

11661



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

MAESTRIA EN MICROBIOLOGIA

**Efecto anti-*Vibrio cholerae* del verbascósido aislado de  
*Buddleja scordioides***

T E S I S  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A  
ANDRES MARTINEZ CORTES

DIRECTOR DE TESIS: JOSE GUILLERMO AVILA ACEVEDO

MEXICO, D.F.

2004



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.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de manera especial a mi mamá Florentina Cortés Camarena por su trabajo y sabiduría.

También con distinción para Llará Gaviria González.

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos los integrantes del laboratorio de Fitoquímica:

José Luis Muñoz López

Gabriel Martínez Cortés

Guillermo Avila Acevedo

Ana María García Bores

Tzasná Hernández Delgado

Margarita Martínez Canales

Por su ayuda esmerada y conveniente.

Ami tutor académico Dr. Jorge Tórtora Pérez por la dirección acertada.

## RESUMEN

Se evaluó la actividad antibacteriana del verbascósido y sus productos de hidrólisis (ácido cafeico y 3,4-dihidroxifeniletanol) contra *Vibrio cholerae*, así como sus modos de acción. Los resultados indicaron que el verbascósido presentó una actividad inhibitoria moderada contra esta bacteria y también inhibió la incorporación de Leucina, debido a esto, el verbascósido probablemente tenga su acción sobre la síntesis de proteínas de *V. cholerae*. Este efecto es específico ya que sólo hubo alteración de una sola vía metabólica general y la curva de supervivencia indicó también especificidad. El compuesto 3,4-dihidroxifeniletanol no presentó actividad antibacteriana, pero sí lo hizo el ácido cafeico, aunque en baja actividad y en menor grado que el verbascósido. El ácido cafeico alteró todas las vías metabólicas a dosis de CBM, es decir, inhibió la incorporación de Leucina, Timidina y Acetato de Sodio en más del 50%, pero afectó la incorporación de Uridina en un sentido positivo (se incorporó más Uridina con relación al control). El ácido cafeico constituye el grupo farmacóforo del verbascósido, puesto que fue la parte más pequeña de la molécula que presentó actividad. La combinación del ácido cafeico y del 3,4-dihidroxifeniletanol presentaron acción sinérgica.

# Indice

<b>Resumen</b> -----	I
<b>1. Introducción</b> -----	1
1.1 Antecedentes -----	2
1.1.1 Microbiología de <i>Vibrio cholerae</i> -----	2
1.1.2 Epidemiología -----	3
1.1.3 Metabolitos secundarios aislados del género <i>Buddleja</i> -----	5
1.1.3.1 Flavonoides -----	6
1.1.3.2 Taninos -----	7
1.1.3.2.1 Astringencia -----	8
1.1.3.2.2 Acción sobre membranas -----	9
1.1.3.2.3 Competencia por metales -----	9
1.1.3.3 Lactonas sesquiterpénicas -----	10
1.1.3.4 Fenilpropanoides -----	11
1.1.3.5 Aceites esenciales -----	12
1.1.3.6 Acidos débiles -----	12
1.1.3.7 Verbascósido -----	12
1.1.4 <i>Buddleja scordioides</i> -----	14
1.1.4.1 Descripción botánica -----	14
1.1.4.2 Distribución geográfica -----	15
1.1.4.3 Usos de la planta -----	15
1.2 Justificación -----	17
<b>2. Hipótesis</b> -----	18
<b>3. Objetivos</b> -----	19
<b>4. Material y métodos</b> -----	20
4.1 Evaluación de la actividad antibacteriana -----	20
4.1.1 Microorganismos utilizados -----	20
4.1.2 Reactivos utilizados -----	20
4.1.3 Evaluación cualitativa -----	21

4.1.4 Evaluación cuantitativa	21
4.1.5 Determinación del número de sobrevivientes	21
4.2 Modo de acción	22
4.2.1 Incorporación de precursores radioactivos	22
4.3 Hidrólisis del verbascósido	22
4.4 Estrategia general de la investigación	23
<b>5. Resultados y discusión</b>	<b>24</b>
5.1 Actividad antibacteriana del verbascósido sobre <i>V. cholerae</i>	24
5.2 Concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima del verbascósido sobre <i>V. cholerae</i>	25
5.3 Curva de supervivencia de <i>V. cholerae</i> expuesta al verbascósido	27
5.4 Modo de acción del verbascósido	29
5.5 Hidrólisis del verbascósido	31
5.6 Actividad antibacteriana del ácido cafeico	32
5.7 Concentración inhibitoria mínima y bactericida mínima del ácido cafeico	33
5.8 Curva de supervivencia de <i>V. cholerae</i> expuesta al ácido cafeico	34
5.9 Modo de acción del ácido cafeico	37
5.10 Acción sinérgica del ácido cafeico y del 3,4-dihidroxifeniletanol	40
<b>6. Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>7. Anexos</b>	<b>43</b>
7.1 Anexo A. Algunos compuestos de plantas y bacterias susceptibles	43
A-1. Actividad antibacteriana de algunos terpenos	43
A-2. Actividad antibacteriana de flavonoides	44
A-3. Actividad antibacteriana de quinonas	44
A-4. Actividad antibacteriana de glucósidos	45
A-5. Actividad antibacteriana de lignanos	45
A-6. Actividad antibacteriana de pterocarpanos	45
A-7. Actividad antibacteriana de taninos	45
7.2 Anexo B. Material y Métodos	46
B-1. Método de difusión en agar (Kirby-Bauer)	46
B-2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)	48

