *in vitro* de las plantas a estudiar.

1.1. Obtención de los extractos herbales de diferente polaridad (desde polaridad baja hasta alta) utilizando diferentes solventes (hexanos, cloroformo, acetato de etilo, acetona y metanol).

1.2. Determinación de la actividad bactericida de los extractos herbales de acuerdo a la técnica de difusión en agar.

1.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Bactericida Media (CBM) mediante la técnica de dilución en caldo de los extractos que muestren actividad antimicrobiana.

2. Aislamiento del principio con actividad biológica presente en la planta.

2.1. Purificación del compuesto activo mediante técnicas cromatográficas.

2.2. Evaluación del potencial antimicrobiano de las fracciones de acuerdo al modelo de la microtécnica de dilución en caldo.

3. Elucidación de la estructura del compuesto biológicamente activo mediante estudios espectroscópicos (UV, resonancia magnética nuclear de protones RMN¹H, resonancia magnética nuclear de carbono 13 RMN¹³C y espectrometría de masas).

4. Determinación de la CMI y la CBM del compuesto activo.

METODOLOGIA

La planta utilizada para este trabajo fue *Alternanthera caracasana* (tianguis), se decidió trabajar con este organismos después de una revisión bibliográfica de 500 plantas medicinales utilizadas para tratar enfermedades gastrointestinales, reportadas en los libros de Aguilar, 1994 y 1996. La elección se hizo en base a criterios que favorecieran el desarrollo de la investigación y que estuvieran acordes a los recursos de la institución para apoyar la adquisición del ejemplar, como son: amplia distribución en el Area Metropolitana, facilidad de colecta y poca literatura al respecto. Además no se han realizado estudios químico biológicos en relación a la actividad antimicrobiana de esta planta.

I. OBTENCION DE LA PLANTA.

La planta a estudiar se colectó en la ENEP Iztacala y sus alrededores durante los mese de Julio-Agosto de 1996 y 1997.

II. BIOENSAYOS PRELIMINARES

1) PREPARACION DE EXTRACTOS. Los extractos se prepararon colocando 1 Kg de la planta completa seca en 5 litros de alcohol etílico en un recipiente de vidrio donde se dejó durante 25 días. Después se filtró y el exceso de solvente se destiló y se concentró el extracto a sequedad. Posteriormente este residuo se lavó con diferentes solventes (600 ml de cada uno) en orden creciente de polaridad (apéndice 5). Los diferentes extractos se concentraron a sequedad.

2) CUANTIFICACION DE SOLIDOS SOLUBLES. Se realizó de acuerdo al método propuesto por González-Peñalosa (1981), (apéndice 1).

3) MICROORGANISMOS UTILIZADOS. *Vibrio cholerae* No-01, *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislado de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico (estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba), *Vibrio cholerae* CDC V12 , *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Shigella boydii* ATCC 8700. , *Enterobacter aerogenes* , *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Sarcina lutea* fueron donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán. *Pseudomonas aeruginosa*, y *Candida albicans* fueron donadas por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI del Campus Iztacala.

4) EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA. El método que se utilizó para evaluar la actividad antibacteriana en los ensayos preliminares fue el de difusión en agar (Kirby-Bauer) (apéndice 2); y en los bioensayos de seguimiento para separar el principio activo se utilizó la microtécnica de dilución en caldo de Koneman (apéndice 4). En los bioensayos preliminares se utilizaron los preparados herbales antes descritos, cada bioensayo se realizó por triplicado.

III. EVALUACION CUANTITATIVA

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida media (CBM) se utilizó el método modificado de dilución en agar (ver apéndice 3), y la microtécnica de dilución en caldo (ver apéndice 4) (Koneman, 1985) cada bioensayo se realizó por triplicado.

IV. AISLAMIENTO Y ELUCIDACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.

Se realizó una colecta secundaria (Julio-Agosto 1997), de la cual se obtuvieron 7 Kg de planta seca, con la que se realizó lo siguiente:

1. Extracción. Los extractos se obtuvieron por medio del lavado con los diferentes solventes a utilizar del extracto hecho con etanol. (ver apéndice 5).

2. Aislamiento. Para separar los compuestos activos, se usaron técnicas cromatográficas de columna y de placa fina. Las características de ellas se describen en el apéndice 5.

3. Elucidación de las estructuras. La determinación de las estructuras se llevó a cabo mediante los estudios espectroscópicos siguientes: espectro de absorción en la región del ultravioleta y visible (200-800- nm), espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, el equipo y las condiciones de análisis se explican en el apéndice 5.

RESULTADOS Y ANALISIS

I OBTENCION DE LA PLANTA.

Como se indicó anteriormente, la planta fue colectada en los alrededores de la E.N.E.P. Iztacala durante los meses de julio a agosto (1996 y 1997), los datos generales de la planta se observan en los cuadros 3 y 4.

CUADRO 3
DATOS GENERALES DE LA PLANTA ESTUDIADA

Nombre científico	Alternanthera caracasana HBK
Número de registro	12136
Nombre común	Tianguis
Familia	Amaranthaceae

CUADRO 4
DATOS ETNOBOTANICOS DE LA PLANTA ESTUDIADA

Nombre científico	Alternanthera caracasana HBK
Parte usada de la planta	Toda la planta
Forma de preparación	Infusión
Epoca de colecta	julio-agosto 1996 y 1997

II BIOENSAYOS PRELIMINARES

Para estos bioensayos se obtuvieron diferentes extractos (desde baja hasta alta polaridad), dando los siguientes resultados en cuanto al rendimiento:

TABLA 1
RENDIMIENTO OBTENIDO DE SOLIDOS SOLUBLES DE *A. caracasana* CON DIFERENTES SOLVENTES, EL RENDIMIENTO (%) SE CALCULO CON RESPECTO A 1 Kg DE PLANTA SECA.

EXTRACTO	RENDIMIENTO (g)	RENDIMIENTO %
Hexanos	6.2	0.62
Cloroformo	3.4	0.34
Acetato de etilo	0.9	0.09
Acetona	0.8	0.08
Metanol	29.5	2.95

En la tabla anterior se puede observar que con el extracto de metanol se obtuvo el porcentaje más alto de rendimiento (2.95%) y los extractos de acetona y acetato de etilo los porcentajes más bajos de rendimiento (0.08 y 0.09% respectivamente).

Para determinar la actividad antimicrobiana, cada uno de los extractos obtenidos se ensayaron con 14 diferentes cepas de bacterias y con una de hongos, obteniéndose los resultados que se observan en la tabla 2.

**TABLA 2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS
DE LA PLANTA *Alternanthera caracasana*.**

MICROORGANISMO	CONTROL KANAMICINA	METANOL	ACETONA	ACETATO DE ETILO	CLORO- FORMO	HEXANOS
S. au	16.67 ± 0.58	10.07 ± 0.57	12.67 ± 1.15	13.67 ± 1.15	na	na
S. epi	16.00 ± 0.50	12.00 ± 1.0	12.67 ± 0.58	13.67 ± 0.58	na	na
B. sub	21.00 ± 0.50	na	8.00 ± 0.5	9.0 ± 1.0	na	na
S. lu	9.00 ± 0.50	na	9.33 ± 1.15	11.0 ± 0.5	na	na
V. ch. No-01	19.67 ± 0.58	na	8.00 ± 0.5	8.0 ± 0.5	na	na

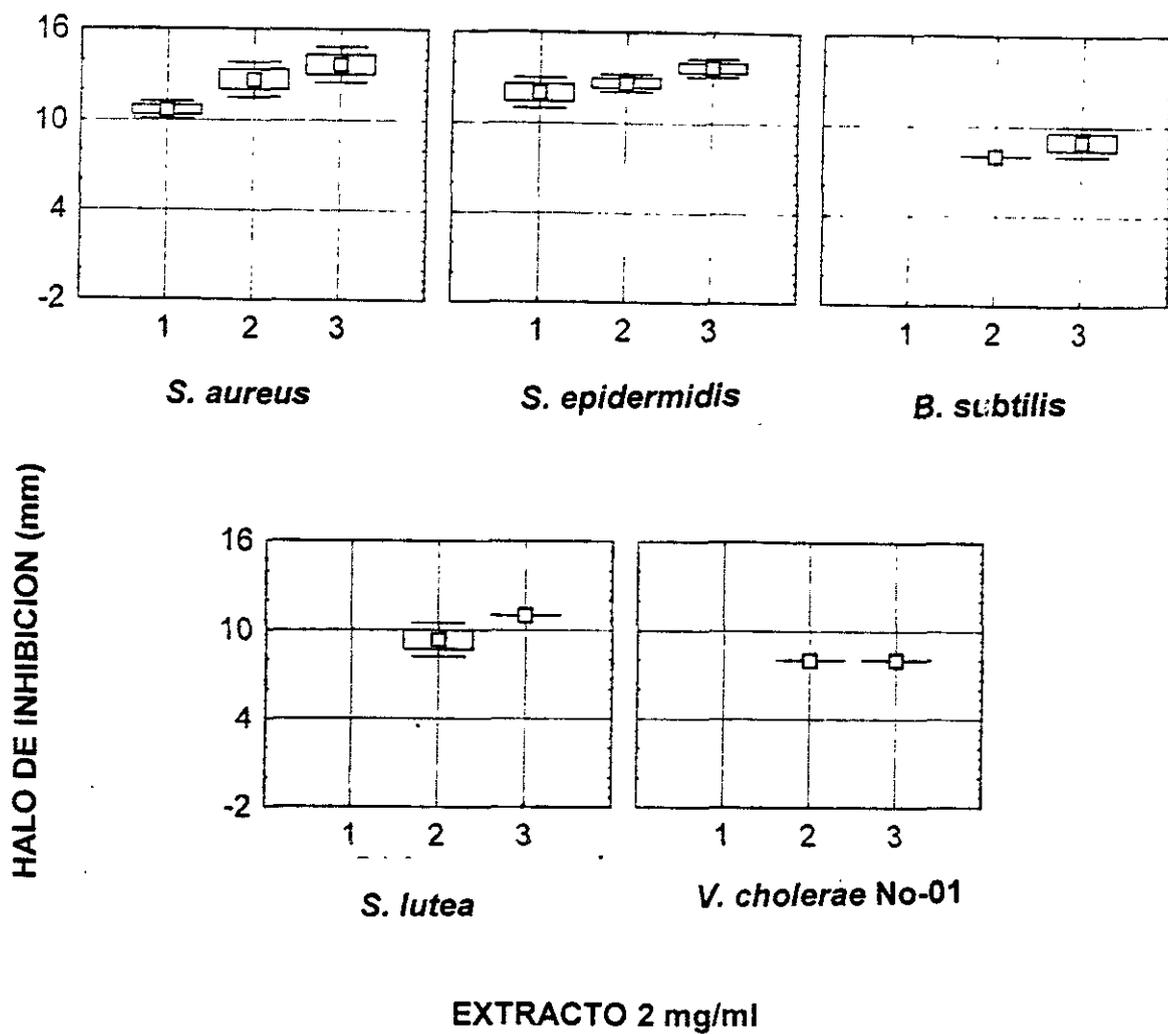
Halos de inhibición en milímetros (datos promedio de tres bioensayos). Todos los extractos fueron probados a una concentración de 2 mg/sensidisco. Las 9 cepas bacterianas y la de hongos que no se incluyen en la tabla no fueron sensibles a los extractos. na = no activo

Es importante recordar que en cada ensayo se probó un control negativo con el solvente correspondiente y se observó crecimiento bacteriano en todos éstos. Para el control positivo se utilizaron discos de Kanamicina (30 µg/ml).

