



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD  
ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE  
*Physalis pruinosa*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G A  
P R E S E N T A

GUADALUPE BEATRIZ FIALLEGA GUTIERREZ



DIRECTORA: M EN C EMMA MALDONADO JIMENEZ

CODIRECTOR:

M EN C CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS

2004  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ENSEÑAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de Physalis pruinosa"

realizado por p. de B. GUADALUPE BEATRIZ FIALLEGA GUTIERREZ

con número de cuenta 8137367-9 , quien cubrió los créditos de la carrera de: BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

**Atentamente**

Director de Tesis Propietario	M. en C. EMMA MALDONADO JIMENEZ	
Co-Director Propietario	M. en C. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS	
Propietario	BIOL. ALFONSO JOSE VILCHIS PELUYERA	
Suplente	Dra. PATRICIA GUEVARA FEYER	
Suplente	M. en IBB. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY	

**Consejo Departamental de Biología**

M. en C. JUAN MANUEL RODRIGUEZ CHAVEZ

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

La parte química de esta investigación se realizó en el laboratorio  
2-7 del Instituto de Química, UNAM

Los ensayos de actividad antibacteriana se llevaron a cabo en el  
laboratorio del Departamento de Salud Pública de la División de  
Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina, UNAM

Esta investigación fue apoyada por el Conacyt, a través del  
proyecto 34993-N

Mi gratitud de manera especial a los M. en C. Emma Maldonado Jiménez y Carlos Alberto Eslava Campos, por su valiosa asesoría en la realización de esta tesis.

A los Sinodales que le dieron su atención al texto:  
Bíol. Alfonso José Vilchis Peluyera  
Dra. Patricia Guevara Fefer  
I. en IBB. Claudia Andrea Segal Kischinevsky.

A la M. en C. Ana Lidia Pérez Castorena  
por el apoyo que me brindó .

A la Q. Cristina Villasana Jenner  
por su estímulo y consejos que han influido siempre en mí.

Al Dr. Francisco Quiñones Falconi, por su comprensión  
y paciencia en todo este proceso.

Dedicada a mi familia, especialmente a mis abuelos:  
Guadalupe y Javier por su cariño, reconocimiento y gratitud  
por su apoyo.

A mi papá Manuel por su ayuda invaluable.

A mi mamá Carmen, hermanas: María del Carmen,  
Patricia, Araceli, Claudia y Rocío, por resolver mis dudas.

A mi sobrino Juan M. por el tiempo que me regaló.

## CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	ANTECEDENTES.....	3
2.1.	El Género <i>Physalis</i> .....	3
2.2.	Taxonomía y química de <i>Physalis pruinosa</i> .....	6
2.3.	Características de las bacterias.....	8
2.4.	Bacterias de las vías respiratorias.....	9
2.5.	El Género <i>Staphylococcus</i> .....	11
2.6.	Resistencia de <i>Staphylococcus aureus</i> a antibióticos.....	12
3.	OBJETIVO.....	16
4.	HIPOTESIS.....	16
5.	METODOLOGÍA.....	16
5.1.	Material vegetal.....	16
5.2.	Obtención de extractos.....	16
5.3.	Pruebas de sensibilidad.....	19
6.	RESULTADOS.....	21
7.	DISCUSION.....	29
8.	CONCLUSIONES.....	35
9.	BIBLIOGRAFIA.....	36

## 1. INTRODUCCION

Una de las preocupaciones básicas del hombre ha sido la de disponer de medios para aliviar sus enfermedades y preservar su salud. La búsqueda de dichos medios lo llevó a explorar la naturaleza, principalmente las plantas, y a conocer los efectos curativos y tóxicos de muchas de ellas. Estos conocimientos le han permitido beneficiarse de dichos recursos desde tiempos ancestrales. Aún hoy, alrededor del 75% de la población mundial sigue dependiendo de plantas, extractos de plantas y otros recursos de la medicina tradicional para dichos fines. Actualmente se estima que existen unos 121 fármacos clínicamente útiles en todo el mundo que son derivados de plantas superiores. Entre estos fármacos están los agentes anticancerígenos vinblastina y vincristina. También se extraen de plantas la morfina, codeína, quinina, atropina y digitalina, que se emplean con muy diversos fines terapéuticos.<sup>(1)</sup> Otro tipo de organismos que producen sustancias de importancia en medicina son los hongos. Tal es el caso de *Penicillium notatum* y *Penicillium chrysogenum* que elaboran un importante tipo de antibióticos: las penicilinas, que son el prototipo de los antimicrobianos y sin duda los fármacos más utilizados en la medicina. Se usan principalmente para tratar problemas infecciosos como faringoamigdalitis estreptocócica, tétanos, difteria, erisipela, bronconeumonía por *Streptococcus pneumoniae* o *Streptococcus pyogenes*, infecciones por anaerobios y por *Streptococcus* del grupo B y C con  $\beta$ -hemólisis, gonorrea por cepas no productoras de  $\beta$ -lactamasas, meningitis por *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*, entre otros. Aunque en la mayoría de los casos las penicilinas y otros antimicrobianos aún son eficientes, es importante señalar que su uso indiscriminado ha favorecido la selección de bacterias con diferentes espectros de sensibilidad e incluso un gran número de cepas resistentes<sup>(2)</sup>.

De lo anterior se desprende que la búsqueda de nuevas sustancias con propiedades antibacterianas no sólo continúa vigente, sino que día a día adquiere mayor relevancia. Paradójicamente en esta búsqueda, los científicos del siglo XXI, como los primeros hombres, se vuelven hacia la naturaleza; sólo que ahora tienen la ventaja de contar con una tecnología muy avanzada, pero sobre todo con los conocimientos científicos que la humanidad ha acumulado a lo largo del tiempo y algunos otros empíricos, que los diferentes pueblos del

mundo han preservado como parte de sus culturas. Entre estos últimos se encuentran los que se agrupan en lo que se conoce como medicina tradicional, cuya rama más importante es la herbolaria, misma que en México, es muy relevante.

En la herbolaria mexicana existen plantas para tratar un sinnúmero de padecimientos. Entre éstas se encuentran varias especies del género *Physalis*, especialmente *P. philadelphica*, cuyos frutos (tomates, tomates verdes), son empleados para el tratamiento de infecciones gastrointestinales y de las vías respiratorias altas, por lo que es probable que estas especies contengan sustancias con actividad antibacteriana. Con base en lo anterior se emprendió la búsqueda de actividad antibacteriana en diferentes extractos de *Physalis pruinosa* sobre cepas clínicas y de referencia de *Staphylococcus*. Los resultados de estos estudios se describen en este trabajo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. El Género *Physalis*

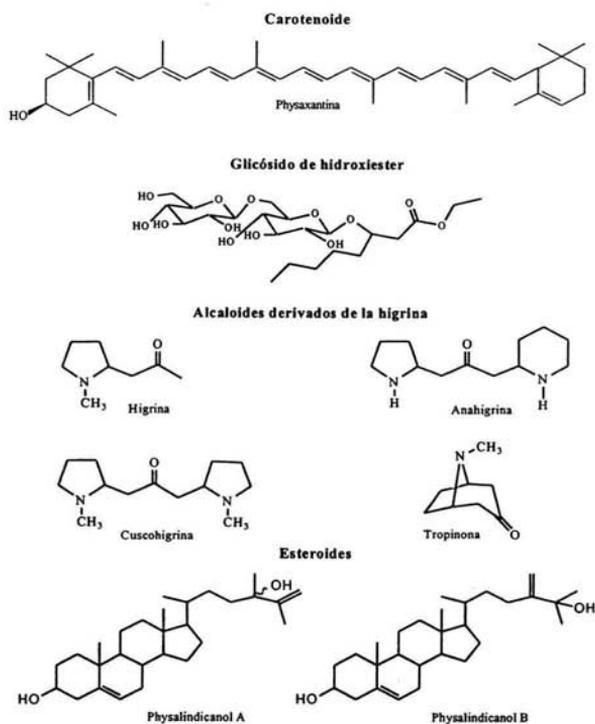
Al género *Physalis* se le reconocen actualmente cerca de 90 especies que se encuentran distribuidas principalmente a lo largo del continente americano, desde Estados Unidos hasta América del Sur y las Antillas, aunque cuenta también con algunas especies en el Viejo Mundo. México es el país con mayor número de especies ya que cuenta con alrededor de 70 y la mayoría son endémicas.<sup>(3)</sup>

Las especies del género *Physalis* pueden ser herbáceas, sufrútices y arbustivas. La talla de las plantas varía desde escasos 20 cm hasta 1.5 ó 2 m de alto, aunque la mayoría de las especies presentan tallas de entre 40 y 90 cm. Las flores en la mayor parte de las especies son solitarias, las hojas son alternadas, por lo general se encuentran solitarias, pero en algunas especies pueden presentarse geminadas (en pares), las cuales son iguales en forma y desiguales en dimensiones, generalmente la pequeña es 1/3–1/2 menor que la mayor. Producen un fruto que es una baya carnosa que varía de color desde el verde-amarillo hasta el anaranjado o púrpura<sup>(4)</sup> y que está encerrado en un cáliz persistente, con forma de vejiga, conocida como cáscara. Estos frutos son comestibles en 14 de sus especies pero sólo 4 de ellas (*P. philadelphica*, *P. peruviana*, *P. grisea* y *P. alkekengi*) son cultivados, el resto se utiliza a partir de poblaciones silvestres.<sup>(3)</sup>

En el caso de *Physalis philadelphica*, su fruto (tomate verde) es de gran importancia económica en México. Además, sus frutos y hojas son considerados útiles en el tratamiento de dolores de cabeza y estómago. El fruto untado con sal es utilizado para curar las paperas y su jugo para tratar infecciones de garganta. La infusión de los cálices se usa contra la diabetes. La raíz actúa como antidiarreico y alivia los cólicos por indigestión.<sup>(6)</sup> Propiedades medicinales muy similares son atribuidas a otras especies del mismo género como *Physalis aequata* Jacq, *P. chenopodiifolia* Lam., *P. laevigata* Mart. y Galeoti, *P. pubescens* L., *P. villosa* Miller, *P. gracilis* Miers, *P. schiocana* Dunal y *P. coztomatl* Moc. y Sessé.<sup>(7)</sup>