B-3. Determinación de la concentración bactericida mínima (CBM) _____	49
B-4. Curva de supervivencia (efecto sobre el crecimiento) _____	50
B-5. Modo de acción del verbascósido y del ácido cafeico _____	51
B-6. Incorporación de precursores radioactivos _____	52
B-7. Hidrólisis ácida e identificación de metabolitos _____	53
B-8. Espectros de resonancia magnética nuclear _____	54
B-8.1. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del verbascósido _____	54
B-8.2. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del ácido cafeico _____	55
B-8.3. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del 3,4-dihidroxifeniletanol _____	55
7.3 Anexo C. CIM de algunos agentes quimioterapéuticos _____	56
C-1. CIM de algunas penicilinas (µg/ml) _____	56
C-2. CIM de algunas cefalosporinas (µg/ml) _____	57
C-3. CIM de aminoglucósidos (µg/ml) _____	58
C-4. CIM de tetraciclinas (µg/ml) _____	59
C-5. Rangos de CIM de cloranfenicol (µg/ml) _____	60
C-6. CIM de clindamicina y eritromicina (µg/ml) _____	61
C-7. CIM de rifampina (µg/ml) _____	62
C-8. CIM de sulfonamidas y trimetoprim (µg/ml) _____	63
<b>8. Referencias</b> _____	<b>64</b>



# **Efecto anti-*Vibrio cholerae* del verbascósido aislado de *Buddleja scordioides***

## **1. Introducción.**

Los principios activos de las plantas (metabolitos secundarios) se han investigado desde el siglo XIX, principalmente desde el punto de vista fitoquímico y quimiotaxonómico. En 1945, dicho enfoque se dirigió hacia la investigación de la química farmacéutica de síntesis y la fermentación microbiana. Sin embargo, durante los años noventa, el interés por los antibacterianos de origen natural se incrementó notablemente y la razón principal de este nuevo auge ha sido la demanda creciente por los tratamientos con productos vegetales (Hamburger y Hostettmann, 1991), así como la necesidad de descubrir antimicrobianos nuevos (Baquero y Blazquez, 1997; Chopra *et al.*, 1997; Eloff, 1998; Chopra, 1998; Levy, 1995, 1998), ya que existen reportes donde se señala la aparición de variedades resistentes a los antibióticos utilizados comúnmente y además que muchos microorganismos patógenos del humano están sufriendo variaciones genéticas con gran rapidez haciendo más eficientes sus mecanismos de patogenicidad frente a las defensas del hospedador (Chu *et al.*, 1996; Cowan, 1999).

El reino vegetal, como fuente de sustancias nuevas, no se ha explorado suficientemente, por ejemplo, de entre las especies de plantas estimadas (250 000–500 000), sólo se ha investigado una pequeña proporción y la fracción sometida a una evaluación biológica o farmacológica es aún pequeña (Evans, 1991; Borris, 1996; Verpoorte, 1998; Harvey, 2000). Parte de los estudios de la actividad biológica de los vegetales se refiere al estudio de

sustancias con actividad antibacteriana (Eisenberg *et al.*, 1993; Cowan, 1999). Existen muchos ejemplos de plantas que se han estudiado recientemente y de las cuales se han determinado las estructuras químicas de los compuestos responsables de la actividad antibacteriana contra bacterias gram-positivas y gram-negativas (algunos ejemplos de ellos se presentan en el Anexo A, clasificados por el grupo químico, el origen del compuesto y las bacterias susceptibles). Sin embargo, estas plantas siguen siendo consideradas como “no investigadas” respecto a cualquier otra actividad farmacológica, ya que las plantas contienen cientos o miles de metabolitos secundarios (Suffnes y Douros, 1981; Cassady *et al.*, 1990).

## 1. 1 Antecedentes.

### 1.1.1 Microbiología de *Vibrio cholerae*.

*Vibrio cholerae* es un bacilo gram-negativo, curvo y móvil; presenta un flagelo polar, y es capaz de crecer en condiciones aerobias y anaerobias (Madigan *et al.*, 1997; Raufman, 1998). No forma endosporas ni microquistes y posee cápsula. La temperatura óptima para su desarrollo es de 37°C en medios de cultivo alcalinos (pH de 7.6 a 9.0) (Murray, *et al.*, 1997). Es una especie bien definida (Sánchez y Taylor, 1997), se han encontrado 139 serogrupos a los que se les ha determinado la composición del principal antígeno de superficie de la pared celular (antígeno O), pero sólo dos de ellos, el O1 y el O139 están asociados con epidemias. Estos dos serogrupos producen la toxina del cólera (Kaper, *et al.*, 1995; Swerdlow y Rics, 1993). El serogrupo O1 se subdivide en tres serotipos llamados Ogawa, Inaba, e Hikojima, los cuales se diferencian cuantitativamente por los factores A,