Según los resultados expuestos en la Tabla 2 es evidente que los extractos que tuvieron actividad sobre los diferentes microorganismos fueron los extractos de metanol, acetona y acetato de etilo; estos tres extractos fueron activos para *S. aureus* y *S. epidermidis*; además los extractos de acetona y acetato de etilo fueron activos para *B. Subtilis*, *S. lutea* y *Vibrio cholerae* No-01. En las 9 cepas bacterianas restantes y en la de hongo no hubo actividad.

Para determinar si había diferencias estadísticamente significativas entre la actividad de los extractos, se aplicó una prueba de ANOVA ($P < 0.0008$). tomando como factores a los extractos (con 4 niveles: metanol, acetona, acetato de etilo y kanamicina) y bacteria (con cinco niveles: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. Subtilis*, *S. lutea* y *V. cholerae* No-01). Con esta prueba se determinó que si existían diferencias significativas entre la actividad de los extractos, es decir los extractos que resultaron positivos presentan un grado de actividad diferente entre sí; además el halo de inhibición de los extractos con respecto a los halos de Kanamicina (control positivo) para cada tipo de bacteria si son estadísticamente significativos, esto es que la inhibición del crecimiento de las bacterias se debe al efecto del extracto.

Una representación gráfica de la actividad de los extractos sobre las 5 cepas bacterianas se puede observar en la gráfica 1.



EXTRACTOS

1 Metanol

2 Acetona

3 Acetato de etilo

 ± Des. std.
 ± Error std.
 Media

GRAFICA 1. EXTRACTOS ACTIVOS SOBRE LAS 5 CEPAS BACTERIANAS SENSIBLES

En esta serie de gráficas, se puede observar que el extracto de acetato de etilo presentó mayor actividad, pero como la diferencia en el diámetro del halo es sólo alrededor de 1 mm , se puede decir que tanto el extracto de acetona como el de acetato de etilo presentaron la misma actividad.

Una vez que se encontró cuales extractos presentaron actividad antimicrobiana, se procedió a determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida media (CBM) de cada uno de los extractos activos. Los resultados se muestran en las tablas 3 y 4

TABLA 3
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA MEDIA
DEL EXTRACTO DE METANOL

[] mg/ml	BACTERIA	
	S.aureus	S. epidermidis
0.075	na	na
0.125	na	na
0.250	na	na
0.5	na	na
1.0	na	na
1.5	CMI	na
2.0	CBM	CBM
control negativo	na	na

na = no activo; CMI = concentración mínima inhibitoria; CBM = concentración bactericida media.

En la tabla 3 se puede observar que la concentración mínima inhibitoria (CMI) para *S. aureus* se encontró en 1.5 mg/ml del extracto de metanol y la concentración bactericida media (CBM) en 2.0 mg/ml. Para *S. epidermidis* la CBM se encontró en 2.0 mg/ml de extracto de metanol y la CMI debe ser mayor de 1.5 mg/ml y menor de 2.0 mg/ml

Para el extracto de acetona la CMI y CBM no se encontraron en ninguna de las concentraciones ensayadas, es decir están por arriba de 2 mg/ml.

TABLA 4
CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA Y BACTERICIDA MEDIA
DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

BACTERIA					
[] mg/ml	S. au	S. epi	B. sub	S. lu	V. ch No-01
0.075	na	na	na	na	na
0.125	na	na	na	na	na
0.25	na	na	na	na	na
0.5	na	na	na	na	na
1.0	CMI	na	na	na	na
1.5	CBM	na	na	CMI	CMI
2.0	+	CMI	na	+	CBM

na = no activo; CMI = concentración mínima inhibitoria; CBM = concentración bactericida media.

En la tabla 4 se observa que el extracto de acetato de etilo es el más activo, para *S. aureus*, la CMI está en 1 mg/ml y la CBM en 1.5 mg/ml; para *S. epidermidis* la CMI está en 2 mg/ml y la CBM por arriba de este valor; para *S. lutea* la CMI está en 1.5 mg/ml y la CBM está por arriba de 2.0 mg/ml; para *V. cholerae No-01* la CMI está en 1.5 mg/ml y la CBM en 2.0 mg/ml; finalmente para *B. subtilis* la CMI y la CBM están por arriba de 2.0 mg/ml.

III AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS

De los extractos con actividad antibacteriana se obtuvieron en la segunda extracción a partir de 7 Kg de planta seca 3.08 g (0.044%) para el extracto de acetato de etilo, 3.37 g (0.048%) para el de acetona y 170.072 g (2.43%) para el de metanol.

Del extracto de acetato de etilo que fue el que tuvo los valores más altos de halos de inhibición (13.67 ± 1.15), se procedió a separar los compuestos activos, para lo cual se seleccionó la fase móvil y la fase estacionaria más adecuada para separar mediante cromatografía en placa fina (CPF) dichos componentes. Estos parámetros fueron utilizados posteriormente en la elaboración de la cromatografía en columna para separar los diferentes compuestos y así poder evaluar su actividad biológica. El adsorbente utilizado en la separación fue sílica gel malla 70-230 μ , la fase estacionaria estuvo formada por hexanos y las fases móviles se obtuvieron por prueba de ensayo y error.

La fase móvil para la primer cromatografía fue cloroformo-acetato de etilo-hexanos 1.5-0.5-0.5, con lo cual se obtuvieron 9 fracciones (Tabla 5), con éstas se realizó el bioensayo utilizando la microtécnica de dilución en caldo y aplicando 1 mg de extracto /ml de caldo, con las 5 cepas en donde el extracto fue activo (Tabla 6). Como control positivo se utilizó Lincomicina 30 μ g/ml. El control negativo consistió en 2 μ l de acetato de etilo en 100 μ l de caldo. Cada bioensayo se realizó por triplicado.

TABLA 5 RENDIMIENTO DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO, 3.08 g (A PARTIR DE 7 Kg DE PLANTA SECA) OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA. Sílica gel malla 70/230; fase móvil cloroformo-acetato de etilo-hexanos 1.5-0.5-0.5

FRACCION	RENDIMIENTO (g)	RENDIMIENTO (%)
1	0.45	6.43×10^{-3}
2	0.18	2.57×10^{-3}
3	0.06	8.57×10^{-4}
4	0.07	1.00×10^{-3}
5	0.1	1.43×10^{-3}
6	0.13	1.86×10^{-3}
7	0.07	1.00×10^{-3}
8	0.014	2.00×10^{-4}
9	0.05	7.14×10^{-4}

TABLA 6. ACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.

BACTERIA	F R A C C I O N								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
S. au	-	+	+	-	+	-	-	-	+
S. epi	-	+	+	+	+	-	-	+	+
S. lu	-	+	+	-	-	-	-	-	+
B. sub	-	+	+	+	+	-	-	+	+
V.ch No-01	-	+	+	+	-	-	-	-	+

Control positivo lincomicina 30 µg/ml

Control negativo 2 µl de acetato de etilo en 100 µl de caldo

Cada bioensayo se realizó por triplicado.

Como se muestra en la Tabla 6, las fracciones 2, 3 y 9 son las que presentaron actividad en las 5 bacterias ensayadas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. lutea*, *B. Subtilis* y *V. cholerae No-01*). La fracción 9 fue la de menor rendimiento (50 mg) por lo que ya no se le consideró en ensayos posteriores. Las fracciones 3, 4 y 5 se juntaron porque presentaron manchas con Rf muy semejante. Por lo tanto de las 9 fracciones inicialmente obtenidas se redujeron a dos (Tabla 6), siendo las fracción formada por la unión de las fracciones 3, 4 y 5 la de mayor rendimiento (230 mg).

La fracción 2 (180 mg) se recromatografió en una placa preparativa utilizando la fase móvil cloroformo-acetato de etilo-hexanos 1.5-0.5-0.5, de lo cual se obtuvieron 8 fracciones (Tabla 7), que se bioensayaron y las que tuvieron actividad fueron las fracciones II, III; IV y VII sobre las 5 bacterias.

TABLA 7. BIOENSAYO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS AL RECROMATOGRAFIAR LA FRACCION 2 ACTIVA DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO. Concentración del sensibilizador 1 mg/ml

BACTERIA	F R A C C I O N							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
S. au	+	+	+	+	-	+	+	-
S. epi	-	+	+	+	-	+	+	-
S.lu	-	+	+	+	-	-	+	-
B. sub	-	+	+	+	-	-	+	+
V.Ch No-01	+	+	+	+	-	+	+	-

Como la fracción IV sólo disminuyó el crecimiento bacteriano, sólo se procedió a recromatografiar las fracciones II, III y VII.

Cada fracción se analizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución y se observó que cada una de ellas presentaba varios compuestos, por lo que se procedió a recromatografiar en placa preparativa usando como fase móvil cloroformo-acetato de etilo-hexanos 1.5-0.5-0.5 obteniéndose de la fracción II, 9 manchas, las cuales se bioensayaron y sólo se tuvo actividad en la fracción II-2 (Tabla 8).

TABLA 8. BIOENSAYO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS AL RECROMATOGRAFIAR LA FRACCION II ACTIVA DE LA FRACCION 2 DE ACETATO DE ETILO.

FRACCION	ACTIVIDAD
II-1	-
II-2	+
De II-3 a II-9	-

En la Tabla 9, se observa que al recromatografiar la fracción III, se obtuvieron 6 manchas, siendo la fracción III-2 la única que tuvo actividad.

**TABLA 9. BIOENSAYO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS AL
RECROMATOGRAFIAR LA FRACCION III ACTIVA DE LA FRACCION 2 DE
ACETATO DE ETILO.**

FRACCION	ACTIVIDAD
III-1	-
III-2	+
De III-3 a III6	-

De la fracción VII se obtuvieron 11 manchas, pero sólo hubo actividad en las fracciones VII-1 y VII-2 (Tabla 10).

**TABLA 10. BIOENSAYO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS AL
RECROMATOGRAFIAR LA FRACCION VII ACTIVA DE LA FRACCION 2 DE
ACETATO DE ETILO**

FRACCION	ACTIVIDAD
VII-1	+
VII-2	+
De VII-3 a VII-11	-

A partir de las fracciones 3, 4 y 5 que se obtuvieron en la primera cromatografía, se realizó una nueva separación cromatográfica en placa preparativa usando como fase móvil cloroformo-acetato de etilo-hexanos 1.5-0.5-0.5, de ésta se obtuvieron 14 manchas (Tabla 11), y sólo las fracciones A-2 y A-3 tuvieron actividad.

**TABLA 11. BIOENSAYO DE LAS FRACCIONES 3, 4 Y 5 ACTIVAS DEL
EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO**

FRACCION	ACTIVIDAD
A-1	-
A-2	+
A-3	+
De A-4 a A-14	-

Una vez obtenidas las fracciones activas se procedió a determinar su rendimiento (Tabla 12).