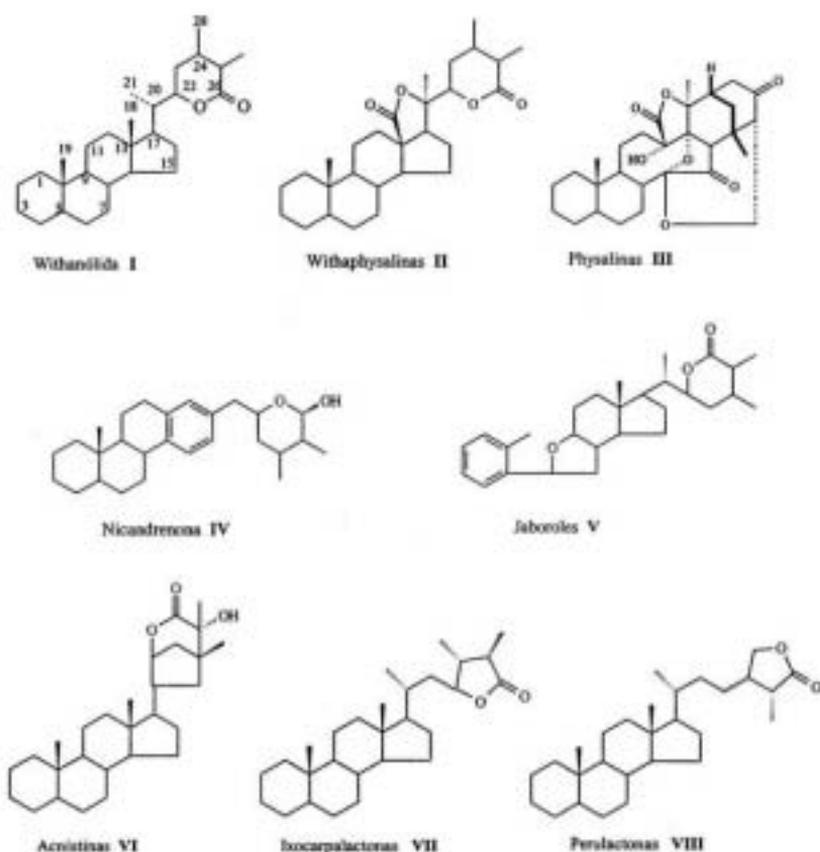
En cuanto a su composición química, en el género *Physalis* se han encontrado y caracterizado diferentes tipos de metabolitos secundarios entre los que se cuentan carotenoides,<sup>(8)</sup> glicósidos de hidroxiésteres,<sup>(9)</sup> alcaloides derivados de la higrina,<sup>(10)</sup> esteroides como los physalindicanos A y B<sup>(11)</sup> que se proponen como precursores de las lactonas esteroidales conocidas como withaesteroides, mismas que son los metabolitos secundarios más característicos y abundantes en el género (Fig. 1).

*Physalis* se encuentra entre los doce géneros de solanáceas que producen withaesteroides y comparte con *Withania* el ser los géneros de los que se han aislado tanto el mayor número de estos compuestos como la mayor diversidad de grupos estructurales.



**Figura 1. Diferentes tipos de compuestos aislados del género *Physalis***

Los withaesteroides son lactonas esteroidales de 28 átomos de carbono, cuyo esqueleto básico es el del ergostano y que generalmente presentan un grupo carbonilo en C-1. Los withaesteroides se han dividido en ocho grupos (Fig. 2) de los cuales el de las withanólidas es el más abundante.<sup>(8)</sup>



**Figura 2. Estructuras básicas de los ocho grupos de withaesteroides**

Aunque la presencia de withaesteroides parecía estar restringida a la familia Solanaceae, en los últimos tiempos se les ha aislado de miembros de las familias Taccaceae,<sup>(8)</sup> Leguminosae<sup>(9)</sup> y Labiatae,<sup>(12)</sup> así como de organismos marinos (coral blando).<sup>(13)</sup>

Por otra parte, muchos de los withaesteroides se han aislado de plantas incluidas en los sistemas de medicina tradicional. Tal es el caso de la withaferina A obtenida de una planta de la India, *Withania somnifera*, cuya popularidad se compara con la del "ginseng", debido a las múltiples propiedades terapéuticas que se le atribuyen y que parecen estar justificadas por estudios científicos que han probado que la withaferina A posee actividad antiestrés, antiinflamatoria, antitumoral, antibiótica, anticonvulsiva y depresora del Sistema Nervioso Central. La actividad antimicrobiana de la withaferina A fue establecida antes de que su estructura fuera determinada. Se encontró que este compuesto es activo contra bacterias gram-positivas y no presenta actividad contra bacterias gram-negativas y hongos no filamentosos.<sup>(8)</sup>

## 2.2. Taxonomía y química de *Physalis pruinosa*

La especie *Physalis pruinosa* L. pertenece a la sección *Epeteiorhiza* y es nativa de América.<sup>(4)</sup> Se desarrolla en un intervalo altitudinal de 120-1850 msnm, en vegetación marginal, arvense, ruderal o en cañadas, también en encinares y bosques tropicales deciduos.<sup>(5)</sup>

*Physalis pruinosa* L. (1753). Es una planta herbácea anual, erecta ramificada, glutinosa, fétida, de hasta 80 cm de alto, pubescente, con tricomas simples, unos cortos y otros largos, de 1 y 2 mm, algunos glandulares. El tallo es ligeramente costillado, densamente pubescente, las hojas solitarias o geminadas, ampliamente ovadas a cordadas, el margen generalmente aserrado. Las flores se presentan solitarias, con botones florales ovoides de 3 mm de largo, sobrepasados ampliamente por los lóbulos del cáliz, la corola amarilla, campanulada. Los estambres con anteras amarillas, de 2.5-3 mm de largo y el filamento azul. El ovario tiene un estilo de 7 mm de largo. El cáliz es de color verde inicialmente, después castaño dorado. El fruto es una baya de hasta 1.5 cm de diámetro. *P. pruinosa* se localiza desde EUA hasta el sur de Argentina. En México en los estados de Baja California, Chihuahua, Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Edo. de México, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Sonora, Veracruz y Zacatecas.<sup>(5)</sup> No existe información acerca de sus usos.

La composición química de *Physalis pruinosa* fue analizada por un grupo de investigadores japoneses,<sup>(14)</sup> quienes describen el aislamiento de cuatro productos naturales (1-4) y dos

artefactos\* (5 y 6). Los compuestos physapruina A ( $4\beta,14\alpha,17\beta,20\beta$ -tetrahidroxi-1-oxo-20S,22R-witha-2,5,24-trienólida) (1) y physapruina B ( $5\alpha$ -butoxi-6 $\beta,14\alpha,17\beta,20\beta$ -tetrahidroxi-1-oxo-20S,22R-witha-2,24-dienólida) (5) fueron descritos por primera vez, en tanto que  $4\beta$ -hidroxiwithanólida E (2), withanólida E (3), withanólida U (4) y 2,3-dihidro-3-metoxi- $4\beta$ -hidroxiwithanólida (6) ya habían sido aislados de otras plantas. Los compuestos 2, 4, 5 y 6 se aislaron como acetatos debido a que en su forma natural no pudieron ser separados. Sus estructuras se muestran en la figura 3.<sup>(14)</sup>

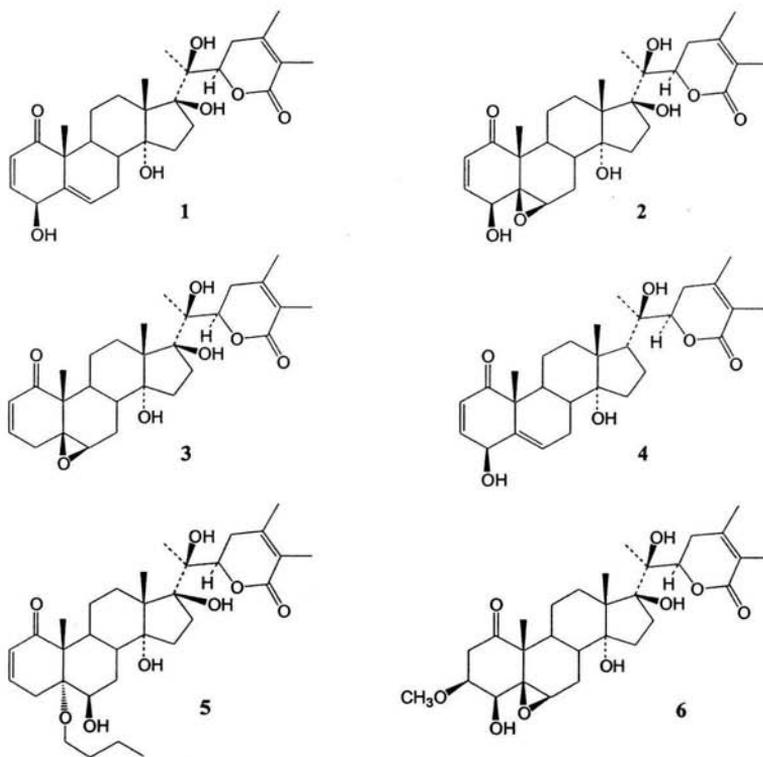


Figura 3. Withanólidas aisladas de *Physalis pruinosa*<sup>(14)</sup>

\* Se llaman artefactos a los compuestos que aunque son aislados de los extractos, en realidad no son productos naturales, sino derivados que se producen incidentalmente durante el proceso de aislamiento.

### 2.3 Características de las bacterias

Los microorganismos se dividen de acuerdo a su estructura interna en dos diferentes tipos, las células procarióticas y las más complejas, llamadas eucarióticas. Las bacterias son células procarióticas rodeadas por una membrana, que es una capa delgada y flexible compuesta por proteínas y lípidos, que regula la entrada y salida de moléculas. En la gran mayoría de las células existe una pared rígida fuera de la membrana que es característica de las células procarióticas y contiene compuestos, como el peptidoglicano, que no se encuentran en las eucarióticas. El grupo de las procariotas incluye a las Eubacterias, Archaeobacterias y Cianobacterias.<sup>(15)</sup>

La eubacterias son un grupo vasto y heterogéneo que puede ser clasificado de diferentes maneras, que pueden incluir su morfología y tinción, sus requerimientos nutricionales, de oxígeno y de temperatura y una variedad de otros factores bioquímicos.<sup>(15)</sup>

Las bacterias tienen tres formas básicas: cocos, bacilos y espiroquetas. La pared celular rígida determina la forma de una bacteria. Algunas bacterias tienen formas variables y se les designa pleomórficas. Su aspecto al microscopio es uno de los rasgos de mayor importancia utilizados en su identificación. Las bacterias oscilan en tamaño de 0.2-5  $\mu\text{m}$ ; las más pequeñas tienen más o menos el tamaño de los virus mayores (poxvirus) y son los microorganismos más pequeños capaces de existir fuera de un hospedero. Los bacilos más grandes tienen el tamaño aproximado de algunas levaduras.

La morfología de las diferentes bacterias se presenta de la siguiente manera: los cocos se presentan en racimos (*Staphylococcus*), cadenas (*Streptococcus*), pares por los extremos (*Streptococcus pneumoniae*), o pares "diplococo" (*Neisseria*); los bacilos suelen presentar extremos cuadrados (*Bacillus*), extremos redondeados (*Salmonella*), forma de palillo de tambor (*Corynebacterium*), fusiforme (*Fusobacterium*) o forma de coma (*Vibrio*); la forma de las espiroquetas puede ser en espiral extendida (*Borrelia*) o espiral apretada (*Treponema*).

La pared celular es el componente exterior común a todas las bacterias (excepto las especies de *Mycoplasma*, que están circundadas por membrana celular, sin pared). Algunas bacterias poseen prolongaciones por fuera de la pared celular, como una cápsula, flagelos y vellosidades (pilus) que son componentes menos comunes.

La pared celular se compone de una capa interna de peptidoglucano, circundada por una capa exterior que varía en espesor y composición química dependiendo del grupo bacteriano. El peptidoglucano funciona como soporte estructural y conserva la forma característica de la célula.