B, y C del antígeno O (Lacey, 1995; Sack, *et al.*, 1996). Las cepas de *Vibrio cholerae* O1 también se subdividen en dos biotipos: clásico y El Tor (Mc Laughlin, 1995). Sánchez y Taylor, en 1997 y Faruque *et al.*, en 1998 reportaron que el agente causal de la tercera pandemia (1852-1859) a la sexta (1899-1923) fue el biotipo clásico. La séptima pandemia, la cual se originó en Sulawesi, Indonesia, en 1961, fue causada por la cepa El Tor (Lacey, 1995). En América Latina, incluyendo México, los brotes han sido producidos exclusivamente por El Tor Inaba; aunque se ha reportado que el biotipo El Tor Ogawa ha reemplazado al serotipo El Tor Inaba después del primer año del brote (Sack, *et al.*, 1996; Mitra, *et al.*, 1996). En México y en América Latina no se han identificado cepas del tipo clásico ni O139 (Sánchez y Taylor, 1997).

### 1.1.2 Epidemiología.

En México, el cólera llegó siguiendo las rutas comerciales de Asia a Europa y de Europa a Estados Unidos de América (Bustamante, 1992; Wachsmuth, *et al.*, 1994). Apareció por primera vez en 1833 por dos rutas: Nueva Orleans-La Habana-península de Yucatán y Nueva Orleans-Texas-Coahuila y Tamaulipas, extendiéndose después a todo el país. En ese año, los movimientos políticos y bélicos, provocaron la muerte de 2 000 hombres afectados por el cólera en Querétaro. Durante esa época, en la ciudad de México, murieron 14 000 personas. En 1850 ocurrieron 200 000 defunciones. En el Distrito Federal se notificaron 9619 muertos por cólera. No se sabe en qué fecha desapareció el cólera en el continente americano, pero se sospecha que pudo haber sido en 1880 (González y Saltigeral, 1992; Kumate *et al.*, 1993). En 1991, el cólera surgió nuevamente en América. En México, el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE) (1991) notificó oficialmente el primer caso el 17 de junio de 1991 y además confirmó en todos los casos

que el agente infeccioso causante de la enfermedad fue *Vibrio cholerae* O1, Inaba, biotipo El Tor. En la Tabla 1 se muestran números de casos, incidencia, así como los grupos de edad más afectados en el año del brote.

**Tabla 1. Casos reportados e incidencia de cólera por edad y sexo, México, 1991.**

Grupos por edad	Hombres		Mujeres		Total	
	No.de casos	Incidencia <sup>a</sup>	No.de casos	Incidencia	No.de casos	Incidencia
0-4	131	2.4	93	1.8	224	2.1
5-14	200	1.6	149	1.3	350	1.5
15-24	259	2.8	198	2.2	457	2.5
25-44	492	4.8	368	3.6	860	4.2
45-64	292	6.8	227	4.9	519	5.8
> 65	138	1.0	104	5.1	242	7.1
Total	1533	3.5	1157	2.6	2690	3.1

<sup>a</sup> Por cada 100 000 habitantes. Fuente: Organización Panamericana de Salud. Organización Mundial de la Salud (1992).

En la Tabla 2 se muestran las cifras del número total de casos y número de defunciones por año desde el inicio del brote hasta el año 2001

**Tabla 2. Número de casos y defunciones de cólera en México de 1991 a 2001**

Año.	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Casos.	2690	8162	10,712	4059	16,430	1088	2356	71	9	5	1
Defun- ciones.	34	99	193	56	137	5	18	-	-	-	-

Fuente: Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Fuente: SSA (2002).

La transmisión de la enfermedad se realiza en un ciclo hombre-ambiente-hombre. La fuente de infección es el agua o los alimentos contaminados y, en menor grado las manos sucias o las moscas (González y Saltigeral, 1992). Las cepas O1 toxigénicas sobreviven varios días

en el agua, en especial si contiene materia orgánica. La diseminación de la enfermedad se favorece por las condiciones deficientes de saneamiento básico (Secretaría de Salud, 1991; Faruque *et al.*, 1998). Se ha observado que los antibióticos acortan el periodo de transmisibilidad, ya que muchos pacientes eliminan la bacteria pocos días después de recibir tratamiento con antibióticos, pero, sin éste, la eliminación se prolonga de una a dos semanas (González y Saltigeral, 1992; Joklik, *et al.*, 1992).

### 1.1.3 Metabolitos secundarios aislados del género *Buddleja*.

Los estudios fitoquímicos que se han realizado con especies de este género han demostrado la presencia de gran variedad de compuestos, como los que se observan en la Tabla 3.