**TABLA 12. RENDIMIENTO DE LAS FRACCIONES ACTIVAS DEL EXTRACTO DE
ACETATO DE ETILO (A PARTIR DE 7 Kg DE PLANTA SECA).**

FRACCION	PESO (mg)	% (X10 ⁻⁴)
II-2 y III2	18.0	3.6
VII-1	6.1	1.22
VII-2	6.1	1.22
A-2	16.9	3.38
A-3	11.3	2.26

Se presumía de la pureza de las fracciones que se observan en la tabla 12, porque al correr la cromatografía en placa fina, se observó una mancha ovalada de cada fracción, por lo que se corrieron los espectros de masas de cada una de estas fracciones obtenidas, pero resultó que ninguna estaba pura, puesto que en dichos espectros salían muchos picos que indicaban impureza, tomando en cuenta el bajo rendimiento de estas fracciones se tomó la decisión de lavar el extracto de acetona (3.37 g, 0.048%) con acetato de etilo para extraer las colas de los compuestos activos, de esta extracción se obtuvieron 2.34 g de rendimiento, con esto se realizó una cromatografía en columna (fase móvil cloroformo-acetato de etilo-hexanos 1:1:1), de la que se obtuvieron 9 fracciones (Tabla 13).

TABLA 13. RENDIMIENTO DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE ACETONA LAVADO CON ACETATO DE ETILO, OBTENIDAS DE LA CROMATOGRAFIA EN COLUMNA. (SILICA GEL MALLA 70/230, FASE MOVIL CLOROFORMO-ACETATO DE ETILO-HEXANOS 1:1:1).

Fracción	Rendimiento (mg)	Rendimiento %
1	56.4	8.1×10^{-4}
2	27.4	3.9×10^{-4}
3	75.7	1.1×10^{-3}
4	520.7	7.4×10^{-3}
5	5.1	7.3×10^{-5}
6	13.4	1.9×10^{-4}
7	22.0	3.1×10^{-4}
8	22.0	3.1×10^{-4}
9	325.2	4.6×10^{-3}

Con estas fracciones (Tabla 13) se realizó un bioensayo utilizando la microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1985) aplicando 1 mg de extracto/ml de caldo, con las cinco cepas sensibles. Como control positivo se utilizó lincomicina 30 mg/ml. El control negativo consistió en 2 µl de acetato de etilo en 100 µl de caldo, cada bioensayo se realizó por triplicado. Es necesario aclarar que las fracciones 5 y

6 debido a su escaso rendimiento se ensayaron sólo con dos bacterias (*S. aureus* y *V. cholerae* – No 01). Los resultados se observan en la tabla 14.

TABLA 14. ACTIVIDAD DE LAS FRACCIONES DEL LAVADO CON ACETATO DE ETILO DEL EXTRACTO DE ACETONA.

Bacteria	Fracción								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
S. au	+	+	+	+	+	-	-	-	+
S. epi	-	-	-	+			-	-	-
S. lu	-	-	-	+			-	-	-
B. sub	-	-	-	+			-	-	-
V.ch.No-01	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Afortunadamente, una de las fracciones con mayor rendimiento (fracción 4 con 520.7 mg) fue la de mayor actividad. Esta fracción se recromatografió en columna, iniciando como fase móvil con la mezcla de cloroformo-hexanos (1.5:1), continuando con cloroformo-acetona 2:0.5, cloroformo acetona 2:1, cloroformo-acetona 1:1, cloroformo-metanol 2:1 y metanol. De esta cromatografía se obtuvieron 7 fracciones más (Tabla 15) a las cuales se les evaluó la actividad de acuerdo a la microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1985) resultando que las fracciones 3, 4 y 6 sólo disminuyeron el crecimiento de las bacterias. La fracción 5 produjo la mayor actividad, por lo cual se decidió recromatografiar esta fracción en una placa preparativa, utilizando como fase móvil cloroformo y corriendo dos veces la placa. De esta cromatografía se obtuvieron 7 manchas, de las cuales sólo una tuvo actividad, la fracción activa cristalizó y el rendimiento fue de 12.4 mg ($1.71 \times 10^{-4}\%$), esta fracción ya estaba pura, por lo que se procedió a realizar estudios espectroscópicos para determinar su estructura química.

**TABLA 15. RENDIMIENTO DE LA RECROMATOGRAFÍA DE LA
FRACCIÓN 4. EL CALCULO DEL PORCENTAJE ES CON RESPECTO A
7 Kg DE PLANTA.**

Fracción	Rendimiento (mg)	Rendimiento %
1	82.8	1.18×10^{-3}
2	97.6	1.39×10^{-3}
3	18.0	2.57×10^{-4}
4	67.7	9.67×10^{-4}
5	35.8	5.11×10^{-4}
6	44.6	6.37×10^{-4}
7	50.4	7.2×10^{-4}

IV ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA QUIMICA DEL COMPUESTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

Para confirmar si la fracción activa estaba pura, se corrió una cromatografía en placa fina, usando como fase móvil cloroformo. Al observar bajo luz UV a 320 nm, se detectó una sola mancha, de forma ligeramente ovalada que fluorescía de color azul muy intenso. También se reveló con yodo y sólo apareció una mancha, esto indicó que el compuesto estaba puro. Posteriormente se realizaron los siguientes estudios físicos y espectroscópicos: punto de fusión, espectro de absorción en el ultravioleta, resonancia magnética nuclear de protones (RMN¹H), resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN¹³C) y espectrometría de masas.

En la tabla 16 se dan los datos de algunos parámetros evaluados de la fracción activa.

TABLA 16. PARAMETROS DE LA FRACCION ACTIVA PURA OBTENIDA DE LA PLANTA *Alternanthera caracasana*.

Rendimiento	12.4 mg ($1.77 \times 10^{-4}\%$)
R _f (CPF, sílica gel 60 F 254 μ ; fase móvil cloroformo)	0.55
Fluorescencia UV 320 nm	Azul intenso
Punto de fusión	115 – 119°C

Como se observa en la tabla anterior, el rendimiento de la fracción activa (12.4 mg) es muy escaso, pero suficiente para poder llevar a cabo los estudios de espectrometría. En la placa preparativa la mancha se localizó un poco por arriba de

la mitad del frente del solvente (cloroformo) pues se obtuvo un R_f de 0.55. El color azul intenso observado bajo luz UV a 320 nm indicó que posiblemente el compuesto estaba conformado por anillo aromático conjugado. Al evaluar el punto de fusión se observó que éste fue de 115°C a 119°C, lo anterior muestra que el compuesto tiene un grado de pureza aceptable.

Los resultados obtenidos de los espectros son los siguientes.

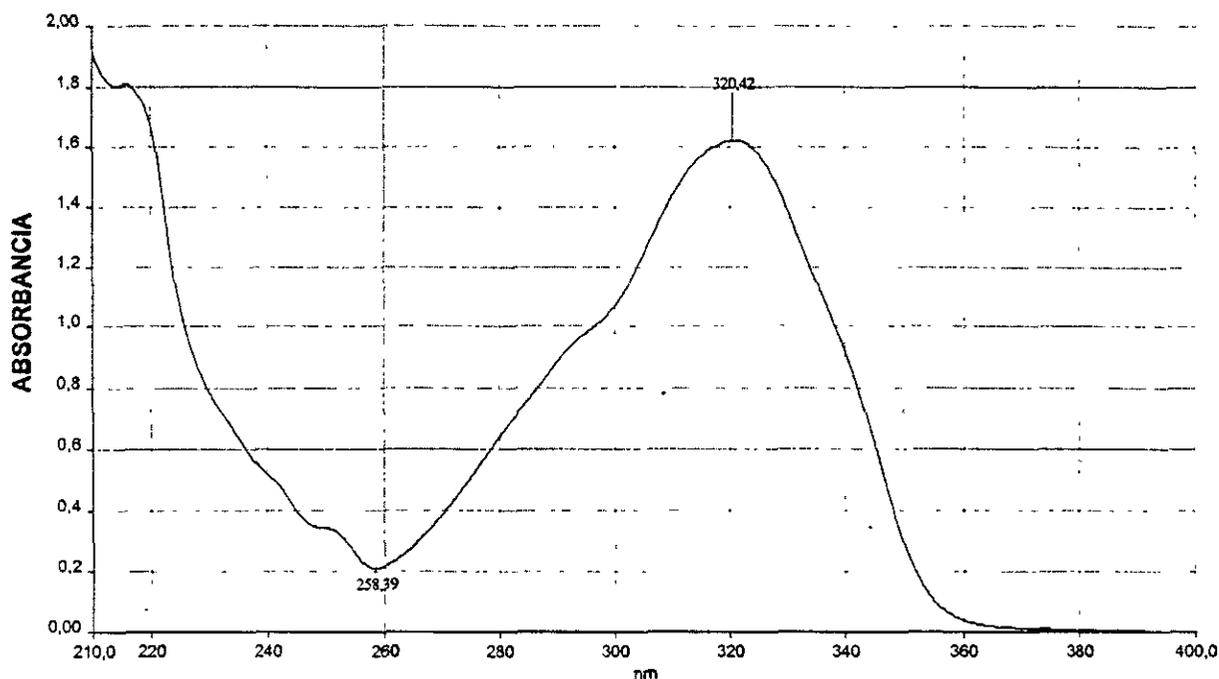


FIGURA 8. ESPECTRO UV DEL COMPUESTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA AISLADO DE *A. caracasana*.

En el espectro de absorción UV (Figura 8), se observa un máximo de absorción en λ_{Max} 320.42 nm, lo cual sugiere que se trata de un compuesto aromático, probablemente una cumarina pues éstas absorben a alrededor de 320 nm en luz ultravioleta (Murray, 1978; Harbone, 1989).

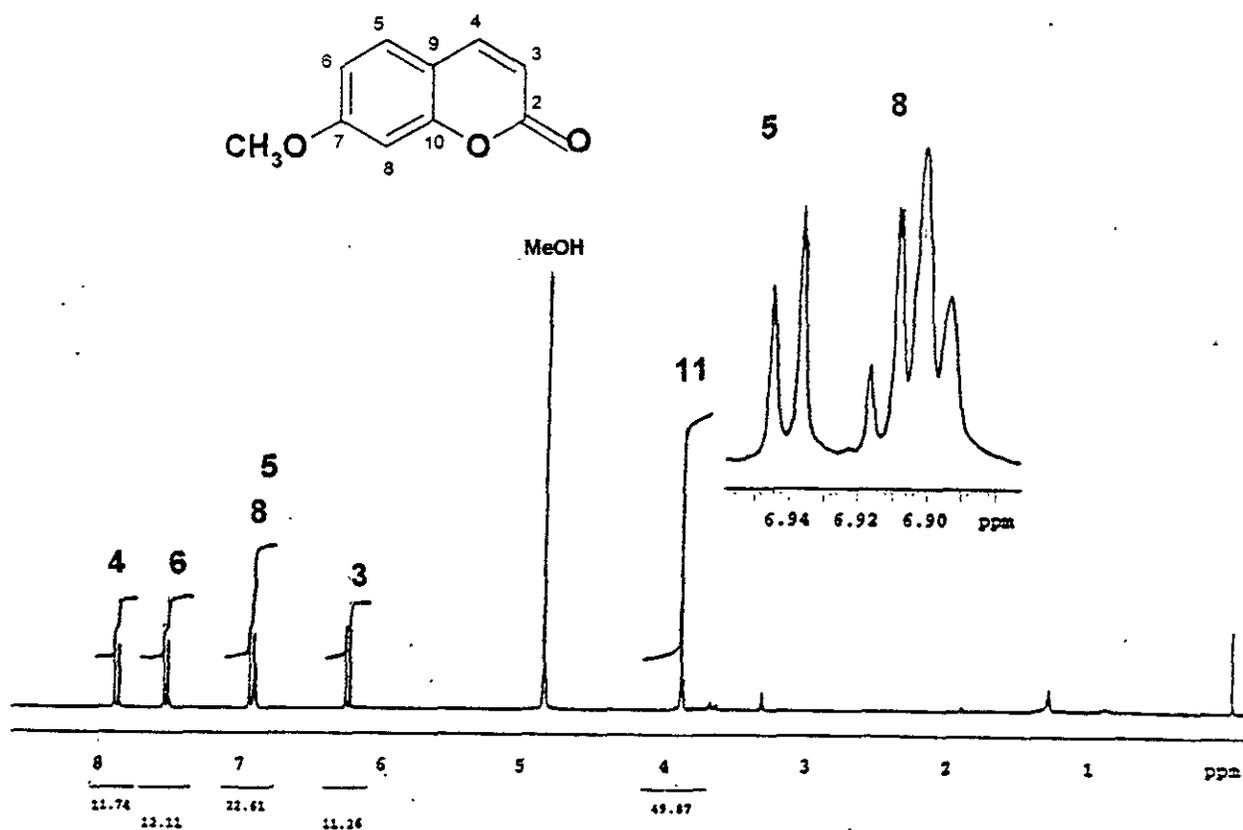


FIGURA 9. ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE PROTONES (RMN^1H) DEL COMPUESTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA AISLADO DE *A. caracasana*.