La estructura, la composición química y el espesor de la pared celular distinguen a las eubacterias grampositivas de las gramnegativas. La capa de peptidoglucano es mucho mayor en eubacterias grampositivas que en gramnegativas. Algunas grampositivas tienen también una capa de ácido teicoico exterior al peptidoglucano. Las gramnegativas no contienen ácido teicoico. En cambio, los microorganismos gramnegativos poseen una capa exterior compleja formada de lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos. Entre esta capa compleja exterior y la membrana citoplasmática se encuentra el espacio periplasmático, sitio que en algunas especies de eubacterias puede contener enzimas, por ejemplo,  $\beta$ -lactamasas que degradan a la penicilina y a otros fármacos  $\beta$ -lactámicos.

La pared celular tiene otras propiedades importantes: en microorganismos gramnegativos contiene endotoxina, un lipopolisacárido causante de muchos de los síntomas patológicos, como fiebre y choque, que producen estos microorganismos. Esta endotoxina es parte integral de la pared celular y sus polisacáridos y proteínas son antígenos que resultan útiles en la identificación de estos microorganismos en el laboratorio clínico.<sup>(15a)</sup>

## 2.4 Bacterias de las vías respiratorias

Dentro de la microbiota normal de las vías respiratorias existe un amplio espectro de microorganismos. La nariz alberga varias especies de estafilococos y estreptococos. En la boca, el 50% de las bacterias corresponde a *Streptococcus viridans* y en la placa dental

predomina *Streptococcus mutans* que es el causante de las caries. La garganta contiene una mezcla de *Streptococcus viridans*, especies de *Neisseria* y *Staphylococcus epidermidis*. Estos no patógenos inhiben la proliferación de los patógenos *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis* y *Staphylococcus aureus*.<sup>(15a)</sup>

Las infecciones de las vías respiratorias altas, como en la faringe, tráquea y bronquios, y de las estructuras pararespiratorias como los senos paranasales, oído medio y conjuntiva son provocadas por un grupo de bacterias como neumococos, *Haemophilus influenzae*, estafilococos y estreptococo  $\beta$ -hemolítico del grupo A. También existen patógenos que causan infecciones en las vías respiratorias bajas. Sin embargo para que se produzca una infección pulmonar los microorganismos deben alcanzar el alveolo pulmonar bien por vía hematógena, a partir de un foco séptico distante, o bien a través de las vías aéreas, por inhalación de aerosoles contaminados o aspiración de secreciones orofaríngeas. La mayoría de las neumonías se producen a través de la vía aérea.

Sin considerar a la tuberculosis, las infecciones del parénquima pulmonar son provocadas por diferentes microorganismos, algunos de los cuales no forman parte de la microbiota comensal de la vía respiratoria. La transmisión de estos microorganismos suele producirse mediante inhalación. Algunos otros microorganismos forman parte de forma estable o transitoria, de la microbiota comensal de la vía respiratoria y causan infección cuando el parénquima pulmonar es invadido por un inóculo microbiano elevado (aspiración de secreciones). En la etiología de estas infecciones influyen además la edad y la naturaleza de los factores de predisposición del paciente (intubación, enfermedad de base, inmunosupresión, etc.), como se muestra en el cuadro 1.<sup>(16)</sup>

**Cuadro 1. Principales agentes causales de infecciones pulmonares en nuestro medio\***

<b>Adquiridas en la comunidad</b>	
<i>Niños*</i>	<i>Jóvenes y Adultos*</i>
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> Virus respiratorios Neumococo	Neumococo <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Legionella pneumophyla</i> <i>Chamydia pneumoniae</i> <i>Coxiella burnetii</i> <i>Haemophilus influenzae</i> Bacilos gramnegativos aerobios
<b>Intrahospitalarias</b>	
<i>Enfermos intubados</i>	<i>Postoperados y otros</i>
Enterobacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Otros bacilos gramnegativos <i>Staphylococcus aureus</i>	Neumococo Enterobacterias Anaerobios <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Legionella</i> spp. Herpes simple**
<i>Granulopénicos</i>	VIH*
Enterobacterias <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pneumocystis carinii</i> Citomegalovirus
<b>Hongos oportunistas</b>	
<i>Aspergillus</i> <i>Candida</i>	

\* No se señalan *M. tuberculosis* ni otras micobacterias. Tampoco se mencionan los hongos patógenos primarios.

\*\* Particularmente en pacientes transplantados.<sup>(16)</sup>

## 2.5 El Género *Staphylococcus*

El género *Staphylococcus* pertenece al Orden Eubacteriales y a la familia Micrococcaceae, aunque no está filogenéticamente relacionado a ningún género de la familia.<sup>(17)</sup>

Los estafilococos son microorganismos inmóviles que no forman esporas. Su diámetro varía entre 0.7 y 1.2  $\mu$ . Los cocos de las cepas patógenas tienden a ser algo menores que los de las cepas no patógenas. Todos ellos son grampositivos. Tienen la característica de racimificarse. Producen colonias circulares de 1 a 2 mm de diámetro. La mayor parte de las cepas de estafilococos patógenos para el hombre forman colonias doradas que están rodeadas de una ancha zona de hemólisis en las placas de agar-sangre.<sup>(18)</sup>

Los *Staphylococcus* se dividen en dos grandes grupos que se distinguen por la producción de una enzima que coagula el plasma: la coagulasa. El primer grupo comprende los *Staphylococcus* coagulasa positiva representado principalmente por *Staphylococcus aureus*, común por su patogenicidad. El segundo grupo está formado por los *Staphylococcus* coagulasa negativa y es representado principalmente por *Staphylococcus epidermidis*.<sup>(19)</sup>

El ser humano es el principal reservorio de estafilococos en la naturaleza. El contagio de un hombre al otro es muy variable y éste puede ocurrir por transmisión aérea o por contacto directo. Hacia el final de los primeros 10 días de vida, el 90% de los recién nacidos son portadores de *S. aureus*. Esta cifra es del 20 al 30% durante el segundo año de vida y sólo durante el cuarto y quinto años alcanza de nuevo la cifra del 50%, que persiste entre los adultos. Algunos de éstos son portadores intermitentes (60%). No se conocen las causas de estas variaciones en el estado de portador.

En el medio intrahospitalario no siempre resulta evidente cómo se ha adquirido una estafilococcia. Parece claro que es por contagio aéreo que los estafilococos infectan las quemaduras y las heridas abiertas en los quirófanos y ocasionan los focos que pueden originar diseminaciones graves. En otras condiciones cuando no hay un traumatismo abierto, es necesario un contacto más íntimo con el germen para que se produzca una infección.

La frecuencia de la infección por estafilococos ha sido en general más alta entre los pacientes quirúrgicos y los niños recién nacidos, y las cepas aisladas han mostrado una gran tendencia a la resistencia a los antibióticos utilizados en los hospitales, de tal modo que estos organismos han pasado a ocupar durante la actual era de la quimioterapia antibacteriana, una posición de especial significado en la patogenia.<sup>(18)</sup>

## **2. 6 Resistencia de *Staphylococcus aureus* a antibióticos**

El desarrollo de antibióticos para uso clínico ha traído beneficios incuestionables para la humanidad, ya que permite tratar infecciones que anteriormente podían llegar a ser fatales; sin embargo, la quimioterapia antibacteriana también produce efectos adversos en el individuo y a

diferencia de otras quimioterapias, la antibacteriana, provoca efectos adversos fuera del paciente, ya que puede llevar a la selección de cepas resistentes del organismo causante de la infección y contra el cual se dirige la terapia, con lo que se pierde la efectividad del antibiótico.

Ocasionalmente las células individuales de una cepa bacteriana pueden adquirir resistencia a un antibiótico como resultado de una mutación o adquiriendo genes extraños de un organismo resistente. En presencia del antibiótico, esas células resistentes predominarán sobre las susceptibles, sobrevivirán y se esparcirán en el ambiente donde pueden infectar a otros individuos y complicar su terapia, al limitar las opciones de antibióticos. Con el tiempo esas poblaciones resistentes pueden predominar en ambientes localizados, tales como unidades de cuidados intensivos, hospitales, clínicas y aún en comunidades.

Por otro lado, las terapias con antibióticos afectan no sólo al patógeno blanco, sino a los comensales normales y a las bacterias colonizantes, con el resultado de que ahora se necesitan nuevos antibióticos para tratar infecciones causadas por organismos resistentes que anteriormente eran considerados de poca importancia clínica.

Algunas cepas con resistencia a antibióticos se han vuelto tan predominantes que la biología del organismo se considera alterada y el antibiótico causante del problema ya no puede ser considerado para tratar las infecciones provocadas por dicho organismo; a esto se le llama resistencia presumida. El ejemplo por excelencia de una virtualmente completa pérdida de susceptibilidad es *Staphylococcus aureus*, ya que cuando se introdujo la penicilina G en la práctica clínica ésta era muy efectiva contra dicha bacteria; sin embargo muy pronto aparecieron aislados resistentes a penicilina y a mediados de los años 50's, la mayoría de los aislados de *S. aureus* a través del mundo producían una  $\beta$ -lactamasa que inactivaba la penicilina G y de este modo le confirieron la resistencia a ésta.

En respuesta a este problema en los años 60's se crearon penicilinas semisintéticas como meticilina, oxacilina y nafcilina, que son sustratos pobres para la  $\beta$ -lactamasa y que aún hoy son la primera línea de agentes anti-*S. aureus* en todo el mundo. Sin embargo, se han

desarrollado cepas de *S. aureus* con resistencia a meticilina que son además, resistentes a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Para ellos actualmente sólo existe la terapia alternativa con vancomicina.

Desde los años 70's las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) se han extendido por todo el mundo y son un problema importante en hospitales. La prevalencia de la resistencia a meticilina entre muestras hospitalarias de *S. aureus* en Europa, varía de solamente 1-2% hasta cifras tan altas como 30-40% y recientemente, dentro de los hospitales estadounidenses han alcanzado el 35%.

Las cepas meticilina susceptibles son inhibidas por oxacilina en concentraciones de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o meticilina en 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Sin embargo, las cepas de *Staphylococcus aureus* que poseen la característica de resistencia a meticilina (MRSA) requieren de 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de oxacilina y por arriba de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de meticilina para ser inhibidas.<sup>(20)</sup>

El blanco del antibiótico meticilina en muestras sensibles de *S. aureus* es la enzima que cataliza la transpeptidación provocando la conexión del peptidoglucano en la pared celular bacterial. La inhibición de esta reacción con meticilina resulta en el cese de la formación de la pared celular, desencadenando la muerte del organismo.<sup>(21)</sup>

La prevalencia de la resistencia en aislados hospitalarios de estafilococos coagulasa-negativa, tales como el *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus haemolyticus*, es tan alta como la del *Staphylococcus aureus*. Además de ser resistentes a meticilina, los estafilococos son resistentes a todos los antibióticos  $\beta$ -lactámicos disponibles. Vancomicina es el único antibiótico para estafilococos meticilina-resistentes, por lo que actualmente los médicos tienen que confiar en esta droga cada vez más, a pesar de que si bien es cierto que ha proporcionado terapia definitiva para estafilococos meticilina-resistentes, para los que no hay alternativa, también ha recibido importantes críticas, por lo que es considerada la droga de último recurso para infecciones estafilococales.