**Tabla 3. Compuestos aislados del género *Buddleja*.**

<b>Tipo de compuesto</b>	<b>Referencia</b>
<b>Esteroles:</b> β-sitosterol, condilasterol, estigmasterol.	Chawla, <i>et al.</i> , 1989; Houghton, 1984
<b>Flavonoides:</b> Linarina, kaemferol, quercetina, luteolina.	Marin <i>et al.</i> , 1977
<b>Triterpenos:</b> β-amirina, acetato de β-amirina	López <i>et al.</i> , 1979
<b>Sesquiterpenos tipo cariofileno:</b> Buddleína A, B, C, y D Dihidroxibuddleína A, buddledona A y B	Yoshida, 1978 (1 y 2) Liao, 1999
<b>Diterpenos:</b> Buddlejona y desoxibuddlejona	Houghton <i>et al.</i> , 1996; Mensah <i>et al.</i> , 2000
<b>Iridoides:</b> aucubina, catalpol, biridósido, y acetil glucósidos de iridoideas	Houghton, 1985; Mansoor <i>et al.</i> , 1992; Miyase <i>et al.</i> , 1991
<b>Saponinas:</b> mimengósidos A y B, buddlejasaponinas	Yamamoto <i>et al.</i> , 1991; Ding <i>et al.</i> , 1992; Avila y Romo de Vivar, 2002.
<b>Fenilpropanoides:</b> ácidos cafeico, ferúlico, p-cumárico, verbascósido, martinósido	Houghton, 1985.
<b>Alcaloides:</b> buddamina (I)	Roeder <i>et al.</i> , 1985

Estas investigaciones están hechas en relación con la identificación de compuestos con algún tipo de actividad biológica (Asakawa, 1990; Trace, 1993). Sin embargo, pocos compuestos han sido objeto de estudios más profundos que expliquen la manera de su interacción con los sistemas vivos. Se han reportado algunos estudios en relación con los metabolitos secundarios de plantas a los que se les ha determinado el modo de acción antibacteriana, entre ellos se encuentran los flavonoides, los taninos, las lactonas sesquiterpénicas, los aceites esenciales, y los ácidos débiles, los cuales se describen en los párrafos siguientes .

#### 1.1.3.1 Flavonoides.

Los flavonoides son compuestos fenólicos que tienen un núcleo heterocíclico de 15 átomos de carbono. Derivan principalmente del esqueleto reducido flavano, que es el 7,4'-dihidroxi-8-metilflavano (Figura 1). Este compuesto en particular, presenta actividad fungitóxica contra *Botrytis cinerea* y contra sus esporas germinadas en cultivo líquido ( $DE_{50}$   $32 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Además, presenta actividad antimicrobiana contra patógenos de plantas como *Corynebacterium betae* y *C. fascinas* (Harborne y Baxter, 1993).

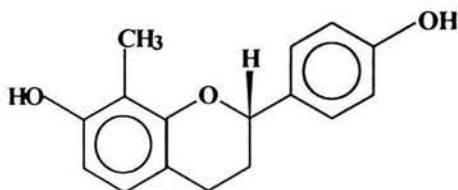
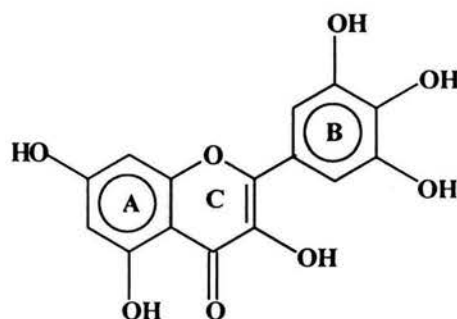


Figura 1. 7, 4'- Dihidroxi-8-metilflavano

Muchos otros compuestos flavonoides tienen actividad antimicrobiana y están caracterizados como fitoalexinas, por ejemplo, la betagarina y la broussina. Se ha reportado que las catequinas y la silibina presentan propiedades antiinflamatoria y antihepatotóxica (Harborne y Baxter, 1993).

La actividad deletérea de las flavonas sobre las bacterias se debe a que estos compuestos inhiben la síntesis de DNA o RNA bacteriano puesto que se intercalan con las bases de la doble hélice, pues tienen una estructura planar similar a las bases púricas y pirimídicas; además de formar puentes de hidrógeno con ellas. En este caso, las flavonas que han mostrado mayor inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos son aquellas que presentan tres grupos OH en el anillo B (por ejemplo, en el colorante miricetina) (Figura 2) (Mori *et al.*, 1987).