El espectro de RMN^1H (Figura 9), se registró utilizando tetrametil-silano como referencia.

En 3.88 ppm, se observa un singulete que integra para tres protones, característico de grupo metoxilo ($\text{CH}_3\text{O}-$). En 4.83 ppm es la señal del metanol deuterado que se utilizó como solvente. En 6.239 ppm (valor promedio de 6.223 ppm y 6.255 ppm) se tiene la señal del protón vinílico del hidrógeno del C-3. Entre 6.893

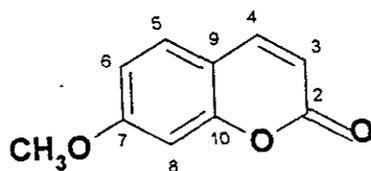
ppm a 6.945 ppm (valor promedio igual a 6.917 ppm) se puede observar un multiplete que es el resultado de los protones de los hidrógenos de los C-8 y C-5, aunque el hidrógeno del C-5 es parte de anillo bencénico, su señal se separa de los hidrógenos de los carbonos seis y ocho, debido a que el oxígeno del grupo metoxilo tiene un efecto inductor y por lo tanto se desplaza a campo alto.

Finalmente en 7.525 ppm (valor promedio de 7.511 ppm y 7.539 ppm) aparece la señal del protón del hidrógeno del C-6 que se observa como un doblete al igual que en 7.873 ppm (valor promedio de 7.857 ppm y 7.889 ppm) señal del protón del hidrógeno del C-4, estos dos protones corresponden a señales en campos bajos puesto que son protones desprotegidos, ya que en el benceno los electrones π están delocalizados alrededor del anillo y bajo la influencia de un campo magnético externo, estos electrones π son inducidos a circular alrededor del anillo, originando la denominada corriente de anillo que desprotege a los protones adyacentes y por lo tanto llevar a resonancia ha dichos protones requiere de un campo menor. Con los desplazamientos obtenidos, se realizó el cálculo de las constantes de acoplamiento (J), obteniendo que los protones de los hidrógenos del C-5 y C-6 están acoplados ya que ambos presentan una $J=8.4$; mientras que los protones de los hidrógenos del C-4 y C-3 están acoplados pues ambos presentan el mismo valor de $J=9.6$. En la tabla 17 se resumen todos los desplazamientos químicos y las asignaciones del espectro de RMN¹H.

TABLA 17. DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS OBSERVADOS EN EL ESPECTRO DE RMN¹H

Protón (asociado al carbono)	Desplazamiento (ppm)	Integración	Acoplamiento J	Multiplicidad	Grupo
11	3.888	3H		s	CH ₃ O
3	6.239	1H	9.6	d	vinílico
8 y 5	6.917	2H	8.4	m	aromático
6	7.525	1H	8.4	d	aromático
4	7.873	1H	9.6	d	vinílico

Los valores de los desplazamientos químicos de los protones en las posiciones de los carbonos 3, 4 y 5, 6 y 8 son los promedios de los datos obtenidos en el espectro de RMN¹H.



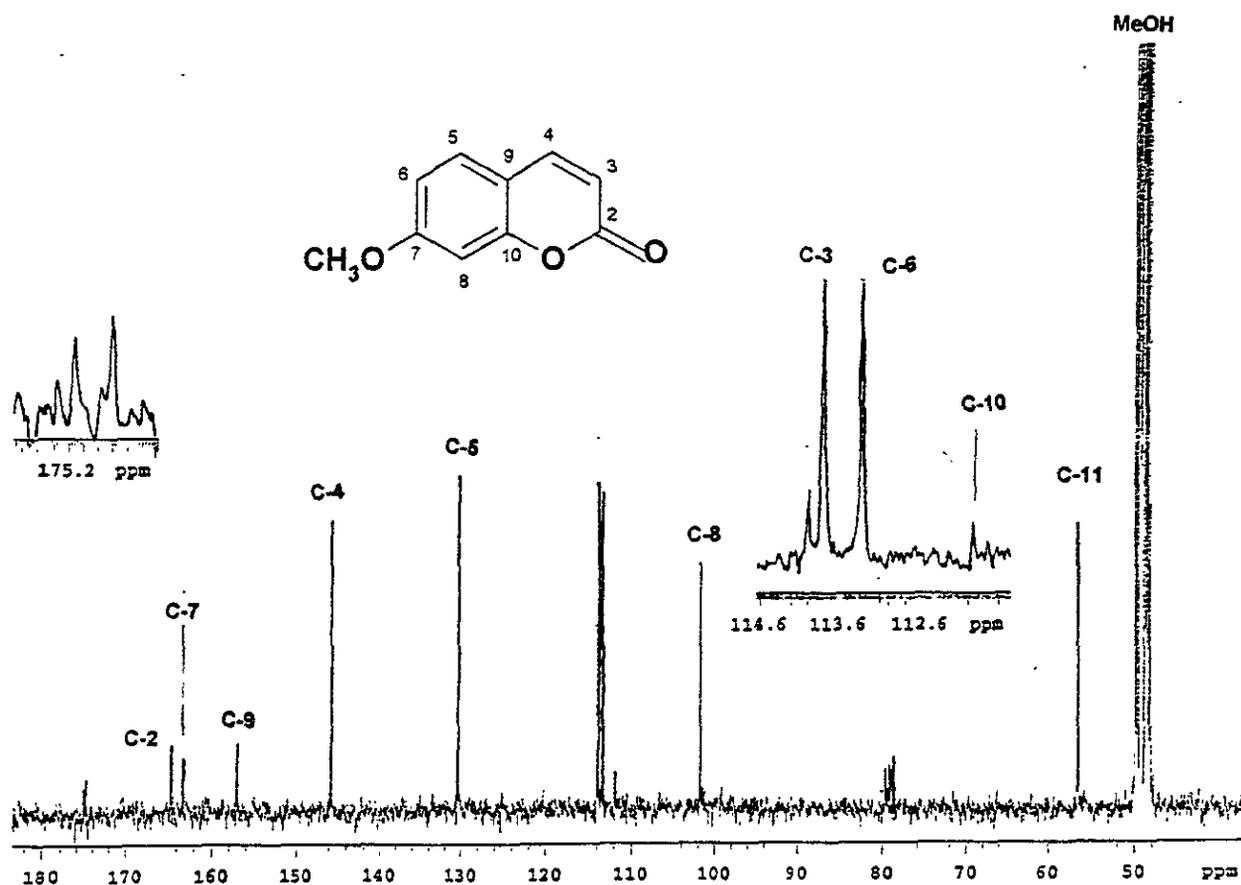


FIGURA 10. ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE CARBONO 13 (RMN¹³C) DEL COMPUESTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA AISLADO DE *A. caracasana*

Para el espectro de RMN¹³C (Figura 10), se asignaron las señales a los carbonos según el modelo propuesto por Harbone, 1989.

Como se puede observar en este espectro el compuesto está formado por diez carbonos. Entre 49 a 50 ppm se localiza la señal del solvente utilizado, que fue metanol deuterado. En 80 ppm se localiza la señal del cloroformo que es el residuo de la fase móvil de la cromatografía de donde se obtuvo el compuesto.

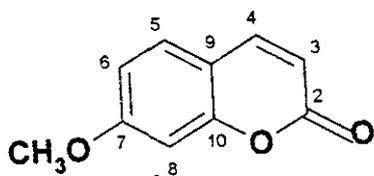
El desplazamiento 56.410 ppm cae dentro de la señal de los alcanos, sp^3 que va de 0 a 80 ppm (Kemp, 1991), en este caso corresponde a la señal del carbono número 11 que está unido a un oxígeno y tres hidrógenos (metoxilo).

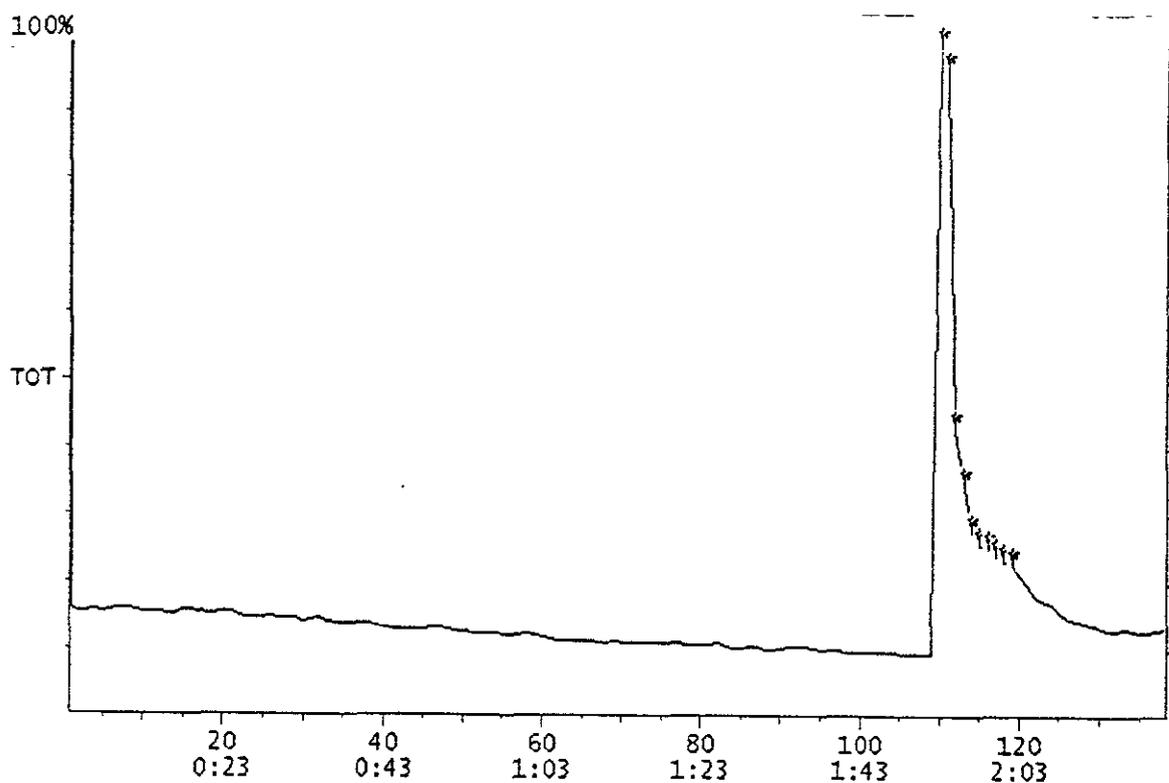
La señal del carbono dos (164.686 ppm), carbono 7 (163.354 ppm) y carbono 9 (157.145 ppm) se localiza a la izquierda del espectro, dentro de la zona de los carbonos de ésteres y ácidos carboxílicos (150 – 180 ppm) (Kemp, op cit.).