La vancomicina pertenece al grupo de los glicopeptidos, actúa interrumpiendo la biosíntesis normal de los peptidoglicanos, pero de un modo diferente a como lo hacen los antibióticos  $\beta$ -lactámicos. Después de tres décadas de uso clínico, en 1988 apareció el primer ejemplo de resistencia adquirida en aislados clínicos de enterococos. La aparición regular de cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a ampicilina, vancomicina y a todos los aminoglucósidos, ha provocado gran alarma, ya que esto los hace no tratables.

La emergencia y la diseminación de la resistencia del enterococo a la vancomicina ha aumentado el temor de que el plásmido generador de resistencia sea transmitido a *Staphylococcus aureus*, ya que se ha descrito que la transferencia experimental de genes vancomicina-resistentes de enterococos a MRSA en el laboratorio resultó en resistencia a vancomicina. La expresión de resistencia a vancomicina en MRSA, produciría una altísima virulencia de este patógeno humano que es resistente a todas las quimioterapias disponibles.

Por otra parte, aunque las infecciones causadas por el grupo de los estafilococos coagulasa negativa con reducida susceptibilidad a vancomicina habían sido reconocidas, no fue sino hasta 1996 cuando se reconoció la primera infección clínica por *Staphylococcus aureus* (estafilococo coagulasa positiva) con resistencia intermedia a vancomicina (CMI 8  $\mu\text{g/ml}$ ) y en 1997 se reportó el primer aislado de una cepa similar en Estados Unidos. Los mecanismos de esta resistencia de nivel bajo o intermedio a vancomicina son desconocidos, pero se están investigando. Todavía no está claro si estos aislados con susceptibilidad disminuida a vancomicina anuncian la generación de cepas con altos niveles de resistencia.<sup>(20)</sup>

### **3. OBJETIVO**

Establecer si los diferentes extractos de *Physalis pruinosa* poseen actividad antibacteriana contra cepas clínicas y de referencia de *Staphylococcus*, como un primer paso para proceder al aislamiento e identificación de los compuestos activos que potencialmente puedan constituirse en una alternativa para el tratamiento de infecciones por cepas bacterianas resistentes.

### **4. HIPÓTESIS**

Dado que en la medicina tradicional, los frutos de varias especies de *Physalis* son usados para tratar infecciones de las vías respiratorias altas, éstos deberán contener sustancias con actividad antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus* y estas sustancias podrían estar presentes en toda la planta.

### **5. METODOLOGIA**

#### **5.1 Material Vegetal**

Las partes aéreas de *Physalis pruinosa* L. fueron colectadas en Pantitlán, Municipio de Tlayacapan en el Estado de Morelos, México, en julio de 2001. Un ejemplar de la planta se depositó en el Herbario de la Universidad Autónoma de Querétaro (M. Martínez s/n).

La planta se dividió en tres partes: cálices (cáscaras), frutos (tomates) y hojas, ramas y flores. Los cálices se dejaron secar a temperatura ambiente, así como también las hojas, flores y ramas. Los frutos se trabajaron frescos.

#### **5.2. Obtención de extractos**

##### **Cálices**

Los cálices (121.9 g) se colocaron en una columna de vidrio y se extrajeron con metanol. El extracto metanólico de cálices (1) obtenido se concentró a presión reducida en un rota-vapor.

### **Frutos**

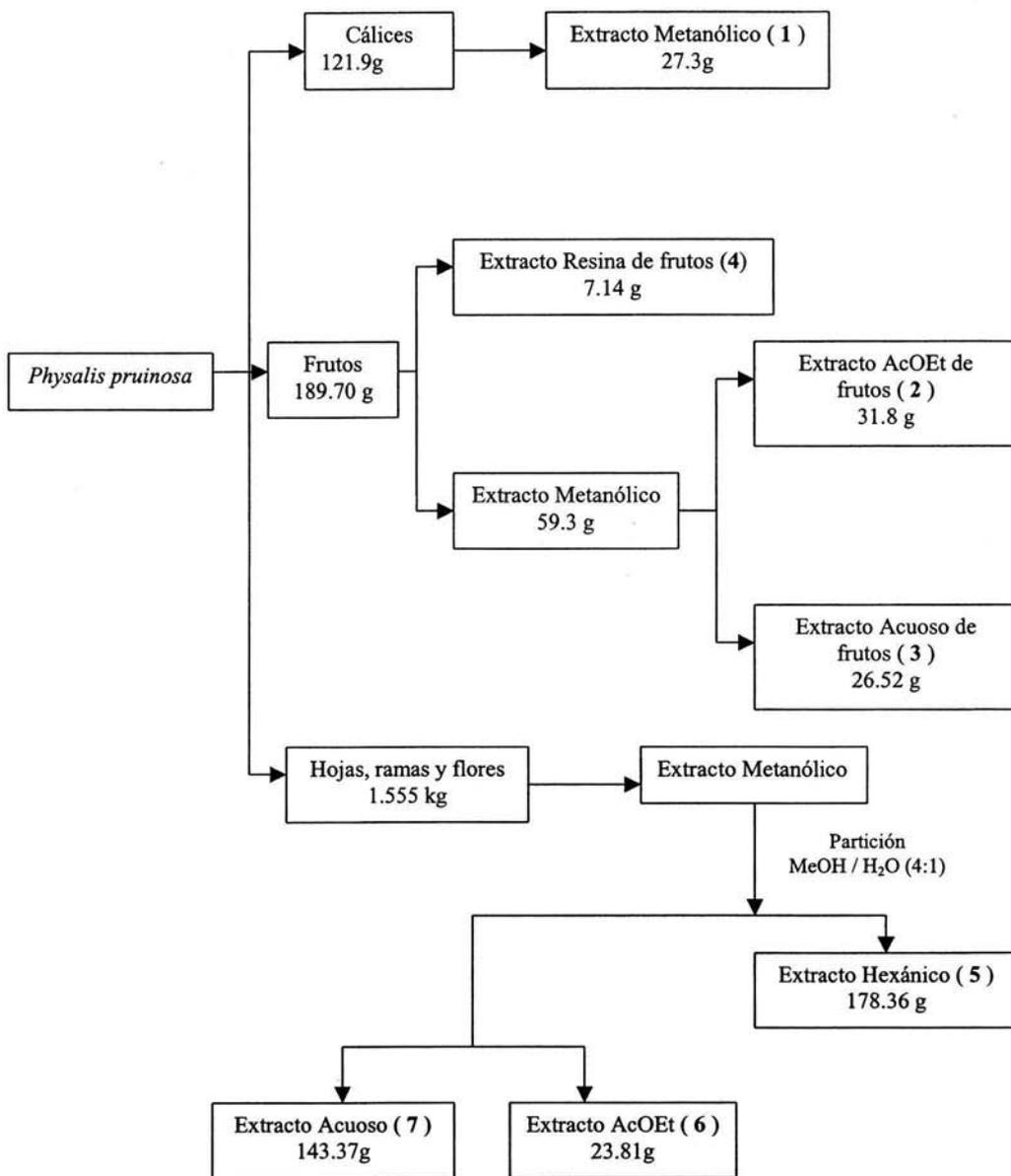
Los frutos (tomates) enteros y frescos (189.70 g) se lavaron dos veces con acetato de etilo (AcOEt) para obtener la resina que cubre su superficie. El disolvente se eliminó por destilación a presión reducida para obtener el extracto de resina de frutos (4).

Posteriormente los frutos se molieron en licuadora con metanol. Se montó una columna de vidrio a la que se le agregó el molido de los frutos, éste se extrajo exhaustivamente con metanol. El extracto obtenido se concentró a presión reducida, para obtener el extracto metanólico de frutos. A este extracto metanólico se le hizo una partición entre AcOEt y agua. En un embudo de separación se colocó dicho extracto, disuelto en AcOEt y agua, se agitó y se dejó que se separaran las fases. La fase orgánica (AcOEt) se separó y el proceso se repitió tres veces más. Las fases orgánicas se concentraron para obtener el extracto AcOEt de frutos (2).

La fase acuosa se concentró en baño María a temperatura de 60°C, pasándole al mismo tiempo una corriente de aire para que el agua se eliminara más rápidamente y así obtener el extracto acuoso de frutos (3).

### **Hojas, ramas y flores**

Las hojas, ramas y flores secas (1.555 kg) se molieron, se empacaron en una columna de vidrio y se extrajeron con metanol hasta agotar el material vegetal. El metanol se eliminó a presión reducida y el extracto obtenido se sometió a un proceso de partición de la siguiente manera: En un embudo de separación se agregó el extracto metanólico disuelto en 1000 ml de metanol-agua 4:1 y se extrajo cinco veces con 300 ml de hexano. Los extractos hexánicos se concentraron a presión reducida con lo que se obtuvo el extracto hexánico de hojas, ramas y flores (5). A la fase de metanol-agua se le eliminó el metanol y se agregaron 600 ml de agua y la fase acuosa resultante se extrajo seis veces con 500 ml de AcOEt, obteniéndose el extracto AcOEt de hojas, ramas y flores (6). Por último la fase acuosa se concentró en baño María a una temperatura de 60°C, pasándole al mismo tiempo una corriente de aire para eliminar el agua y obtener el extracto acuoso de hojas, ramas y flores (7) (Esquema 1).



Esquema 1. Obtención de extractos de la planta *Physalis pruinosa*.

### 5.3. Pruebas de sensibilidad

#### Material bacteriano

Se utilizaron 25 cepas de *Staphylococcus aureus* (coagulasa positiva) y *Staphylococcus epidermidis* (coagulasa negativa) aisladas de casos clínicos en el Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, la Raza (Tabla 1). Como referencia se utilizó la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Las cepas se cultivaron en agar-gelosa-sangre para el crecimiento de cultivos puros y en agar-sal-manitol como medio diferencial. Se realizó **tinción de Gram para establecer la forma y agrupamiento de las bacterias**. Las bacterias puras se mantuvieron por duplicado a temperatura ambiente en tubos inclinados con 3ml de agar-soya-tripticasa como medio de conservación. Para los ensayos de sensibilidad se utilizaron agar y caldo Müeller-Hinton (DIFCO).

**Tabla 1. Cepas de *Staphylococcus* de origen clínico**

Cepa	Clave	<i>Staphylococcus</i> sp. Coagulasa	Cepa	Clave	<i>Staphylococcus</i> sp. Coagulasa
Referencia ATCC29213 <i>S. aureus</i>	A*	+	Clinica 102023	M	+
Clinica 102011	A	-	Clinica 102024	N	+
Clinica 102012	B	-	Clinica 102026	O	+
Clinica 102013	C	+	Clinica 102027	P	-
Clinica 102014	D	+	Clinica 102028	Q	-
Clinica 102015	E	+	Clinica 102030	R	+
Clinica 102016	F	+	Clinica 102032	S	+
Clinica 102017	G	-	Clinica 102036	T	-
Clinica 102018	H	-	Clinica 102037	U	-
Clinica 102019	I	+	Clinica 102039	V	-
Clinica 102020	J	+	Clinica 102042	W	+
Clinica 102021	K	+	Clinica 102043	Y	+
Clinica 102022	L	-	Clinica 102044	Z	-

## Ensayo de actividad antibacteriana

A partir de soluciones con concentración de 100 mg/ml de cada extracto se realizaron diluciones seriadas (10, 1.0 y 0.1 mg/ml).<sup>(22)</sup> Se impregnaron discos de 6 mm con 25µl de cada una de las soluciones, así como también con los diferentes disolventes empleados. Estos últimos para ser utilizados como controles. La concentración final de los extractos en los discos fue de 2.5, 0.25, 0.025 y 0.0025 mg de extracto. Los discos se dejaron secar en una campana de flujo laminar por 24 hrs para evaporar los disolventes.