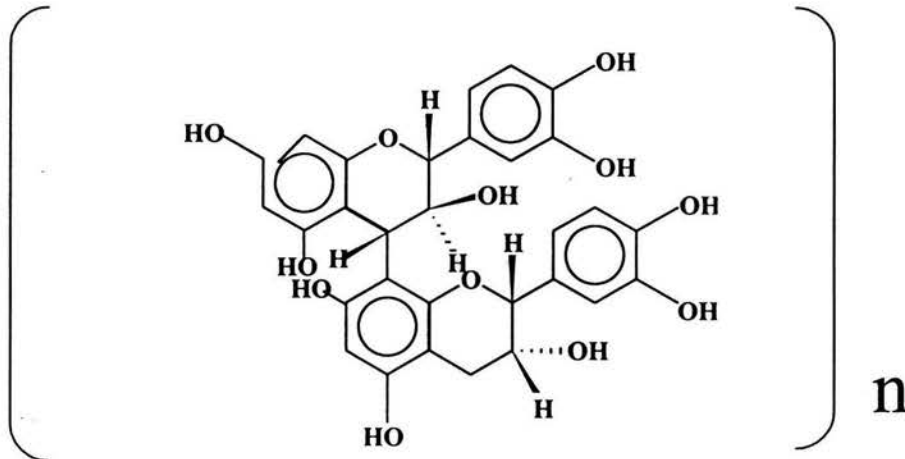


**Figura 2. Miricetina: 3, 5, 7, 3', 4', 5'-Hexahidroxi flavona**

#### 1.1.3.2 Taninos.

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles que tienen un peso molecular comprendido entre 500 y 3000 Da, que presentan, junto a las reacciones clásicas de los fenoles, la propiedad de precipitar alcaloides y proteínas. Existen dos tipos: los taninos condensados, como la procianidina B4, y los taninos hidrolizables, como la agrimonina. Esta última y otros taninos hidrolizables tienen actividad antiviral y antitumoral. Los

taninos condensados se han usado en la medicina para sanar heridas y quemaduras (Aguilar *et al.*, 1994). En la figura 3 se muestra un ejemplo de un tanino condensado.



**Figura 3. Procianidina B4**

En general, la acción inhibitoria de estos compuestos sobre el crecimiento bacteriano, se debe a los siguientes efectos: astringencia, acción sobre la membrana plasmática, y competencia por metales.

#### 1.1.3.2.1 Astringencia.

El carácter astringente (que constriñe o precipita) de los taninos, se debe a su capacidad de producir complejos insolubles con enzimas que las bacterias requieren para su crecimiento normal. Se ha observado que muchas enzimas microbianas han sido inhibidas en cultivos libres de células o bien en ensayos con enzimas purificadas cuando se mezclan con taninos. Las enzimas en las cuales se ha visto este efecto son las peroxidasas y las



glucosiltransferasas. Los taninos también pueden afectar directamente el metabolismo de los microorganismos como lo sugiere el cambio de morfología de *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* y *Celluvibrio fulvus* que a bajas concentraciones de taninos adquieren formas filamentosas o cadenas, mientras que las células en condiciones normales crecen de manera individual (Scalbert, 1991).

#### 1.1.3.2.2 Acción sobre membranas.

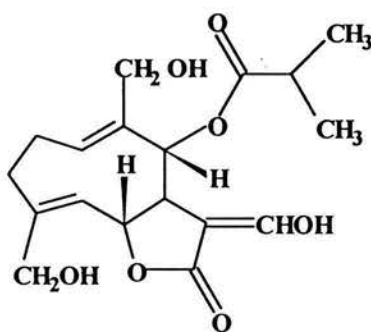
Konishi *et al.*, (1987) demostraron que el ácido tánico en una concentración de 50 mg/L inhibe el transporte electrónico membranal de *Photobacterium phosphoreum*. La acción de los taninos en las bacterias puede ser similar a la observada en los fenoles sintéticos (como el O-difenilfenol y el hidroxidifenilalcano), compuestos que han sido muy usados como desinfectantes.

#### 1.1.3.2.3. Competencia por metales.

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 *Escherichia 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 y cúpricos. La naturaleza multicatecólica de los taninos permite la reticulación y con esto la formación de un precipitado metal-tanino que hace inaccesible a los iones metálicos para el consumo bacteriano (Scalbert, 1991).

### 1.1.3.3 Lactonas sesquiterpénicas

Las lactonas sesquiterpénicas son una clase de compuestos naturales que se distinguen de otros grupos químicos por la presencia de un sistema  $\gamma$ -lactona. Muchas tienen actividad antitumoral; algunas son muy tóxicas en mamíferos (ej. Geigerina); mientras que otras son responsables de la dermatitis por contacto en humanos (ej. Partenina). La siguiente estructura representa un ejemplo de lactona sesquiterpénica.



**Figura 4. Alatólido**

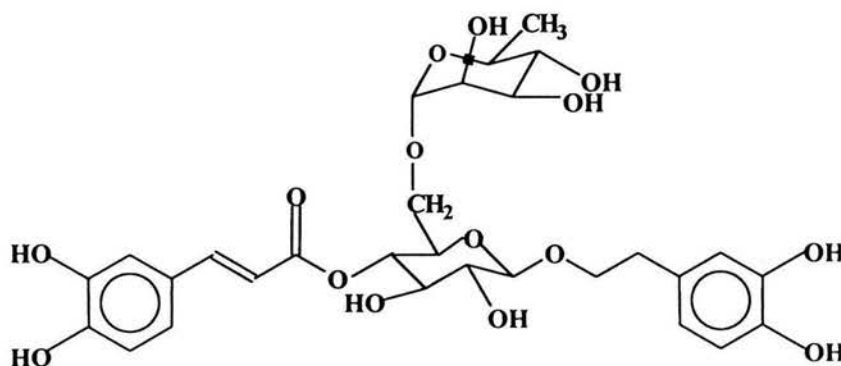
Este compuesto tiene un PM de 350.42, fórmula de  $C_{19}H_{26}O_6$  y su esqueleto tipo es el germacranólido; se aisló de *Jurinea alata* (Compositae) y presenta actividad citotóxica y antitumoral (Harborne y Baxter, 1993).