Finalmente, la señal del carbono 4 (145.710 ppm), carbono 5 (130.374 ppm), carbono 3 (113.801 ppm), carbono 6 (113.321 ppm), carbono 10 (111.938 ppm) y carbono 8 (101.733 ppm) se localiza en la región central del espectro, en la zona de los carbonos aromáticos y heteroaromáticos (sp^2) (110 a 140 ppm) (Kemp, op cit.). En la tabla 18, se observan los desplazamientos químicos del espectro de RMN¹³C, donde se puede observar que las diferencias entre asignaciones de Harbone, 1989 y las del espectro del compuesto aislado de *A. caracasana* son mínimas.

TABLA 18. DESPLAZAMIENTOS QUIMICOS DEL ESPECTRO DE RMN¹³C. LA ASIGNACIÓN DE LAS SEÑALES SE HIZO DE ACUERDO AL MODELO DE HARBONE, 1989.

Carbono	Asignación por ¹³ C (ppm)	Harbone, 1989 (ppm)
2	164.686	160.8
3	113.801	112.7
4	145.710	143.3
5	130.374	128.7
6	113.321	112.1
7	163.354	162.6
8	101.733	100.6
9	157.145	155.6
10	111.938	112.3
11	56.410	





**FIGURA 11. TERMOGRAMA DEL COMPUESTO CON ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA AISLADO DE *A. caracasana*.**

En la figura 11 se presenta el termograma del compuesto activo aislado de *A. caracasna*, en donde se observa un solo pico, lo cual confirma que el compuesto tiene un grado de pureza elevado.

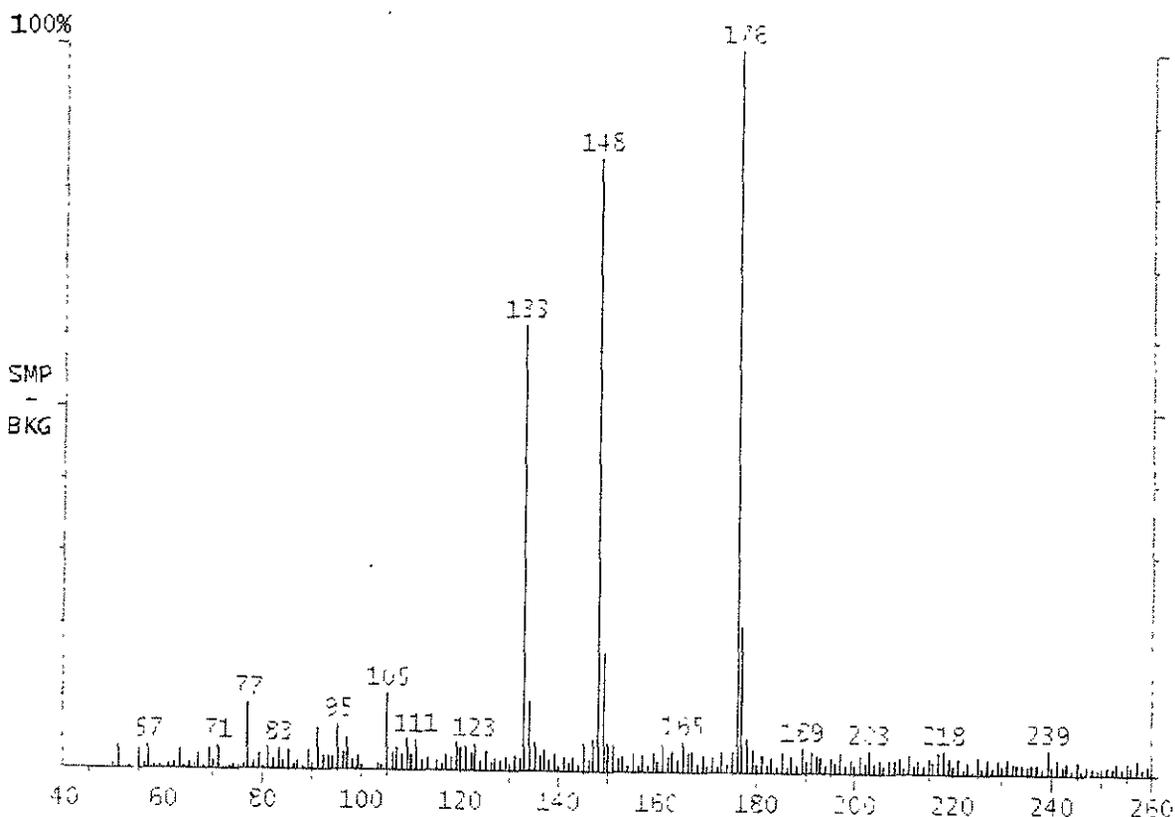


FIGURA 12. ESPECTRO DE MASAS DEL COMPUESTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA AISLADO DE *A. caracasana*.

En el espectro de masas (Figura 12) se observa que el ion molecular del compuesto es de 176 e/z, el cual coincide con el de la 7-metoxi-cumarina ($C_{10}H_8O_3$). Con los datos que se obtuvieron de este espectro se propone el siguiente patrón de fragmentación (Figura 13), donde se puede observar que el fragmento 148 e/z ($C_9H_8O_2$) se origina por la pérdida de M-28 del pico base (176 e/z), dicha pérdida corresponde al monóxido de carbono (CO); el fragmento 133 e/z ($C_8H_5O_2$) se

produce por la pérdida de M-43 ($\text{CH}_3\text{-O=C}$) del pico base; el fragmento 105 e/z ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}$) se forma por la pérdida de M-28 (CO) del fragmento 133 e/z ($\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_2$), finalmente el fragmento 77 e/z (C_6H_5) se produce por la pérdida de M-28 (CO) del fragmento 105 e/z ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}$).

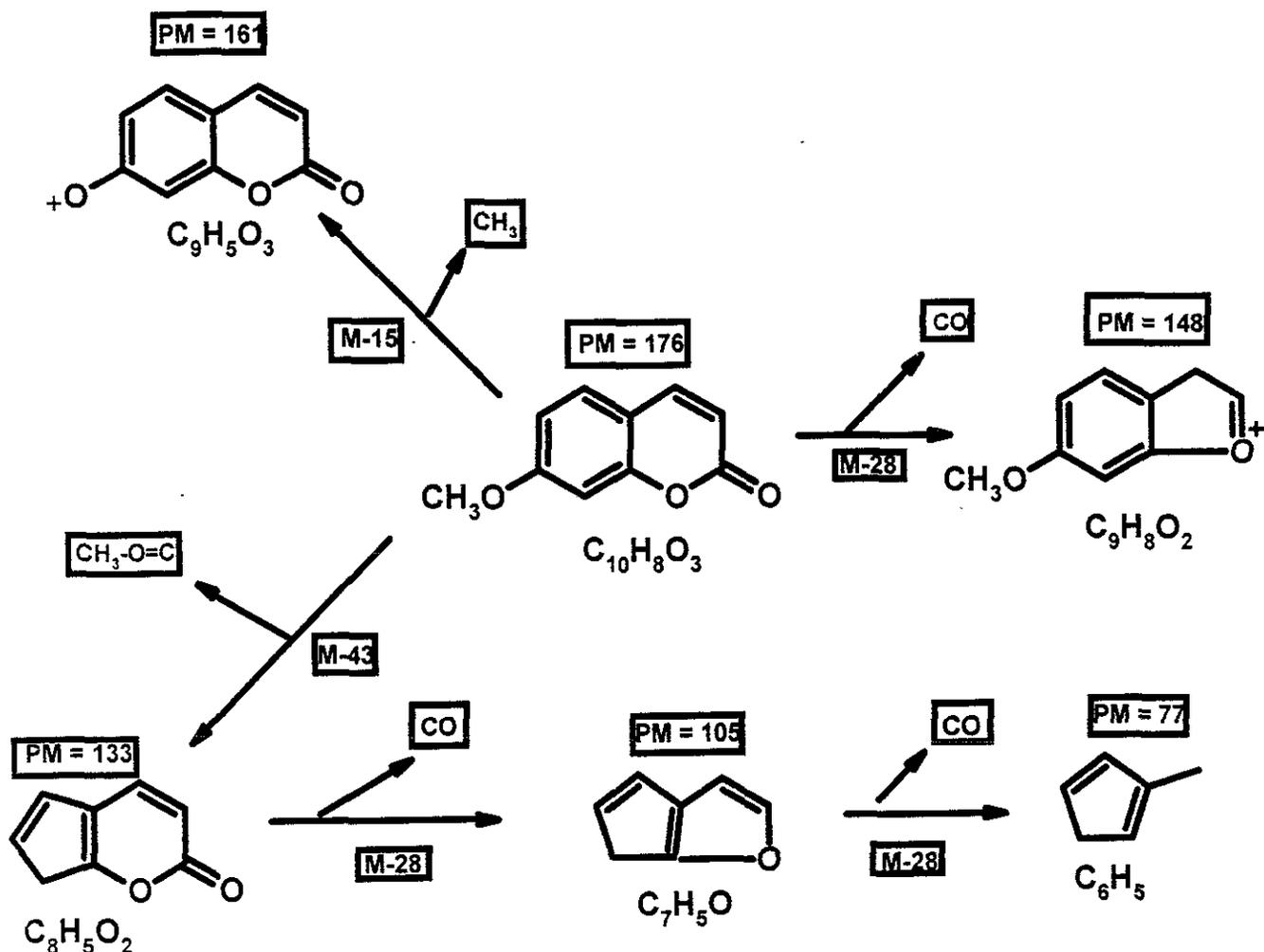


FIGURA 13. PATRÓN DE FRAGMENTACIÓN DEL COMPUESTO 7-METOXI-CUMARINA AISLADO DE LA PLANTA *A. caracasana*.

Con las constantes espectroscópicas registradas con los espectros de UV, RMN¹H, RMN¹³C y de masas, se llegó a la determinación de la estructura química del compuesto con actividad antimicrobiana, resultando ser la 7-metoxi-cumarina, cuya fórmula se muestra en la figura 14.