Los inóculos de las bacterias se prepararon de la siguiente manera: cada cepa se cultivó en agar Müeller-Hinton y posteriormente en caldo Müeller-Hinton (preinóculo) y se incubó a 35°C por 24 hrs. Este preinóculo se centrifugó a 1500 rpm por 20 min para obtener el paquete de bacterias, que se resuspendieron en 1 ml de solución salina al 0.9% y se centrifugaron nuevamente a 1500 rpm por 20 min. Al paquete resultante se le agregó nuevamente sol. salina al 0.9% hasta obtener la concentración estándar 0.5 Mc Farland, la cual se utilizó como referencia en este trabajo y corresponde a  $1.5 \times 10^8$  UFC\*/ml.<sup>(23)</sup> De la suspensión anterior se preparó una dilución 1:20 de la que se colocaron 100 µl en las placas de agar Müeller-Hinton. Se sembró con un asa triangular con movimientos circulares en todas direcciones. Después de que se secó la superficie del medio se colocaron los discos impregnados y se incubaron a 35°C por 24 hrs. Este ensayo se realizó para todos los extractos y el total de las cepas. Para la interpretación de los resultados se midieron los diámetros de los halos de inhibición en mm.

---

\* UFC igual a unidades formadoras de colonias

## 6. RESULTADOS

### Extractos

Como resultado de la extracción de las distintas partes aéreas de *P. pruinosa* L. se obtuvieron 7 extractos diferentes. De éstos, 5 fueron orgánicos y 2 acuosos (Tabla 2). Los rendimientos de los extractos obtenidos fueron variables, con un óptimo de 22.4% en el extracto metanólico de cálices y uno muy bajo, de 1.5%, del extracto de AcOEt de hojas, ramas y flores (Tabla 2).

**Tabla 2. Rendimiento de los extractos obtenidos de diferentes partes aéreas de *Physalis pruinosa***

Material Vegetal	Extracto	Peso del material vegetal	Peso del extracto	Rendimiento del extracto*
Cálices	(1) Metanólico	121.9 g	27.3 g	22.4 %
Frutos	(2) AcOEt	189.7 g	31.8 g	16.8 %
	(3) Acuoso	189.7 g	26.52 g	14.0%
	(4) Resina de frutos (AcOEt)	189.7 g	7.14 g	3.8%
Hojas, ramas y flores	(5) Hexánico	1555.0 g	178.36 g	11.5%
	(6) AcOEt	1555.0 g	23.81 g	1.5 %
	(7) Acuoso	1555.0 g	143.37 g	9.2 %

\* Con respecto al peso seco del material vegetal, excepto los extractos de frutos (2-4) que se obtuvieron del material fresco. Los números dentro de paréntesis (1-7) son las claves que se asignaron a los extractos.

### Pruebas de sensibilidad

Cada uno de los extractos se evaluó por el método de difusión en agar para determinar si contenían compuestos con la capacidad de inhibir el crecimiento de una cepa de referencia de *Staphylococcus aureus* y 25 cepas clínicas de *Staphylococcus* coagulasa positiva y coagulasa negativa. Como resultado de los ensayos se obtuvieron tres tipos de respuesta: efecto bactericida, caracterizado por la formación de halos sin crecimiento bacteriano (HSC); efecto bacteriostático, caracterizado por halos con crecimiento bacteriano fino (HCF) y presencia de

clonas resistentes, caracterizada por el crecimiento de colonias aisladas dentro de los halos de inhibición. Además, en muchos casos se observó la formación de dobles halos (DH); uno interno sin crecimiento y otro externo con crecimiento fino. El tipo de respuesta será uno de los parámetros a considerar para analizar la actividad antibacteriana de los extractos. Los otros parámetros serán el número de respuestas y su magnitud (Tablas 3-5).

Con base en lo anterior se logró establecer que los extractos 4 y 6 fueron los más activos y que por el contrario, los extractos que mostraron menor actividad fueron los dos acuosos (3 y 7) y el hexánico de hojas, ramas y flores (5) (Tablas 3-5).

**Tabla 3. Efecto bactericida de extractos de *P. pruinosa* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus***

Extracto	Concentración (mg/disco)	Número de cepas inhibidas*	Porcentaje de cepas inhibidas	Diámetro promedio de halos de inhibición (mm)
1	2.5	21/25	84	9.0
	0.25	19/25	76	8.1
	0.025	5/25	20	7.8
2	2.5	20/25	80	8.7
	0.25	9/25	36	7.7
	0.025	3/25	12	7.0
3	2.5	0	0	0
4	2.5	24/25	96	9.7
	0.25	20/25	80	8.0
	0.025	4/25	16	7.0
5	2.5	9/25	36	7.0
	0.25	2/25	8	7.0
6	2.5	25/25	100	10.6
	0.25	11/25	44	8.8
	0.025	0	0	0
7	2.5	3/25	12	8.0

\* Se tomaron en cuenta las cepas que presentaron halos sin crecimiento y el halo sin crecimiento incluido en los dobles halos.

**Tabla 4. Diámetros de los halos de inhibición inducidos por extractos de *Physalis pruinosa* en cepas de *Staphylococcus*.**

Extracto	CÁLICES			FRUTOS							HOJAS, RAMAS Y FLORES					
	Metanólico (1)			AcOEt (2)			H <sub>2</sub> O (3)	Resina de frutos (4)				Hexánico (5)		AcOEt (6)		H <sub>2</sub> O (7)
Cepa	2.5	0.25	0.025	2.5	0.25	0.025	2.5	2.5	0.25	0.025	0.0025	2.5	0.25	2.5	0.25	2.5
A*	12.0	8.0	8.0	7.0	7.0	-	7.0	14.0	12.0	7.0	-	-	-	12.0	9.0	-
A	9.0	8.0	7.0	12.0	9.0	-	-	14.0	12.0	9.0	8.0	-	-	11.0	12.0	-
B	-	-	-	-	-	-	-	8.0	14.0	8.0	7.0	-	-	8.0	7.0	-
C	10.0	8.0	-	7.0	7.0	-	7.0	11.0	9.0	7.0	-	-	-	11.0	9.0	-
D	8.0	8.0	-	8.0	-	-	-	7.0	7.0	7.0	-	7.0	-	11.0	8.0	-
E	8.0	7.0	-	8.0	-	-	-	11.0	7.0	7.0	-	7.0	-	11.0	7.0	-
F	8.0	7.0	-	8.0	-	-	-	7.0	7.0	-	-	-	-	10.0	9.0	-
G	8.0	9.0	-	10.0	-	-	-	10.0	7.0	7.0	-	7.0	7.0	11.0	8.0	8.0
H	-	-	-	-	-	-	-	8.0	-	-	-	7.0	-	10.0	8.0	-
I	9.0	8.0	-	7.0	7.0	-	-	11.0	7.0	-	-	-	-	10.0	9.0	-
J	9.0	8.0	-	10.0	-	-	-	11.0	8.0	-	-	-	-	10.0	9.0	-
K	8.0	7.0	-	8.0	-	-	-	11.0	7.0	-	-	7.0	-	12.0	11.0	-
L	8.0	-	-	8.0	-	-	-	10.0	7.0	9.0	-	-	-	9.0	8.0	-
M	7.0	7.0	-	9.0	-	-	-	7.0	-	-	-	-	-	10.0	8.0	-
N	9.0	8.0	-	8.0	-	-	8.0	8.0	7.0	-	-	7.0	-	11.0	10.0	-
O	7.0	8.0	8.0	9.0	8.0	-	-	8.0	7.0	-	-	-	-	12.0	8.0	8.0
P	10.0	8.0	8.0	9.0	8.0	7.0	-	12.0	12.0	-	-	7.0	-	12.0	10.0	-
Q	10.0	8.0	8.0	8.0	7.0	7.0	-	10.0	-	-	-	-	-	12.0	8.0	8.0
R	10.0	9.0	8.0	8.0	-	-	-	11.0	9.0	7.0	7.0	7.0	7.0	11.0	8.0	-
S	10.0	8.0	-	10.0	8.0	-	-	9.0	7.0	-	-	-	-	11.0	7.0	-
T	8.0	-	-	-	-	-	10.0	10.0	7.0	9.0	-	-	-	11.0	8.0	8.0
U*	21.0	11.0	-	17.0	12.0	-	9.0	10.0	8.0	-	-	7.0	7.0	9.0	-	-
V	8.0	8.0	-	9.0	7.0	7.0	-	9.0	7.0	8.0	-	7.0	-	9.0	8.0	-
W	13.0	10.0	-	9.0	7.0	-	-	11.0	10.0	-	-	-	-	12.0	8.0	7.0
Y	12.0	10.0	-	9.0	8.0	-	-	10.0	9.0	7.0	-	-	-	11.0	8.0	7.0
Z	-	-	-	-	-	-	-	8.0	13.0	-	-	-	-	10.0	-	-

Las concentraciones de los extractos se indican de 2.5-0.0025 mg/disco. Los valores en negras representan halos sin crecimiento (efecto bactericida) y los valores en cursivas halos con crecimiento fino (efecto bacteriostático). Los casos donde se muestran dos valores corresponden a dobles halos (efecto bactericida y bacteriostático). \* Se observó la presencia de clonas resistentes con los extractos 1 y 2.

El extracto de AcOEt de resina de frutos (4) fue el que mostró la mayor actividad, ya que inhibió totalmente el crecimiento de 24 de las 25 cepas utilizadas en el estudio y este efecto se observó incluso con la concentración de 0.025 mg/disco en 4 de las cepas (Tablas 3 y 4). Además del efecto bactericida, dicho extracto también presentó actividad bacteriostática contra algunas de las cepas (Tablas 4 y 5). Esta se observó desde la concentración de 2.5 mg/disco y hasta la de 0.0025 mg/disco.