Las lactonas que poseen actividad antibacteriana son las que presentan un metileno hexocíclico conjugado con el carbonilo de la lactona. La actividad aumenta si tienen cetona  $\alpha, \beta$  insaturada. Estos grupos representan sitios receptores reactivos para nucleófilos biológicos, en particular los grupos tiol y los grupos amino esenciales para algunas funciones enzimáticas. 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 estos compuestos (Fischer, 1991).

### 1.1.3.4 Fenilpropanoides

Los fenilpropanoides son otro grupo de compuestos que presentan actividades diversas. Tienen un anillo aromático unido a una cadena lateral de tres carbonos. Son los compuestos fenólicos más simples derivados del ácido shikímico y generalmente se relacionan con los ácidos cinámicos. Existen libres o combinados (como ésteres, amidas, o glucósidos). La parte fenilpropanoide puede ciclizarse (cumarinas), dimerizarse (lignanós), polimerizarse (ligninas), o experimentar alargamiento de la cadena lateral (estilbenos y flavonoides).

Los ésteres glucosídicos fenilpropanoides tienen algunas acciones farmacológicas interesantes, por ejemplo, el forsitiácido y el plantamajósido inhiben la cAMP fosfodiesterasa (Nishibe *et al.*, 1982).



**Figura 5. Forsitiácido**

Varios compuestos de esta serie tienen propiedades antibacterianas y antifúngicas, particularmente contra organismos fitopatógenos. Los compuestos fenilpropanoides se reconocen en parte por su papel general como agentes antimicrobianos. (Andary *et al.*, 1980; Cooper *et al.*, 1980).

#### 1.1.3.5 Aceites esenciales

Algunos monoterpenos y compuestos fenólicos de bajo peso molecular presentes en los aceites esenciales de las plantas poseen una actividad antimicrobiana inespecífica puesto que tienen la capacidad de disolver a las membranas celulares, con esto, se produce un efecto similar al de la lisis bacteriana provocada por enzimas líticas (lisozima) o por tratamiento con disolventes orgánicos (Harvey, 1982). Helander *et al.*, (1998) demostraron que las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium* al ser sometidas a dosis bajas de carvacrol y de timol aumentaban la concentración de ATP y de glucosa-6-fosfato extracelular, debido a esto, se evidenció el efecto lítico de estos compuestos sobre la membrana celular bacteriana.

#### 1.1.3.6 Ácidos débiles.

Algunos ácidos débiles como el ácido vainillínico, el ácido benzoico y el ácido ferúlico inhiben el crecimiento de microorganismos por inhibición de reacciones químicas en la cadena respiratoria, disminución del pH intracelular y por alteración de la función de las macromoléculas (Brul y Coote, 1999).

#### 1.1.3.7 Verbascósido

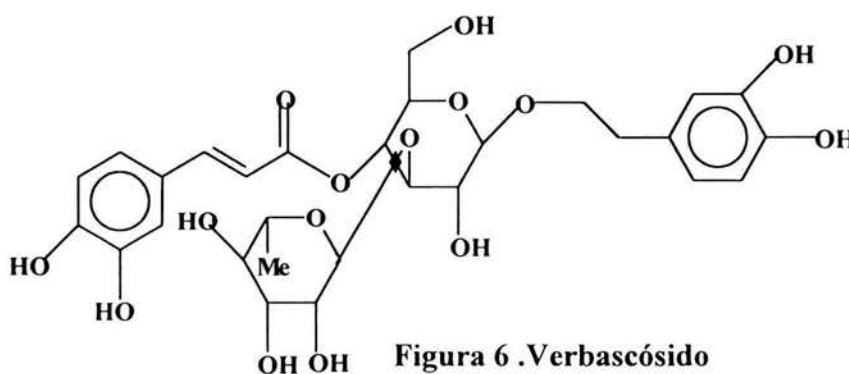
Este compuesto  $C_{29}H_{36}O_{15}$ , con peso molecular de 624.61 (Figura 6) se ha encontrado en las hojas de *Buddleja globosa*, *B. officinalis* y en los frutos de *Forsythia suspensa* (Oleaceae), en *Verbascum sinuatum* (Scrophulariaceae), y en miembros de Orobanchaceae, Gesneriaceae, Acanthaceae, Bignoniaceae, Verbenaceae, y Plantaginaceae (Harborne y Baxter, 1993). Es un metabolito secundario del tipo fenilpropanoide, se caracteriza por tener una parte cafeoil y una hidroxifeniletanol unidas a una  $\beta$ -glucosa (Figura 6). La parte

fenilpropanoide deriva de la fenilalanina o del ácido cinámico y el fragmento hidroxifeniletanol, se forma a partir de la tirosina y aún más efectivamente de la tiramina (Ibrahim y Barrón, 1989). Dentro del metabolismo de la planta deriva del ácido shikímico, que a su vez, proviene de la vía de las pentosas.