7-metoxi-cumarina

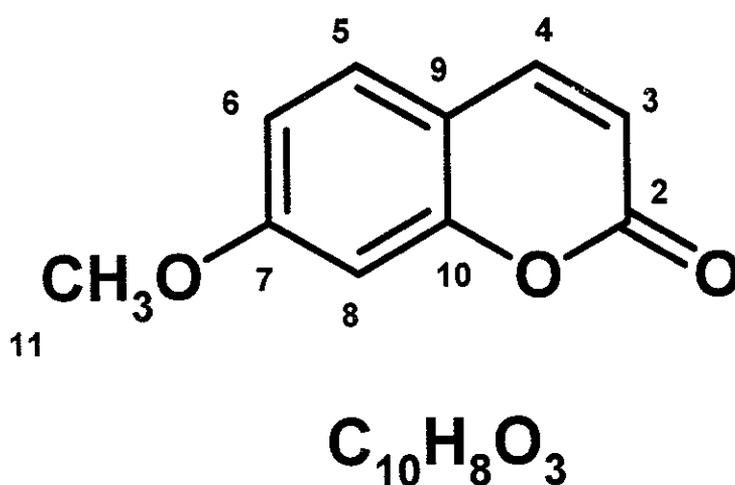


FIGURA 14. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL COMPUESTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA OBTENIDO DE *A. caracasana*.

V. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA 7-METOXI-CUMARINA, AISLADA DE LA PLANTA *A. caracasana*.

La evaluación antimicrobiana de la 7-metoxi-cumarina se realizó por medio de la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida media (CBM), utilizando la microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1985), los resultados se muestran en la Tabla 19, donde se observa que la cepa de *V. cholerae* No-01 fue más sensible que las otras cuatro, ya que presentó la CMI en 0.5 mg/ml y la CBM en 1 mg/ml. Comparando la actividad de la 7-metoxi-cumarina con respecto a los datos obtenidos de CMI y de CBM del extracto de acetato de etilo (tabla 19) se obtuvieron ambos parámetros en concentraciones menores, ya que en el extracto de acetato de etilo, la CMI más baja fue en 1 mg/ml y la CBM más baja fue en 1.5 mg/ml.

TABLA 19. CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACION BACTERICIDA MEDIA (CBM) DE LA 7-METOXI-CUMARINA

Bacteria	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)
S. au	0.5	>1.0
S. epi	0.75	>1.0
B. sub	0.75	>1.0
S. lu	0.75	>1.0
V. ch No-01	0.5	1.0

DISCUSION

Como se mencionó en los resultados, la planta se colectó durante los meses de julio y agosto, que es la temporada del año cuando hay lluvias abundantes que permiten el desarrollo óptimo del tianguis y su mayor floración, el hecho de haber colectado en esta época fue un factor importante, ya que según Rhodes, 1985, la síntesis de fenilpropanoides (entre ellos las cumarinas) es afectada por el medio ambiente, las condiciones nutricionales, hormonales, así como varios factores de estrés.

El hecho de no existir estudios previos sobre la planta trabajada, lleva a tener que extraer muchos compuestos por polaridad, sin embargo una vez que se conoce la naturaleza del compuesto que se desea aislar es mucho más fácil su obtención y por supuesto el rendimiento será mayor.

El extracto donde se tuvo mayor actividad antimicrobiana fue el de acetato de etilo, lo cual coincide con lo que menciona Harbone, 1973, quien sugiere que para extraer cumarinas se utilice precisamente acetato de etilo ó éter.

Como se mencionó en los resultados, se obtuvieron cinco fracciones con actividad antimicrobiana, pero desafortunadamente no estaban puras y esto se debió a que se presentaron más de un compuesto con polaridades muy semejantes, aunado a lo anterior se tuvo un rendimiento escaso y si se hubieran recromatografiado, seguramente lo que se obtuviera sería tan poco que no alcanzaría para la realización de espectros y pruebas de actividad.

Finalmente se obtuvo el compuesto puro con actividad antimicrobiana, la 7-metoxi-cumarina, cuyos parámetros evaluados coinciden con la bibliografía consultada, ya que Harbone, 1989, menciona que este compuesto presenta un color azul intenso al observarlo en placa fina bajo luz UV y que la absorción máxima en el espectro de UV se da en 325 nm, éstos datos coinciden con lo observado en el compuesto que se aisló, sólo que la absorción en UV se dio en 320.42 nm.

En cuanto al punto de fusión, Pourchet, *et al.* (1993) reporta la temperatura de 119°C y el compuesto que se obtuvo alcanzó su fusión total también a 119°C.

Con respecto a los espectros de RMN¹H y RMN¹³C se hizo una comparación con los datos reportados por Pourchet, *op cit.*, para la 7-metoxi-cumarina y se da una coincidencia total para cada uno de los desplazamientos químicos obtenidos. Además, los valores asignados por Harbone, 1989, en el espectro de RMN¹³C varían muy poco con respecto a los datos aquí registrados.

Teniendo en cuenta que las cumarinas han sido reportadas como poseedoras de diferentes efectos biológicos como antibióticos, actividad fitotóxica, daño hepático, carcinogénesis, etc (Harbone, 1982; Murray, 1982; Brown, 1985), esto nos explica el hecho de que la 7-metoxi-cumarina haya actuado sobre las cinco diferentes cepas bacterianas. Además, Swain, 1977; Bell, 1981; Harbone, 1982; Surico *et al.*, 1987, explican que la acumulación de fenilpropanoides se reconoce como mecanismo de defensa usado por las plantas en respuesta al ataque de patógenos.

También se han evaluado actividades antitumorales; además de usarse como correctoras de olor y sabor en productos farmacéuticos y en la industria alimenticia, pero se prohibió su uso, ya que se detectó daño hepático (Gros, 1985).

En 1998, Zavala, M. *et al.* publicaron que el extracto acuoso de *Alternanthera repens* (sinónimo de *A. caracasana*), presentó actividad contra la diarrea provocada en ratas con aceite de castor y sulfato de magnesio, esto es lógico ya que posiblemente la cumarina presente en esta planta presentó una acción antiespasmódica (Gros, *et al.* 1985), deteniendo así la diarrea.

Con lo antes mencionado se comprende que las cumarinas al presentar una estructura planar pueden interferir con el material genético de las bacterias aquí utilizadas y finalmente llevar a cabo su actividad antibiótica.

Lo antes mencionado justifica el empleo del tianguis en la medicina tradicional, ya que al presentar compuestos con actividad antimicrobiana lo hace una planta

adecuada para combatir diferentes procesos infecciosos, aunque es conveniente aclarar que, como se mencionó al principio, las cumarinas pueden ser tóxicas.

CONCLUSIONES

1. *A. caracasana* presenta actividad antimicrobiana
2. El compuesto responsable de la actividad antimicrobiana es la 7-metoxi-cumarina
3. Los valores de CMI fluctuaron entre 0.5 y 0.75 mg/ml y los de CBM fueron mayores a 1.0 mg/ml para las bacterias sensibles a la 7-metoxi-cumarina.
- 4.- Existen otros compuestos presentes en *A. caracasana* con polaridad muy semejante a la 7-metoxi-cumarina que seguramente también presentan actividad antimicrobiana.

RECOMENDACIONES

1. Sería adecuado que en estudios posteriores se determinara el modo de acción de la 7-metoxi-cumarina
2. Aislar, determinar la estructura química y la actividad molecular de los compuestos de polaridad similar a la 7-metoxi.cumarina

APENDICE 1

CUANTIFICACION DE SOLIDOS SOLUBLES (González y Peñalosa, 1981).

Esta técnica se utilizó para cuantificar sólidos en solución o en suspensión en agua, la metodología es la siguiente:

- a) Pesar en la balanza analítica determinada cantidad de muestra (en este caso 10 g de la infusión o de cocimiento).
- b) Secar a 100-110 °C en una estufa de vacío durante 24 horas. La estufa de vacío que se utilizó fue de la marca Lab-Line DUO-VAC. Modelo N° 5610 con control de termostato y se trabajó a un vacío de 10 pulg. Hg.
- c) Esperar a que se enfríe. Pesar en balanza analítica. La balanza analítica que se utilizó fue una Mettler, Modelo H10.
- d) Colocar la muestra nuevamente en la estufa a 100 °C y dejarla otras 10 horas.
- e) Enfriar a temperatura ambiente y pesar nuevamente.

Cuando sea necesario, repetir toda la operación hasta que el peso se mantenga constante.

Los sólidos se calcularon por diferencia entre el peso de la muestra con o sin agua.

APENDICE 2

METODO DE DIFUSION EN AGAR O DE KIRBY-BAUER

(Barry y Thornsberry, 1987; Vanden Berghe y Vlietnick, 1991 citados en Avila, 1996).

Este método se utilizó para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los preparados herbales y las fracciones producto de las separaciones cromatográficas, la metodología fue la siguiente:

MEDIO. Se utilizó como medio de cultivo estándar el agar Müeller-Hinton (Bioxon 110-1), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor dilución del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

INOCULO. Con un asa de siembra tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante al de los microorganismos a ensayar (*Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, etc.). Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müeller Hinton (Bioxon 260), se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa. Incubar el tubo de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 18 a 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml.

El estándar 0.5 de McFarland se prepara añadiendo 0.5 ml de sulfato de bario a 99.5 ml de H₂SO₄ 0.36 N (Koneman, 1989). La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se puede efectuar observándolos

contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o en su defecto con un espectrofotómetro (Spectronic 21 Milton Roy) a 660 nm.

Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina isotónica (0.8% NaCl) hasta igualarlas. Una vez logrado ésto, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlos se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa de agar de Müeller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente; es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, la placa de Müeller-Hinton está lista para la aplicación de las muestras a las que se les evaluará su actividad antibacteriana.

APLICACION DE SUSTANCIAS. Para este caso, se utilizaron pozos realizados sobre el agar con un sacabocado con un diámetro de 5 mm y sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel whatman del N° 5 (ambos se utilizaron durante los bioensayos preliminares; y para evaluar biológicamente las fracciones separadas mediante cromatografía). En todos los casos se hicieron las diluciones necesarias para que los cilindros y los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto.

Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los pozos o los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril; los pozos deben hacerse por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa. Dentro de cada pozo se coloca la concentración de cada extracto a evaluar.

PREPARACION DE MUESTRAS. Para el bioensayo preliminar el vehículo fue el solvente utilizado para cada extracto, excepto en los extractos de hexanos y cloroformo en los cuales se utilizó aceite de oliva. En cuanto a la evaluación de las fracciones, los sensidiscos se impregnaron con las soluciones valoradas de la muestra hasta llegar a la concentración deseada de sustancia por disco; en este caso se utilizaron solventes como el metanol, acetona y acetato de etilo para solubilizar los compuestos, para posteriormente impregnar los discos dejando evaporar el solvente durante 12 horas.

CONTROLES NEGATIVOS. Se utilizaron discos impregnados con metanol, acetona y acetato de etilo, aceite de oliva estéril cuando se evalúen los extractos de hexanos, cloroformo, los discos a los que se les agregó solvente se dejaron evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

CONTROL POSITIVO. Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales utilizando discos con Kanamicina (30 µg).

INCUBACION. Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocaron en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35 °C, sin mayor tensión de CO₂. Es preciso evitar presión de CO₂ debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida de agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a aumentar falsamente la zona de inhibición. Asimismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición. Se incuban siempre placas con discos sin sustancias a evaluar como control (control negativo).

INTERPRETACION DE RESULTADOS. Las zonas de inhibición se midieron con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hizo por triplicado y se reportaron los valores promedio.

APENDICE 3

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) Y DE LA CONCENTRACION BACTERICIDA MEDIA (CBM).