**Tabla 5. Tipos de respuestas inducidas por extractos de *P. pruinosa* sobre cepas de *Staphylococcus*.**

Extracto	1			2			3	4				5		6		7	
	2.5	0.25	0.025	2.5	0.25	0.025	2.5	2.5	0.25	0.025	0.0025	2.5	0.25	2.5	0.25	2.5	
Número de cepas clínicas sensibles	HSC	21	19	5	20	9	3	0	24	20	4	0	9	2	25	11	3
	HCF	1	1	0	1	2	0	4	1	2	7	3	1	1	0	12	3
	DH	5	1	0	8	1	0	0	18	15	1	0	0	0	6	0	1
Promedio de diámetros de halos	HSC	9.0	8.1	7.8	8.7	7.7	7.0	0	9.7	8.0	7.0	0	7.0	7.0	10.6	8.8	8.0
	HCF	21.0*	11.0*	0	17.0*	9.5*	0	8.5	8.0	13.5	8.1	7.3	7.0	7.0	0	8.2	7.3
	DH	14.4	11.0	0	13.2	9.0	0	0	14.4	12.5	8.0	0	0	0	14.0	0	13.0
Diámetro halo cepa referencia	12.0	8.0	8.0	7.0 10.0	7.0	0	7.0	14.0	12.0	7.0	0	0	0	12.0	9.0	0	
Total cepas sensibles	23	21	6	22	12	3	5	26	23	12	3	10	3	26	24	6	

Los valores indican el número de cepas en las que se presentaron halos sin crecimiento (HSC), con crecimiento fino (HCF) o con doble halo (DH), así como los respectivos promedios de diámetro de los halos. \* Indica presencia de clones resistentes.

El extracto 6 generó halos de inhibición sin crecimiento en las 25 cepas clínicas (100%) con la concentración más alta (2.5 mg/disco) y en 11 de ellas (44%) con la concentración de 0.25 mg/disco (Tabla 3). Con las concentraciones más bajas no se observó ningún tipo de respuesta. En cuanto a la presencia de dobles halos, éstos se observaron sólo con la concentración de 2.5 mg/disco en 20% de las cepas (Tablas 4 y 5).

El extracto metanólico de cálices (1) también resultó con actividad bactericida, aunque ésta fue menor que la del extracto 6. Así, a las concentraciones de 2.5 y 0.25 mg/disco inhibió el crecimiento del 84 y 76 % de las cepas clínicas. Sin embargo, su efecto bactericida decreció

notablemente con la concentración de 0.025 mg/disco, con la que únicamente inhibió a 5 de las cepas de *Staphylococcus* (Tabla 3).

Con respecto al extracto 2 (AcOEt de frutos), cuando se evaluó a la mayor concentración (2.5 mg/disco) se observó actividad contra 20 de las 25 cepas (80%), pero con las siguientes concentraciones (0.25 y 0.025 mg/disco) su actividad disminuyó, mostrando efecto sólo contra 9 y 3 de las cepas respectivamente (Tabla 3). Por otro lado, resulta importante referir que con los extractos 1 y 2 se identificó la presencia de clonas resistentes en la cepa *Staphylococcus* coagulasa negativa (*Staphylococcus epidermidis*) designada con la letra U. Como ya se mencionó, la presencia de clonas resistentes se determinó por el crecimiento de colonias aisladas sobre los halos de inhibición. Estas colonias se aislaron para descartar la posible existencia de contaminantes. El resultado obtenido mostró que se trataba de una cepa *Staphylococcus* coagulasa negativa. Estas clonas se cultivaron y se probaron nuevamente contra el extracto 2 y no se observó inhibición del crecimiento. Por lo anterior se puede asegurar que se trataba de mutantes resistentes.

Entre los extractos que mostraron escasa actividad se encuentra el hexánico de hojas, ramas y flores (5). Con la mayor concentración (2.5 mg/disco), la actividad bactericida de este extracto sólo afectó a 9 de las cepas clínicas (36%). Con la concentración 0.25mg/disco su efecto se observó únicamente en 2 de dichas cepas (Tabla 3).

Los extractos acuosos 3 y 7 fueron activos únicamente con la concentración más alta. El extracto 3 inhibió a la cepa de referencia y tuvo un efecto bacteriostático sobre el 16 % de las cepas clínicas. El extracto 7 inhibió a 6 de las cepas clínicas, pero no a la de referencia y en 3 de las cepas inhibidas su efecto fue bacteriostático (Tablas 4 y 5).

Los diámetros de los halos de inhibición fueron variables dependiendo tanto del tipo de extracto como de la concentración del mismo en los discos (Tabla 4). El tamaño de los halos fue desde 21 mm el mayor hasta 7 mm el más pequeño. Aquí es importante señalar que no obstante que los extractos 1 y 2 generaron los halos de mayor tamaño (21 y 17 mm), fueron estos extractos los que dieron lugar a clonas resistentes con la cepa clínica U (Tabla 4).

Con la intención de tener una mejor forma para interpretar la actividad de los extractos de *Physalis pruinosa*, se elaboró una escala de intensidad del efecto observado. Esta se estableció de manera cualitativa asignando cruces dependiendo del tamaño de los halos de inhibición. Al respecto se consideró que los halos de 7.0 a 9.0 mm corresponden a +; los de 9.1 a 11.0 mm a ++; aquellos de 11.1 a 13.0 mm se denotarán +++ y la notación ++++ indicará que los halos son mayores de 13.1 mm. Con lo anterior se definió la siguiente escala de actividad: + = escasa; ++ = regular y +++ o ++++ = buena. Al utilizar dicho criterio se visualiza mejor que los extractos 4 y 6 fueron los más activos, que los que mostraron una actividad mediana fueron el 1 y el 2 y que los menos activos fueron 3, 5 y 7 (tabla 6).

**Tabla 6. Intensidad de la actividad bactericida de extractos de *Physalis pruinosa* contra cepas de *Staphylococcus***

Extracto	Cálices			Frutos						Hojas, ramas y flores							
	Metanólico			AcOEt			Acuoso		(AcOEt)			Hexánico		AcOEt		Acuoso	
	(1)	(1)	(1)	(2)	(2)	(2)	(3)	(3)	(4)	(4)	(4)	(5)	(5)	(6)	(6)	(7)	(7)
Cepa/conc	2.5	0.25	.025	2.5	0.25	.025	2.5	0.25	2.5	0.25	.025	2.5	0.25	2.5	0.25	2.5	0.25
A*	+++	+		+	+		+		++++	+++	+			+++	+		
A	+	+	+	+++	+				+++	+++				++			
B									+					+			
C	++	+		+	+				++	+	+			++	++		
D	+	+		+					+	+	+	+		++	+		
E	+	+		+					++	+	+	+		++	+		
F	+	+		+					+	+				++			
G	+	+		++					++	+		+		++			
H														++			
I	+	+		+					++	+				++	+		
J	+	+		++					++	+				++	+		
K	+	+		+					++	+		+		+++	++		
L	+			+					++	+				+	+		
M	+	+		+					+	+				++	+		
N	+	+		+					+	+		+		++	++		
O	+	+	+	+	+				+	+				+++		+	
P	++	+	+	+	+	+			+++	+++		+		+++	++		
Q	++	+	+	+	+	+			++					+++		+	
R	++	+	+	+					++	+		+	+	++			
S	++	+		++	+				+	+				++			
T	+								++	+				++		+	
U									++	+		+	+	+			
V	+	+		+	+	+			+	+		+		+			
W	+++	++		+	+				++	++				+++			
Y	+++	++		+	+				+	++	+			++			
Z									+					++			

Las concentraciones se expresan en mg/disco. Los diámetros de los halos de inhibición sin crecimiento se representan con cruces según lo siguiente: 7.0-9.0 mm = +; 9.1-11.0 = ++; 11.1-13.0 = +++ y 13.1-15.0 = ++++. Los halos grandes se marcaron en negritas.

A las cepas clínicas de *Staphylococcus* utilizadas en el estudio se les realizó la prueba de coagulasa y se encontró que 15 de ellas fueron positivas y 10 negativas.

Al analizar la actividad de los extractos en relación a esta característica de las cepas, observamos que las que presentaron la coagulasa positiva fueron más sensibles a los componentes de los extractos. Lo anterior fue determinado tanto por el número de halos observados, como por el tipo de respuesta (Tablas 7 y 8). En ambos tipos de eubacterias los extractos más activos fueron el 4 y el 6. Cabe mencionar que en las cepas *Staphylococcus* coagulasa negativa se presentaron los halos más grandes, pero éstos corresponden a actividad bacteriostática o incluso a formación de clonas resistentes (Tablas 4-8). El tamaño de los halos sin crecimiento fue semejante en los dos tipos de bacterias.

**Tabla 7. Actividad antibacteriana de extractos de *Physalis pruinosa* sobre cepas de *Staphylococcus coagulasa positiva***

Extracto		1			2			3	4				5		6		7
Conc. mg/disco		2.5	0.25	0.025	2.5	0.25	0.025	2.5	2.5	0.25	0.025	0.0025	2.5	0.25	2.5	0.25	2.5
Número de cepas clínicas	HSC	15	15	2	15	5	0	0	15	14	4	0	6	1	15	8	1
	HCF	0	0	0	0	1	0	2	0	0	2	1	0	1	0	7	3
	DH	3	0	0	7	1	0	0	10	9	1	0	0	0	5	0	0
Promedio de diámetro de halos	HSC	8.7	8.1	8.0	8.4	7.5	0	7.0	9.8	8.0	7.0	0	7.0	7.0	11.0	8.8	8.0
	HCF	0	0	0	0	7.0	0	7.5	0	0	7.0	7.0	0	7.0	0	8.0	7.3
	DH	14.3	0	0	14.8	9.0	0	0	14.3	9.5	8.0	0	0	0	13.2	0	0
Diámetro halo cepa referencia		12.0	8.0	8.0	7.0	7.0	0	0	14.0	12.0	7.0	0	0	0	12.0	9.0	0
Total de cepas sensibles		16	16	3	16	7	0	3	16	15	7	1	6	2	16	16	4

Los valores indican el número de cepas en las que se presentaron halos sin crecimiento (HSC), con crecimiento fino (HCF) o con doble halo (DH), así como los respectivos promedios de diámetro de los halos.

**Tabla 8. Actividad antibacteriana de extractos de *Physalis pruinosa* sobre cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativa**

Extracto		1			2			3	4				5		6		7
Conc. mg/disco		2.5	0.25	0.025	2.5	0.25	0.025	2.5	2.5	0.25	0.025	0.0025	2.5	0.25	2.5	0.25	2.5
Número de cepas clínicas	HSC	6	5	3	5	4	3	0	9	6	0	0	3	1	10	3	2
	HCF	1	1	0	1	1	0	2	1	2	5	2	1	0	0	5	0
	DH	2	1	0	1	0	0	0	8	6	0	0	0	0	1	0	1
Promedio de diámetro de halos	HSC	8.8	8.0	7.6	9.2	7.7	7.0	0	10.1	8.8	0	0	7.0	7.0	10.1	8.6	8.0
	HCF	21.0	11.0	0	17.0	12.0	0	9.5	8.0	13.5	8.4	7.5	7.0	0	0	8.6	0
	DH	14.5	11.0	0	12.0	0	0	0	14.6	13.8	0	0	0	0	18.0	0	13.0
Total de cepas sensibles		7	6	3	6	5	3	2	10	8	5	2	4	1	10	8	2

Los valores indican el número de cepas en las que se presentaron halos sin crecimiento (HSC), con crecimiento fino (HCF) o con doble halo (DH), así como los respectivos promedios de diámetro de los halos.