La estructura de este compuesto se identificó por medio de estudios espectroscópicos y mediante la comparación de sus propiedades fisicoquímicas con las de una muestra original. Así se determinó el compuesto con el nombre químico de [3,4-dihidroxi - $\beta$ -feniletil O - $\alpha$ - L- ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 3) - $\beta$ -D-(4-O-cafeoil) glucopiranososa] (Molgaard y Ravn, 1988; Harborne, 1989).

El verbascósido es soluble en metanol (MeOH), en metanol-agua en una proporción 1:1, en dimetilsulfóxido (DMSO), y es parcialmente soluble en agua.

Varios autores han reportado que inhibe la aldosa reductasa del cristalino (Lewis y Yamamoto, 1990; Harborne y Baxter, 1993) y que inhibe el crecimiento de algunas bacterias gram-positivas (Avila *et al.*, 1999).



#### 1.1.4 *Buddleja scordioides*.

##### 1.1.4.1 Descripción botánica.

*Buddleja scordioides* H.B.K.(número de identificación en el Herbario Izta, 26140) (Figura 7) es un arbusto de 30 cm a 1 m de alto, es muy ramoso y los tallos son de consistencia leñosa, sus hojas son sésiles y de margen crenado, pequeñas, de 0.25-0.8 m de largo y de 0.1-0.3 m de ancho y con venación muy conspicua en el envés. Presenta inflorescencia terminal con varios pares de cimas capitadas, colocadas en axilas foliares, con cabezuelas sésiles. (Rzedowsky y Rzedowsky, 1985).



**Figura 7** *Buddleja scordioides*, ejemplar de herbario.

#### 1.1.4.2 Distribución geográfica.

En México existen 15 especies de *Buddleja*, las cuales se distribuyen en todo el territorio nacional (Norman, 1967; Rzedowsky y Rzedowsky, 1985).

*Buddleja scordioides* habita en el centro y norte del país (Figura 8) (particularmente en las zonas áridas), extendiéndose hasta Texas y Arizona en los Estados Unidos de Norteamérica.



**Figura 8. Distribución geográfica de *Buddleja scordioides***

#### 1.1.4.3. Usos de la planta.

Esta planta se utiliza contra padecimientos del tracto digestivo (el cocimiento de sus hojas se utiliza contra la “indigestión” y diarreas infecciosas) (Rzedowsky y Rzedowsky, 1985).

Por otro lado, no se encontró ningún estudio químico ni biológico relacionado con esta especie después de realizar una revisión bibliográfica cuidadosa.

*Buddleja scordioides* es popularmente conocida como “escobilla”. Se sabe que el cocimiento de sus hojas se utiliza para el tratamiento de la “indigestión” (Rzedowsky y Rzedowsky, 1985). De acuerdo a este uso que se le da a esta planta en la medicina tradicional, es probable que el verbascósido sea hidrolizado en el tracto digestivo después de tomar una infusión preparada a partir de sus hojas.

Esto puede tener importancia ya que, al hidrolizarse el verbascósido dentro del tracto digestivo, los productos de hidrólisis pudieran ser los responsables de presentar un efecto antibacteriano y además que estos productos tuviesen una acción sinérgica. Por esta razón se llevó a cabo la hidrólisis del verbascósido y también se realizó la búsqueda de algún compuesto que conservara la actividad, esto es, que fuese un farmacóforo (Cory, 1996).

Como parte de las investigaciones de las plantas medicinales llevadas a cabo en México (Avila, *et al.*, 1993), se han realizado investigaciones para determinar qué tipo de metabolitos secundarios de las plantas presentan actividad inhibitoria del crecimiento de bacterias patógenas intestinales (INI, 1994; Lozoya, 1987).

A partir de *B. scordioides* se aisló el verbascósido y se decidió determinar la actividad de este compuesto sobre *Vibrio cholerae*, además de evaluar el modo de acción de esta sustancia.

La actividad antibacteriana del verbascósido se ha reportado en la literatura, pero no se ha descrito el efecto sobre *Vibrio cholerae* (Pardo *et al.*, 1993; Didry *et al.*, 1999; Avila *et al.*, 1999).

El propósito de este trabajo fue evaluar la acción de esos metabolitos con actividad antibacteriana.



## 1.2 Justificación.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, existe la necesidad de estudios más detallados que expliquen la acción antibacteriana de los compuestos nuevos obtenidos de las plantas.

Los ésteres glucósidos fenilpropanoides han mostrado diversas propiedades farmacológicas, una de ellas es la actividad antibacteriana.