METODO MODIFICADO DE MACRODILUCION EN AGAR (Jones, *et al.*, 1987, citado en Avila, 1996).

5. PREPARACION DE REACTIVOS Y DILUCIONES.

La solución antimicrobiana de trabajo se prepara diluyendo la fracción en agar de Müeller-Hinton a la mayor concentración final deseada. La prueba se realiza en cajas de petri. Las concentraciones que se utilizaron fueron 0.075, 0.125, 0.250, .05, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/ml. En cada caja se colocaron 2 ml de agar con la concentración del extracto correspondiente. Cada ensayo se realizó por triplicado. También se manejó un control positivo y uno negativo como se indicó anteriormente.

b) INOCULACION E INCUBACION.

Se prepara un inóculo que contenga 10^5 UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml) agregar a cada caja 0.1 ml de este inóculo. Incubar las cajas a 35 °C durante 16 a 20 horas. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO₂ a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo.

c) INTERPRETACION DE RESULTADOS

La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se considera evidencia de que la droga ha sido incapaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

d) DETERMINACION DE LA CONCENTRACION BACTERICIDA MEDIA (Finegold y Jo Baron, 1989).

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un organismo se realiza la prueba de actividad bactericida que emplea el mismo sistema de dilución en caldo. Cuando la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento inmediatamente después de ser sembrado, la cual se inocula en una placa de agar de Müeller-Hinton para determinar el número real de unidades formadoras de colonia (UFC) del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la inoculación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación del factor de dilución.

Luego que se ha determinado la CMI se siembra una cantidad conocida del inóculo (usualmente 0.1 ml) tomado de cada uno de los tubos de caldo que no presentan turbidez luego de la incubación, en placas de agar Müeller-Hinton. El número de colonias que se desarrolla en estos subcultivos luego de incubar durante 18 horas se compara con el número de UFC/ml del cultivo original. En aquellos tubos que no presenten turbidez, los microorganismos permanecerán viables o bien, habrán sido destruidos por el agente microbiano. Debido a que incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0.1% del inóculo original, se denomina Concentración Bactericida media (CBM).

APENDICE 4

MICROTECNICA DE DILUCION EN CALDO. (Koneman, 1985).

La microtécnica de dilución tiene el mismo principio que el método de dilución en caldo, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica. Las placas que se utilizarán son de 96 concavidades.

La microplaca se prepara colocando 50 μ l de caldo Müeller-Hinton (Bioxon 260) con la concentración del extracto a probar en las concavidades apropiadas. Se deja 24 horas para que se evapore el solvente en el que se disolvió el extracto.

Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 ml de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) y se incuba a 35°C durante 18 a 24 horas (produciendo una concentración bacteriana de aproximadamente 10^8 organismos) y se diluyen en solución salina (0.8%) para obtener una concentración aproximada de 10^5 organismos/ml. En cada una de las 96 concavidades se colocan 50 μ l de esta suspensión diluida.

Una vez cargada la placa con la suspensión bacteriana, se cubre con su tapa para evitar el desecamiento durante la incubación. Todas las placas se incuban a 35°C durante 18 a 24 horas.

Como control negativo se utilizó el solvente del extracto; y como control positivo se empleó Lincomicina (30 mg/ml).

Después del tiempo de incubación se añade a cada concavidad 50 μ l de una solución al 0.8% de sal de tetrazolio oxidada. La placa se incuba otros 30 minutos. En las concavidades donde se desarrolla el organismo, el colorante es reducido a

formazán, de color rojo visible, produciéndose un botón rojo en el fondo de la concavidad. Donde no hay desarrollo, la solución permanece clara.

APENDICE 5

OBTENCION DE LOS EXTRACTOS HERBALES.

Para la obtención de los extractos herbales se colocaron 7 Kg de la planta en un recipiente de vidrio con 50 litros de alcohol etílico, se dejó a temperatura ambiente durante 25 días; posteriormente se destiló el etanol para concentrar a un volumen de un litro. Posteriormente se vació el extracto concentrado en charolas de vidrio para llevar a sequedad a temperatura ambiente. Se lavaron con 2.4 litros aproximadamente de los siguientes solventes hexanos, cloroformo, acetato de etilo, acetona, metanol y finalmente agua. Una vez obtenido cada uno de los extractos, se destiló el exceso de solvente, hasta llegar a medio litro, lo cual se colocó en charolas de vidrio para llevar a sequedad., cada extracto se colocó en frascos de vidrio y se probó en cada uno de los diferentes tipos de microorganismos.

AISLAMIENTO

Para separar los compuestos activos, se procedió a determinar la mezcla de solventes (fase móvil) y el soporte (fase estacionaria) para obtener la mejor separación en cromatografía de placa fina y así poder extrapolar estos resultados en el montaje de la cromatografía de columna. Una vez determinado el sistema cromatográfico se procedió a la separación de fracciones. Para la separación por placa fina se utilizaron cromatofolios de gel sílice Merck (Kieselgel 60-5553); para las cromatografías en columna se utilizó sílica gel de malla 70-230 (Sigma 5-2509).

ELUCIDACION DE ESTRUCTURAS

La elucidación de estructuras del compuesto puro se llevó a cabo mediante determinación de espectrometría en el ultravioleta, infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de protones y ^{13}C . El espectro ultravioleta se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda II; el solvente que se usó fue metanol grado HPLC (Aldrich 27, 047-4). Los espectros de RMN^1H y RMN^{13}C se obtuvieron en un Varían Géminis 200^a.

El espectro de masas se determinó en un espectrómetro de masas Finningan Mat GCQ con trampa de iones. La muestra se analizó por introducción directa y con ionización de impacto electrónico.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- **Aguilar**, A., Camacho, J. R, Chino, S., Jacquez, P. y López, M. E. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS. México.
- 2.- **Aguilar**, A., Camacho, J. R, Chino, S., Jacquez, P. y López, M. E. (1994). Plantas Medicinales del Herbario IMSS. IMSS. México.
- 3.- **Argueta**, A. y Zolla, C. (1994). Nueva Bibliografía de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México. 450 pp.
- 4.- **Argueta**, V. A. y Cano, A. J. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México. 1785 pp.
- 5.- **Atlas**, R. M. and Bartha, R. (1981). Microbial Ecology Fundamentals and Applications. Addison-Wesley Pub. Co. England. pp. 270-272.
- 6.- **Avila** A., J. G. (1996). Tesis: Actividad Anti-*Vibrio cholerae* de Dos Plantas Utilizadas en la Medicina Tradicional Purepecha. UNAM. México.
- 7.- **Bertran**, G. K. (1991). Farmacología Básica y Clínica. Ed. El Manual Moderno, México.
- 8.- **Betina**, V. 1984. Mycotoxins. Production, Isolation, Separation and Purification. Edl. Elsevier Science Publishers B.V. Holanda. 528 pp.
- 9.- **Bieber**, L. W., Da Silva, F. A., Correa, L. R., Andrade, Ch. A., Carneiro, S., De Souza, I., De Mello, J. & Jurgen, V. H. . (1986). Anticancer and Antimicrobial Glycosides from *Bahiensis*. Pytochemistry. 25(5): 1077-1081.

- 10.- Bowman, W. C. (1985).** Farmacología. Bases Bioquímicas y Patología. 2º ed. Ed. Interamericana. México.
- 11.- Boyd, M. R. (1996).** The Position of Intellectual Property Rights in Drug Discovery and Developments from Natural Products. *Journal of Ethnopharmacology* 51: 17-27.
- 12.- Borris, R. P. (1996).** Natural Products Research: Perspectives from a Major Pharmaceutical Company. *Journal of Ethnopharmacology*. 51: 29-38.
- 13.- Brantner, A., Males, Z., Pepeljnjak, S. & Antolic, A. . (1996).** Antimicrobial Activity of *Paliurus spina-christi* Mill. *Journal of Ethnopharmacology* 52: 119-122.
- 14.- Brodey, C. (1980).** Sistema Digestivo. Ed. Limusa. México. pp 60-62.
- 15.- Bruneton, J. (1991).** Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Ed. Acribia. España. 594 pp.
- 16.- Castiglioni, A. (1941).** La Medicina de los Pueblos del Extremo Oriente. En: Historia de la Medicina. Editado por Castiglioni, A. Salvat Editores. España. pp 97-105.
- 17.- Castro, R. A. (1988).** Estudio Comparativo del Conocimiento sobre Plantas Medicinales Utilizadas por dos Grupos Etnicos del Municipio de Pahuatlan, Puebla. Tesis. ENEP. Iztacala. UNAM. México.
- 18.- Cichewicz, R. H. & Thorpe, P. A. (1996).** The Antimicrobial Properties of Chile peppers (*Capsicum* species) and their Uses in Mayan Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 52: 61-70.
- 19.- Davis, B. D. y Dulbecco, R. (1984).** Tratado de Microbiología. 3º ed. Ed. Davis B. D. y Dulbecco, R. Salvat Editores. España. 1097 pp.

- 20.- De la Garza, H.** (1981). Tratamiento de las Enfermedades con el Naturismo. Editores Mexicanos Unidos. Colección Naturismo. Vida Sana. México pp.229.
- 21.- Desmarchelier, C., Mongelli, E., Coussio, J. & Ciccía, G..** (1996). Studies on the Cytotoxicity, Antimicrobial and DNA-Binding Activities of Plant Used by the Ese'ejas. Journal of Ethnopharmacology. 50: 91-96.
- 22.- Desmarchelier, C., Gurni., A., Ciccía, G. & Giuliétti, A. M.** (1996). Ritual and Medicinal Plants of the Ese'ejas of Amazonian Rainforest. (Madre de Dios, Perú). Journal of Ethnopharmacology. 52: 45-51.
- 23.- Fernández, M. A., García, M. D. & Sáenz, M. T.** (1996). Antibacterial Activity of the Phenolic Acids Fractions of *Scrophularia frutescens* and *Crophularia sambucifolia*. Journal of Ethnopharmacology. 53: 11-14.
- 24.- Fleurentin, J. y Pelt, J.** (1981). Las Plantas Medicinales. Mundo Científico. 10(105): 926-934.
- 25.- Fritz, E.** (1963). Tratado de Farmacología. 9º ed. Ed. Aguilar. España. pp 542-565.
- 26.- Gallardo, V. C.** (1985). Aspectos Etnobotánicos y Bacteriológicos en la Medicina Tradicional en los Altos de Chiapas. Tesis. ENEP. Iztacala. UNAM. México.
- 27.- Galindo, M. Y.** (1982). Estudio Farmacológico de algunas Plantas Medicinales Reportadas Popularmente por la Población Mexicana para el Tratamiento de Padecimientos Cardiovasculares. Tesis. ENEP. Iztacala. UNAM. México.
- 28.- Ganguly, B. And Bagchi, P.** 1956. Studies on the Ultraviolet Absorption Spectra of Coumarins and Chromones. Part. I. J. Org. Chem. 21: 1415-1419
- Ganong, A. (1965). Manual de Fisiología Médica. Ed. El Manual Moderno. México. pp 384-387.