## 7. DISCUSION

Las plantas se han utilizado tradicionalmente para el tratamiento de diferentes padecimientos, sin embargo, su empleo es empírico, transmitido de generación en generación y en la casi totalidad de ellas no se conoce la identidad de los principios activos y mucho menos su mecanismo de acción o los efectos adversos que pudieran provocar. Entre estas plantas están diversas especies de *Physalis*, particularmente *P. philadelphica*, cuyo fruto, tomate o tomate verde, se aplica tópicamente para el tratamiento de infecciones respiratorias y la infusión de sus hojas o frutos, para infecciones gastrointestinales.<sup>(6)</sup> A pesar de que sólo existe una investigación acerca de la actividad antibacteriana de esta especie<sup>(24)</sup>, existen tres estudios más de especies del mismo género (*P. chenopodiifolia*,<sup>(25)</sup> *P. peruviana*<sup>(26)</sup> y *P. angulata*<sup>(27)</sup>) y en todas ellas se encontró actividad.

En el presente estudio se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos orgánicos y acuosos de diferentes partes de *Physalis pruinosa* por el método de difusión en disco. Las bacterias blanco fueron una cepa de referencia de *Staphylococcus aureus*, 15 cepas clínicas de *S. coagulasa* positiva y 10 de *S. coagulasa* negativa, sobre las que los extractos mostraron tanto efecto bactericida (halos sin crecimiento, HSC) como bacteriostático (halos con crecimiento fino, HCF). Además, un hecho que se debe resaltar, fue la presencia de clones resistentes en una de las cepas clínicas (fig. 4).

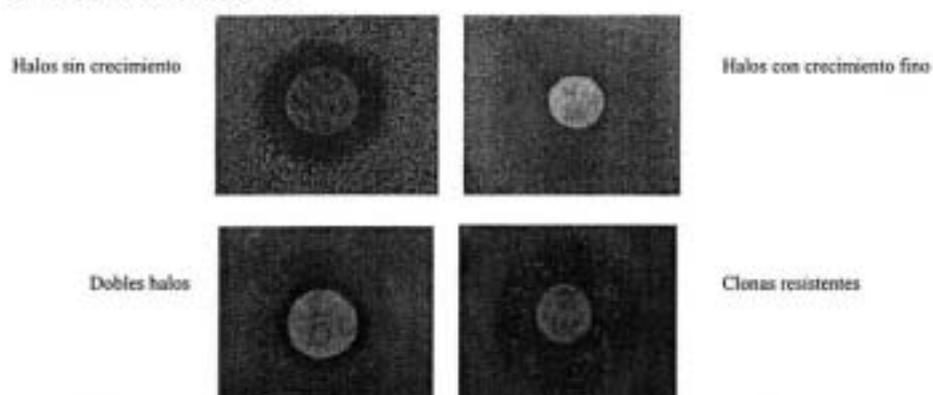


Figura 4. Diferentes tipos de respuesta de cepas de *Staphylococcus* frente a extractos de *P. pruinosa*

Los extractos de *Physalis pruinosa* se clasificaron según la polaridad del disolvente con el que fueron obtenidos. Así el extracto hexánico de hojas, ramas y flores (5) se considera de polaridad baja, mientras que los extractos de AcOEt de frutos (2), de resina de frutos (4), de hojas, ramas y flores (6) y el metanólico de cálices (1) se clasificaron como de polaridad media y los acuosos de frutos (3) y de hojas, ramas y flores (7) como de polaridad alta.

Los resultados mostraron que el extracto hexánico de hojas, ramas y flores (5) de *Physalis pruinosa* es muy poco activo, ya que no inhibió a la cepa de referencia y sólo a las concentraciones más altas generó halos de inhibición muy pequeños (7 mm) en 36 % (2.5 mg/disco) y 8 % (0.25 mg/disco) de las cepas clínicas (Tabla 3).

La actividad de los extractos acuosos de frutos (3) y de hojas, ramas y flores (7), fue aún menor. A la concentración más alta, el primero mostró un pobre efecto bactericida (halo de 7 mm) sobre la cepa de referencia, pero no sobre las cepas clínicas, donde sólo formó halos con crecimiento fino. A la misma concentración, el extracto 7 sólo inhibió el crecimiento de 12 % de las cepas clínicas. Quizá estos resultados se dan en razón de que se explique la forma de administración de los tomates para combatir infecciones en las vías respiratorias altas, el cual con ligeras variantes consiste esencialmente en una aplicación tópica del (jugo) del fruto asado y no en forma de un extracto acuoso.

Por el contrario, los extractos de acetato de etilo de frutos (1), resina de frutos (4) y de hojas, tallos y flores (6), así como el metanólico de cálices (2) de *Physalis pruinosa* inhibieron el crecimiento de las cepas en porcentajes que van del 80 al 100 %, a la concentración de 2.5 mg/disco. Al disminuir la concentración de los extractos a 0.25 mg/disco se observó un fuerte descenso en la actividad de los extractos 2 y 6 que mostraron efecto bactericida sólo contra el 36 % (2) y el 44% (6) de las cepas y efecto bacteriostático contra 8 % (2) y 48% (6) de las mismas. En los extractos 1 y 4 esta disminución de la actividad no fue tan marcada, ya que fueron bactericidas para el 76 % (1) y 80% (4) de las cepas y su efecto bacteriostático se manifestó en 4 % (1) y 8% (4) de los organismos blanco. Cuando los extractos se ensayaron a la concentración de 0.25 mg/disco, el extracto 6 perdió totalmente la actividad y el efecto bactericida de los extractos 1, 2 y 4 sólo se presentó en 20 % (1), 12 % (2) y 16% (4) de las

cepas clínicas. El extracto 4 fue el único con efecto bacteriostático a esta concentración (28 %) y también el único con actividad (efecto bacteriostático sobre el 12 % de cepas clínicas) a la concentración de 0.0025 mg/disco.

Cabe mencionar que al considerar el tamaño promedio de los halos de inhibición (HSC) como otro criterio para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos, se encontró que el que generó los halos más grandes fue el extracto 6 y le siguieron, en orden, el 4, el 1 y el 2 (tabla 6). La cepa de referencia resultó inhibida por estos cuatro extractos con halos de inhibición mayores que los promedio de las cepas clínicas, excepto para el extracto 2 cuya actividad fue escasa. En este caso la mejor respuesta se obtuvo con el extracto 4, seguido por los extractos 1 y 6.

De los resultados obtenidos se pudo establecer que la actividad antibacteriana se concentra en los extractos orgánicos de polaridad media, es decir, los obtenidos con AcOEt o MeOH. Estos resultados también mostraron que existen compuestos activos en todas las partes de la planta que fueron analizadas.

Es importante señalar que los cuatro extractos activos generaron halos dobles, uno interno sin crecimiento bacteriano (efecto bactericida) y uno externo con crecimiento bacteriano fino (efecto bacteriostático) (Fig. 4). Este tipo de respuesta se atribuye a la presencia de al menos dos compuestos activos en el extracto; uno con mayor actividad que genera el halo interno y otro con menor actividad (o presente en una concentración baja), pero con mejor difusión en el agar, que genera el halo externo. El extracto que presentó el mayor número de dobles halos fue el 4 (tabla 4).

El análisis de los datos obtenidos de los ensayos permite proponer que existe una relación dosis-respuesta, ya que resulta claro que al disminuir la concentración de los extractos y por ende la de los compuestos activos, el efecto bactericida es menor (menos y más pequeños HSC) y hay un incremento en el efecto bacteriostático (más HCF); y si la concentración se disminuye aún más se llega a un punto en el que este último también se pierde y ya no hay respuesta.

Cabe recordar que el uso indiscriminado de antimicrobianos ha dado lugar a la selección de mutantes resistentes. Este hecho es más contundente en el caso de las infecciones intrahospitalarias en las que *Staphylococcus* tiene un papel muy importante<sup>(18)</sup> y aunque en un principio sólo las cepas de *S. aureus* (coagulasa positivo) eran de importancia clínica, en los últimos años los *Staphylococcus* coagulasa negativos también están participando de manera importante en este tipo de problemática.<sup>(20)</sup> En este grupo de bacterias, las cepas con mayor relevancia son las que presentan resistencia a vancomicina.<sup>(20)</sup>

En nuestro estudio con *Physalis pruinosa*, las cepas de *Staphylococcus* coagulasa positiva fueron inhibidas en una mayor proporción que las de *Staphylococcus* coagulasa negativa. De hecho mientras que todos los extractos activos (1, 2, 4 y 6) inhibieron al 100 % de las cepas coagulasa positiva a la concentración más alta, en las cepas coagulasa negativa el porcentaje de inhibición fue de 100 % con el extracto 6, 90 % con el 4 y 60 y 50 % con los extractos 1 y 2, respectivamente. Así vemos que en estas cepas ya existen problemas de resistencia. Lo anterior es congruente con la observación de que son el grupo de los *Staphylococcus* coagulasa negativa, los microorganismos en los que los problemas para el ser humano sobre resistencia son más importantes.

La explicación de por qué estas cepas son resistentes a compuestos que aparentemente no se han utilizado en la clínica, pudiera darse en razón del empleo de especies de *Physalis* no sólo para tratar infecciones, sino como parte de la dieta y a pesar de que no se tienen registros de estos usos para el caso de *P. pruinosa*, es bastante probable que los compuestos antibacterianos que posee, sean los mismos o muy semejantes a los presentes en las especies que sí se han usado para dichos fines y hacia los cuales algunas bacterias podrían haber desarrollado resistencia.

Por otra parte, al comparar nuestros resultados con los obtenidos en el estudio de *Physalis chenopodifolia*<sup>(24)</sup> se observó una gran coincidencia; es decir que en las dos especies la mayor actividad se presentó en los extractos de mediana polaridad. En *Physalis chenopodifolia* se observó que el extracto de AcOEt de hojas, ramas y flores resultó ser el más activo y en

*Physalis pruinosa* fueron los extractos de AcOEt de resina de frutos (4) y de hojas, ramas y flores (6) en los que se observó la mayor actividad. Lo anterior permite proponer que los compuestos responsables de la actividad en ambas plantas deben ser similares, y aunque hasta el momento en nuestro laboratorio no se han identificado los compuestos activos de la población de *Physalis pruinosa* en estudio, es muy probable que se trate de withaesteroides. Esta proposición se deriva de que en las publicaciones sobre estudios químicos tanto de *Physalis chenopodiifolia*<sup>(28)</sup> como de *P. pruinosa*<sup>(14)</sup> se establece que los compuestos presentes en las fracciones de polaridad media, son precisamente withaesteroides. Lo mismo es cierto para *P. philadelphica* y *P. peruviana* cuya actividad antimicrobiana ha sido evaluada sobre cepas de *S. aureus*<sup>(24, 26)</sup> y que también contienen ese tipo de compuestos.<sup>(29-32)</sup>

El caso de *P. angulata*<sup>(27)</sup>, otra especie con actividad antibacteriana, merece mención aparte. Su extracto de AcOEt se probó contra cepas de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis* y se identificó al ácido oleanólico (un triterpeno) como el responsable de la actividad.<sup>(27)</sup> En nuestro caso se puede descartar que la actividad de *P. pruinosa* se deba a dicho compuesto, porque se sabe que cuando se realiza un proceso de partición entre hexano y MeOH-H<sub>2</sub>O, como el que se llevó a cabo con el extracto metanólico de *P. pruinosa*, este tipo de triterpenos quedan en la fracción hexánica<sup>(33-34)</sup> y en nuestros ensayos esa fracción hexánica (5) mostró una actividad muy pobre.