- 29.- González, M. S. y Peñalosa, C. I. (1981) Manual de Biomoléculas. ENEP. Iztacala. UNAM. México.**
- 30.- Góren, N. & Jakupovic, J. (1990). Sesquiterpene Lactones with Antibacterial Activity from *Tanacetum argyrophyllum* var. *argyrophyllum*. Phytochemistry. 29(5): 1467-1469.**
- 31.- Goren, N., Jakupovic, J. & Topal, S.. (1992). Sesquiterpene Lactones with Antibacterial Activity from *Tanacetum jensum* subesp. *sivasicum*. Phytochemistry. 30 (1): 101-104.**
- 32.- Harborne, J. B. (1973). Phytochemical Methods. Ed. Chapman and Hall. USA.**
- 33.- Harborne, J. B. & Dey, P. M. (1989). Methods in Plant Biochemistry. Vol. I. Plant Phenolics. Ed. Academic Press. USA.**
- 34.- Harborne, J. B. (1994). The Flanonoids Advances in Research Since. 1986. Ed. Chapman & Hall. USA.**
- 35.- Hemingway, W. R. (1989). Chemistry and Significance of Condensed Tannins. Plenum Press. USA.**
- 36.- Hemingway, W. R. (1992). Plant Polyphenols. Plenum Press. USA.**
- 37.- Hess, S. C., Brum, R. L., Honda, N. K., Cruz, A. B., Moretto, E., Cruz, R. B., Messana, I., Ferrari, F., Cechinel, F. V. & Yunes, R. A. (1995). Antibacterial activity and Phytochemical Analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). Journal of Ethnopharmacology. 47: 97-100.**
- 38.- INEGI. (1995). Estadísticas de Mortalidad. 1991-1994.**

- 39.- King, S. R., Carlson, T. J. & Moran, K. (1996).** Biological Diversity, Indigenous Knowledge, Drug Discovery and Intellectual Property Rights: Creating Reciprocity and Maintaining Relationships. *Journal of Ethnopharmacology*. 51: 45-57.
- 40.- Khan, K. A. & Shoeb, A. (1984).** Two Antibacterial Biphenyls from *Rhynchosia suaveolens*. *Phytochemistry*. 23(4): 765-766.
- 41.- Katzung, B. G. (1984).** Farmacología Básica y Clínica. Ed. El Manual Moderno. México. . 866 pp.
- 42.- Kemp, W. (1991).** Organic Spectroscopy. 3^a ed. Ed. MacMillan. London.
- 43.- Koneman, W. E: (1985).** Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana. México. Pp. 380-402.
- 44.- Konishy, K. (1987).** Tannic Acid in Membranes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 35:1169.
- 45.- Lorenz, D. M. (1987)** Diagnostico Médico. Ed. Acribia. España. pp 315-331.
- 46.- Lozoya, L. X., Velázquez, D. G. (1988).** La Medicina Tradicional en México. Ed. IMSS. México.
- 47.- Martínez, M. J., Betancourt, J. Alonso-González, N. & Jauregui, A. (1996).** Screening of some Cuban Medicinal Plants for Antimicrobial Activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 52: 171-174.
- 48.- Mata, P. S. (1983).** Estudio Etnobotánico de las Plantas Medicinales entre los Zoque-Popoluca de Piedra Labrada, Veracruz. Tesis. ENEP. Iztacala. UNAM. México.
- 49.- McHale, D., Khopkar, P., Sheridan, J. 1987.** Coumarin glycosides from *Citrus flavedo*. *Phytochemistry*. 26 (9): 2547-2549.

- 50.- Meyer, J. J. M. & Afolayan, A. J. (1995).** Antibacterial activity of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 47: 109-111.
- 51.- Meyer, J. J. M. & Dilika, F. (1996).** Antibacterial activity of *Helichrysum pedunculatum* used in Circumcision Rites. *Journal of Ethnopharmacology* 53: 51-54.
- 52.- Mistcher, L. A., Gollapudi, S. R., Oburn, D. S. & Drake, S. (1985).** Antimicrobial Agents From Higher Plants: Two Dimethylbenziso chromans from *Karwinskia humboldtiana*. *Phytochemistry*. 24(8): 1681-1683.
- 53.- Mistcher, L. A., Oburn, D. S. & Drake, S. (1985).** Antimicrobial Agents From Higher Plants Activity and Structural Revision of Flemiflavanone-D from *Flemingia stricta*. *Phytochemistry*. 24(12): 2885-2887.
- 54.- Mitscher, L. A. (1988).** Antimicrobial Pterocarpanes of nigerian *Erythrinus mildbraedii*. *Phytochemistry*. 27 (11): 3449-3452.
- 55.- Moellering, R. C. (1990).** Principios de Terapia Infecciosa. En: Enfermedades Infecciosas. Editado por Mandell, G. L. *et al.* Ed. Médica Panamericana. México. pp 214-221.
- 56.- Moerman, D. E. (1996).** An Analysis of the Food Plants and Drug Plants of Native North America. *Journal of Ethnopharmacology*. 52: 1-22.
- 57.- Mori, A., Nishino, C., Enoki, M. & Tawata, S. (1987).** Antibacterial Activity and Mode of Action of Plant Flavonoids Against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 26 (8): 2231-2234.
- 58.- Murray, R.D. 1978.** Naturally occurring plant coumarins. *Fortschritte der Chemie Organischer Natursstoffe*. 35: 199-300.

- 59.- Olagiwola, A. y Heywood, U. (1991).** Conservation of Medicinal Plants. Ed. Cambridge University Press. USA. 362 pp.
- 60.- Olano, I., Paz, E. A., Cerderías, M. P., Fernández, J., Ferreira, F., Moyna, M., Vázquez, A., Vero, S. & Bassagoda, M. J. (1996).** Screening of Uruguayan Medicinal Plants for Antimicrobial Activity. Part II. Journal of Ethnopharmacology. 53: 111-115.
- 61.- Old, R. W. (1989).** Principles of Gene Manipulation. Blackwell Scientific Publication. USA.
- 62.- Paz, E. A., Cerderías, M. P. Fernández, J., Ferreira, F., Moyna, P., Soubes, M., Vázquez, A., Vero, S. & Zunino, L. (1995).** Screening of Uruguayan Medicinal Plants for Antimicrobial Activity. Journal of Ethnopharmacology. 45: 67-70.
- 63.- Pretsch, E. (1980).** Tablas para la Elucidación Estructural de Compuestos Orgánicos por Métodos Espectroscópicos. Ed. Alambra. España.
- 64.- Pouchert, C. J. & Behnke, J. (1993)** The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra. Vol. 2. Aldrich Chemical Co. USA.
- 65.- Razdan, T.K., Qadri, B., Harkar, S., and Waight, E.S. 1987.** Chromones and coumarins from *Skimmia laureola*. Phytochemistry. 26 (7): 2063-2069.
- 66.- Ritch-Kro, E. M., Thomas, S., Turner, N. J. & Towers, G. H. N. (1996).** Carrier Herbal Medicine: Traditional and Contemporary Plant Use. Journal of Ethnopharmacology. 52: 85-94.
- 67.- Ritch-Kro, E. M., Turner, N. J., & Towers, G. H. N. (1996).** Carrier Herbal Medicine: an Evaluation of the Antimicrobial and Anticancer Activity in some Frequently used Remedies. Journal of Ethnopharmacology. 52: 151-156.
- 68.- Roberts, F. (1980).** Nuevos Tratamientos con Plantas de los Padecimientos Digestivos. Ed. EDAF. España. pp. 189.

- 69.- Romo de Vivar, A. (1985).** Productos Naturales de la Flora Mexicana. Ed. Limusa. México.
- 70.- Row, J. D. (1988).** Bioquímica. Vol. II. Ed. Interamericana. México.
- 71.- Rzedowski, G. C. (1979).** La Flora Fanerogámica del Valle de México. Editado por Rzedowski J. Vol I. Compañía Editora Continental. México. pp. 144-147.
- 72.- Rzedowski, G. C. (1979).** La Flora Fanerogámica del Valle de México. Editado por Rzedowski J. Vol II. ENCB, IPN. México. pp 586-589.
- 73.- Salie, F., Eagles, P. F. & Leng, H. M. J. (1996).** Preliminary Antimicrobial Screening of Four South African Asteraceae Species. *Journal of Ethnopharmacology*. 52: 27-33.
- 74.- Schavenberg, P. y Paris, F. (1980).** Guía de las Plantas Medicinales. Ed. Omega. España. pp. 420.
- 75.- Silva, O. et al. (1996).** Antimicrobial Activity of Guinea-Bissau Traditional Remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. 50: 55-59.
- 76.- Tascon, R. (1997).** Contribución al estudio de la Flora de San Nicolás Totoloapan. UNAM. México.
- 77.- Thomson, D. M. (1980).** Guía Práctica Ilustrada de las Plantas Medicinales. Ed. Blume. España. pp 220.
- 78.- Trease, G. E. y Evans, W. C. (1993).** Tratado de Farmacognosia. 15° ed. Ed. Interamericana. México. 845 pp.

- 79.- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyasaky, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T. & Linuma, M. (1996).** Comparative Study on the Antibacterial Activity of Phytochemical Flavanones Against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 50 : 27-34.
- 80.- Urzúa, A., Torres, R., Muñoz, M., & Palacios, Y. (1995).** Comparative Antimicrobial Study of the Resinous Exudates of Some Chilean *Haplopappus* (Asteraceae) *Journal of Ethnopharmacology*. 45: 71-74.
- 81.- Verástegui, M. A., Sánchez, C. A., Heredia, N. L. & García-Alvarado, J. S. (1996).** Antimicrobial Activity of Extracts of Three Major Plants from the Chihuahuan Desert. *Journal of Ethnopharmacology*. 52 : 173-177.
- 82.- Vijaya, K., Anathan, S. & Nalini, R. (1995).** Antibacterial Effect of Theaflavin Polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella spp.* -- A Cell Culture Study. *Journal of Ethnopharmacology* 49: 115-118.
- 83.- Viesca, T. C. (1976).** Estudios Sobre Etnobotánica y Antropología Médica. Ed. Inst. Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales. A. C. México. pp 218.
- 84.- Waage, S. K. & Hedini, P. (1984).** Biologically-Active Flavonoids from *Gossypium arboreum*. *Phytochemistry*. 23(11): 2509-2513.
- 85.- Waage, S. K., Hedini, P. & Grimley, E. (1984).** A Biologically-Active Procyanidin From *Machaerium floribundum*. *Phytochemistry*. 23(12): 2785-2787.
- 86.- Wagner, H. Y Farnsworth, N. R. (1990).** Medicinal Plants: Policies and Priorities. Economic and Medicinal Plant Research. Academic Press. London. Vol 4. pp. 3-21.
- 87.- Wang, Y., Hamburger, M., Guehot, J., & Hostetmann, K. (1989).** Antimicrobial Flavonoids from *Psidia trinervia* and their Methylated and Acetylated Derivatives. *Phytochemistry*. 28(9): 2323-2327.

- 88.- Wijesekera, R. O. B. (1991).** Plant-derived Medicines and their Role in Global Health in the Medicinal Plant Industry. Edited by Wijesekera ROB. USA. pp 1-17.
- 89.- Willets, N. and Skurray, P. (1980).** The Conjugation System of F-like Plasmids. Annual Review of Genetics, Academic Press. 14:14-41.
- 90.- Zavala, M., Pérez, S., Pérez, C., Vargas, R., Pérez, R. (1988).** Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Commelina coelestis* and *Alternanthera repens*. Journal of Ethnopharmacology. 61: 41-47