Con este estudio quedó establecido que al igual que en otras especies de *Physalis*,<sup>(24-27)</sup> en *Physalis pruinosa* existen compuestos con actividad antibacteriana. Lo anterior y el hecho de que el extracto más activo de *Physalis pruinosa* haya sido el de resina de frutos (la sustancia pegajosa que recubre a los tomates), muestra que existen fundamentos que justifican el uso empírico de los frutos de *Physalis* para el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias altas.<sup>(6)</sup>

Una vez que se determinó que algunos de los extractos de *Physalis pruinosa* contienen compuestos con actividad antibacteriana, el siguiente paso será aislar dichos compuestos activos, determinar sus estructuras, evaluar su actividad antibacteriana sobre cepas clínicas y de referencia de *Staphylococcus* y determinar su concentración mínima inhibitoria para que al ser

comparada con la de antibióticos comerciales, se pueda establecer el verdadero potencial de los compuestos como antimicrobianos.

Los extractos que se obtuvieron en las extracciones contienen una mezcla de compuestos entre ellos están los compuestos activos los cuales al ser aislados, purificados, identificados y probados la respuesta de la actividad antibacteriana que se esperaría sería mayor.

Es importante señalar que la búsqueda y desarrollo de nuevos compuestos antibacteriales dirigidos a evadir los mecanismos de resistencia de los microorganismos es ya urgente, ya que algunos, como el *Staphylococcus aureus* que es altamente patógeno, se están convirtiendo cada vez más en multirresistentes y también especies coagulasa negativa como el *Staphylococcus epidermidis* van por ese camino.

Ante la problemática de la resistencia de estos microorganismos a diversos antibióticos resulta urgente el desarrollo de nuevos compuestos antibacteriales, para lo cual, una alternativa es investigar sobre los compuestos con actividad antibacteriana presentes en plantas, que pudieran presentar otros mecanismos de acción.

## 8. CONCLUSIONES

En la planta *Physalis pruinosa* L. se encontró actividad antibacteriana en los extractos de AcOEt de resina de frutos, (sustancia pegajosa que cubre al fruto), metanólico de cálices, AcOEt de hojas, ramas y flores y AcOEt de frutos. Es decir se encontró actividad en todas las partes de la planta y los compuestos activos se concentraron en los extractos de polaridad media.

La mayor actividad antibacteriana se observó en los extractos de AcOEt tanto de resina de frutos como de hojas, ramas y flores.

Al analizar por separado la respuesta de las cepas clínicas de *Staphylococcus coagulasa* positiva y negativa, se encontró que son las cepas coagulasa negativa las que mostraron menor susceptibilidad a los componentes de los extractos de *P. pruinosa*. Este aspecto es importante ya que en la actualidad, *Staphylococcus coagulasa* negativa ha adquirido relevancia debido precisamente a los problemas de resistencia que presenta.

Es importante el hecho de que en este estudio se hayan empleado cepas clínicas, ya que éstas han sido expuestas a cambios o mutaciones por el uso indiscriminado de antimicrobianos. En consecuencia su respuesta es diferente a la de las cepas de referencia, que normalmente se utilizan en este tipo de estudios.

A pesar de que varias especies del género *Physalis* son empleadas en la medicina tradicional para tratar diversas infecciones, en el caso de *Physalis pruinosa* no se tienen referencias de su uso en este sentido. Sin embargo, la actividad antibacteriana que mostró esta especie permite suponer que la presencia de compuestos con actividad antibacteriana se extiende a otras especies del género que no han sido usadas con estos fines o de las que no existen referencias de su uso.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Plantas medicinales. En Carta de la Salud. 1991. De Caso, O., Valdés, C. O. Eds. Fundación Mexicana para la Salud. 2 (5):3.
2. Calderón, J. E., Arredondo, G. J. L., Conde G. C., Nasrallah, R. E., Rodríguez, S. R. Aplicación clínica de antibióticos y quimioterápicos. 1997; 7ª ed. México. pp 110 y 371.
3. Vargas, P. O., Martínez, M., Dávila, P. A. "El género *Physalis* (Solanaceae) en el Estado de Jalisco" 1998. *Bol. Inst. Bot. Universidad de Guadalajara*. 5, 395-401.
4. Martínez, M., Revision of *Physalis* section *Epeteiorhiza* (Solanaceae). 1998. *Anales del Instituto de Biología. UNAM. Serie Bótanica* 69(2): 71-117.
5. Vargas Ponce, O. El género *Physalis* (Solanaceae) en Nueva Galicia. 1998. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F.
6. Montes, H. S. Tomate de cáscara (*Physalis philadelphica* Lam.). En "Avances en los recursos fitogenéticos de México". 1991. Eds. Ortega, P. R., Palomino, H. G., Castillo, G. F., González, H. V. A., Livera, M. M. SOMEFI, Chapingo, México, pp 251-255.
7. Coordinador Gral. Vilamar, A. A. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 1994 Instituto Nacional Indigenista. 1ª ed. México D.F. Vol. III pp. 1350-1351.
8. Ray, B. A.; Gupta, M. Withasteroids, a Growing Group of Naturally Occurring Steroidal Lactones. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. 1994. Herz, W., Kirby, G. N., Moore, R. E., Steglich, W., Tamm, Ch. Eds. Springer-Verlag, Wien. pp. 2-106.
9. Mayorga, H., Duque, C., Knapp, H., Winterhalter, P. Hydroxyester disaccharides from fruits of cape gooseberry (*Physalis peruviana*) 2002. *Phytochemistry* 59, 439-445.
10. Basey, K., McGaw, B. A., Woolley, J. G. Phygrine an Alkaloid from *Physalis* species. 1992. *Phytochemistry* 31, 4173-4176.
11. Sinha, S. C., Ali, A., Bagchi, A., Sahai, M., Ray, A. B. Physalindicanols, new biogenetic precursors of C28-steroidal lactones from *Physalis minima* var. *indica*. 1986. *Planta Medica* 53, 55-57.
12. Khan, P. M., Ahmad, S., Rubnawaz, H. and Malik A. The first report of a withanolide from the family Labiatae. 1999. *Phytochemistry* 51, 669-671.
13. Mohamad, B., Ksebati and Francis J. Schmitz. Minabeolides: A Group of Withanolides from a Soft Coral, *Minabea* sp. 1988. *J. Org. Chem.* 53, 3926-3929.
14. Shingu, K., Miyagawa, M., Yahara, S., and Nohara T. Physapruins A and B, two new withanolides from *Physalis pruinosa*. 1993. *Chem. Pharm. Bull.* 41, 1873-1875.
15. Dart, R. K. Microbiology for the analytical chemist. 1996. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK. pp.3-9.

15. Levinson, W., Jawetz, E. Microbiología e Inmunología Médicas evaluación y repaso 1992. Ed. El Manual moderno, México, D. F. pp. 5-12.
16. Prats, G. *et al.* Microbiología Médica Cuaderno de prácticas y demostraciones. 1993. Ed. Doyma. Barcelona España. pp. 88,89.
17. Joklik, W. K. *et al.* 1996. Zinsser Microbiología. Panamericana. B. A. Argentina. pp. 555-595, 750-752
18. Davis, B., Dubelcco, R., Eisen, H., Wood, W. Tratado de Microbiología. 1978. Ed. Salvat, 2<sup>da</sup> ed. Barcelona (España) pp. 752, 761-762.
19. Bogsonano, C. Impact de la résistance antibiotique et des fluoroquinolones su l'adhérence à la ibronectine de *Staphylococcus aureus* : étude fonctionnelle et mécanismes moléculaires. 2000. Tesis Doctoral en Ciencias. Universidad de Génova.
20. Lerner, S. A.; Clinical impact of antibiotic resistance. In Progress in Understanding Drug Resistance and Development of New Antibiotics. 1988. Rosen, P. B. and Mobashery, S. Eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers. pp. 8-11.
21. Gilmore, K. S.; Gilmore, M. S. Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. In Bacterial Resistance to Antimicrobials. 2002. Lewis, K., Salyers, A. A., Taber, H. W., Wax, R. G. Eds. Marcel Dekker, Inc. pp. 331.
22. Isenberg, H. (Ed.) 1992. Clinical procedures handbook Am. Society for Microbiology. Washington D.C. Vol. 1 Secc. 5.
23. Murray, P. R. *et al.* 1999. Manual of clinical microbiology. 7ed. A.S. for microbiology. Washington, USA. pág. 1669
24. Cáceres, A.; Alvarez A. V.; Ovando A. E.; Samayoa, B. E. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. 1991. *J. Ethnopharmacology*. 31, 193-208.
25. Gómez Rangel, O. R. Actividad antibacteriana de extractos obtenidos de partes aéreas de *Physalis chenopodifolia* contra cepas clínicas de *Staphylococcus*. 2003. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
26. Zaki, A. Y., El-Alfy, T. S. M.; El Gohary, H. M. A. Study of withanolides, physalins, antitumor and antimicrobial activity of *Physalis peruviana*. 1987. *Egyptian J. Pharm. Sciences*. 28, 235-45.
27. Shim, Jae-Seok; Kyung-Min; Chung, Jae-Youn; Hwang, Jae-Kwan. Antibacterial activity of oleanolic acid from *Physalis angulata* against oral pathogens. 2002. *Nutraceuticals and Food*. 7, 215-218.
28. Maldonado, E., Torres, F. R., Martínez, M., Pérez-Castorena, A. L. 18-Acetoxywithanolides from *Physalis chenopodifolia*. 2004. *Planta medica* 70, 59-74.

29. Su, B. N., Misico, R., Park, E. J., Santarsiero, B. D., A. Q. D., Fong, H. H. S., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. Isolation and characterization of bioactive principles of the leaves and stems of *Physalis philadelphica*. 2002. *Tetrahedron* **58**, 3453-3466.
30. Kennelly, E. J., Gerhäuser, C., Song, L. L., Graham, J. G., Beecher, C. W. W., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. Induction of quinone reductase by withanolides isolated from *Physalis philadelphica* (tomatillos). 1977. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3771-3777.
31. Dinan, L. N., Sarker, S. D., Sik, V. 28-Hydroxywithanolide E from *Physalis peruviana*. 1997. *Phytochemistry* **44**, 509-512.
32. Ahmad, S., Malik, a., Jasmin, R., Ullah, N., Gul, W., Khan, P. M., Nawaz, H. R., Afza, N., Withanolides from *Physalis peruviana*. 1999. *Phytochemistry* **50**, 647-651.
33. Maldonado, E., Cárdenas, J., Bojórquez, H., Escamilla, E. M., Ortega, A. Amarisolide, a neo-clerodane diterpene glycoside from *Salvia amarissima*. 1996. *Phytochemistry* **42**, 1105-1108.
34. Rodríguez-Hahn, L., O'Reilly, R., Esquivel, B., Maldonado, E., Ortega, A., Cárdenas, J., Toscano, R. A. Tilifodiolide, tetraline-type diterpenoid of clerodanic origin from *Salvia tiliaefolia*. 1990. *J. Org. Chem.* **55**, 3522-3525.