Es importante investigar el modo de acción de compuestos que dañen la viabilidad de las bacterias ya que algunos de ellos podrían afectar a estos microorganismos mediante mecanismos diferentes a los que presentan los antibióticos y agentes quimioterapéuticos conocidos, y por lo tanto, constituirse en una posibilidad para desarrollar nuevos antibióticos (Chopra, 1998; Hancock y Strohl, 2001).

Por otro lado, existen reportes donde se señala que existe un incremento de las cepas resistentes a los antibióticos comunes y además que muchos microorganismos patógenos al humano están sufriendo variaciones genéticas con gran rapidez haciendo más eficientes sus mecanismos de patogenicidad frente al organismo hospedador (Chu *et al.*, 1996; Martin, 1998; Karaolis *et al.*, 1998; Karlin, 2001), inclusive a *V. cholerae* se le ha considerado como un problema reincidente debido a variaciones genéticas de cepas no patógenas (Joklik *et al.*, 1992) y a la presencia de cepas multirresistentes a los antibióticos (Levy, 1995).

## 2. Hipótesis.

**Hipótesis 1.** En general, se sabe que los compuestos fenilpropanoides presentan actividad antibacteriana. El verbascósido, que es un compuesto de este tipo, probablemente tenga actividad antibacteriana contra *Vibrio cholerae*.

**Hipótesis 2.** Si el verbascósido intacto es activo, es probable que los productos de su hidrólisis también presenten actividad.

### 3. Objetivos

#### **Objetivo general del proyecto.**

Evaluar la actividad antibacteriana del verbascósido sobre *Vibrio cholerae*.

#### **Objetivos particulares**

- a) Determinar los parámetros antibacterianos del verbascósido como son la prueba de susceptibilidad antibacteriana (Kirby-Bauer), la concentración inhibitoria mínima (CIM), la concentración bactericida mínima (CBM) y la curva de supervivencia.
  
- b) Determinar el modo de acción del verbascósido mediante la aplicación de la técnica de incorporación de precursores radiactivos.
  
- c) Determinar si los productos de hidrólisis del verbascósido presentan actividad biológica.

## 4. Material y Métodos.

### 4.1 Evaluación de la actividad antibacteriana.

Los métodos que aquí se exponen se pueden consultar con mayor detalle en el Anexo B.

#### 4.1.1 Microorganismos utilizados.

*Vibrio cholerae* CDC V12, *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislada de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico (estas cepas corresponden al grupo O1, serotipo Inaba, biotipo El Tor), y *Vibrio cholerae* no-O1.

#### 4.1.2 Reactivos utilizados.

Verbascósido: obtenido de la planta *B. scordioides* e identificado por medio de métodos espectroscópicos.

Acido cafeico: obtenido por hidrólisis ácida a partir del verbascósido; identificado por medios espectroscópicos y comparado con una muestra original.

3,4-dihidroxifeniletanol: obtenido por hidrólisis ácida a partir del verbascósido; identificado mediante su patrón de corrimiento cromatográfico comparado con el de una muestra original.

Acetato de sodio [ $^3\text{H}$ ] (ICN 2200405), Leucina [ $^3\text{H}$ ] (Amersham TRK 683), Timidina [ $^3\text{H}$ ] (Amersham TRK 758), y Uridina [ $^3\text{H}$ ] (Amersham TRK 410).

#### 4.1.3 Evaluación cualitativa.

El método que se utilizó para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana del verbascósido y de los productos de hidrólisis (ácido cafeico y 3,4-dihidroxifeniletanol), fue el método de difusión en agar (Kirby-Bauer), (Barry y Thornsberry, 1987; Vanden Berghe y Vlietnick, 1991). Este método se expone en el anexo B.1. Cada experimento se realizó por triplicado.

#### 4.1.4 Evaluación cuantitativa.

La evaluación cuantitativa se llevó a cabo utilizando los métodos de dilución en caldo como son: la concentración inhibitoria mínima (CIM) y bactericida mínima (CBM) (Jones *et al.*, 1987; Finegold y Jo Baron, 1989) (Anexo B-2 y B-3).

#### 4.1.5 Determinación del número de sobrevivientes.

Se determinó la curva de supervivencia de las bacterias expuestas al verbascósido y al ácido cafeico y el efecto sobre el crecimiento de *Vibrio cholerae* de acuerdo a los métodos descritos por Kubo (1993) y Shoenknecht *et al.* (1987) (Anexo B-4). En este bioensayo se utilizaron las dosis obtenidas experimentalmente como son CIM,  $\frac{1}{2}$  CIM, y CBM. El inóculo fue de  $3 \times 10^7$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro en condiciones aeróbicas (sin presión de CO<sub>2</sub>) e incubación a 37°C. Se tomaron muestras cada cuatro horas hasta las 24 horas. El número de células viables se determinó mediante la técnica de diluciones seriadas.

## 4.2 Modo de Acción.

### 4.2.1 Incorporación de precursores radioactivos.

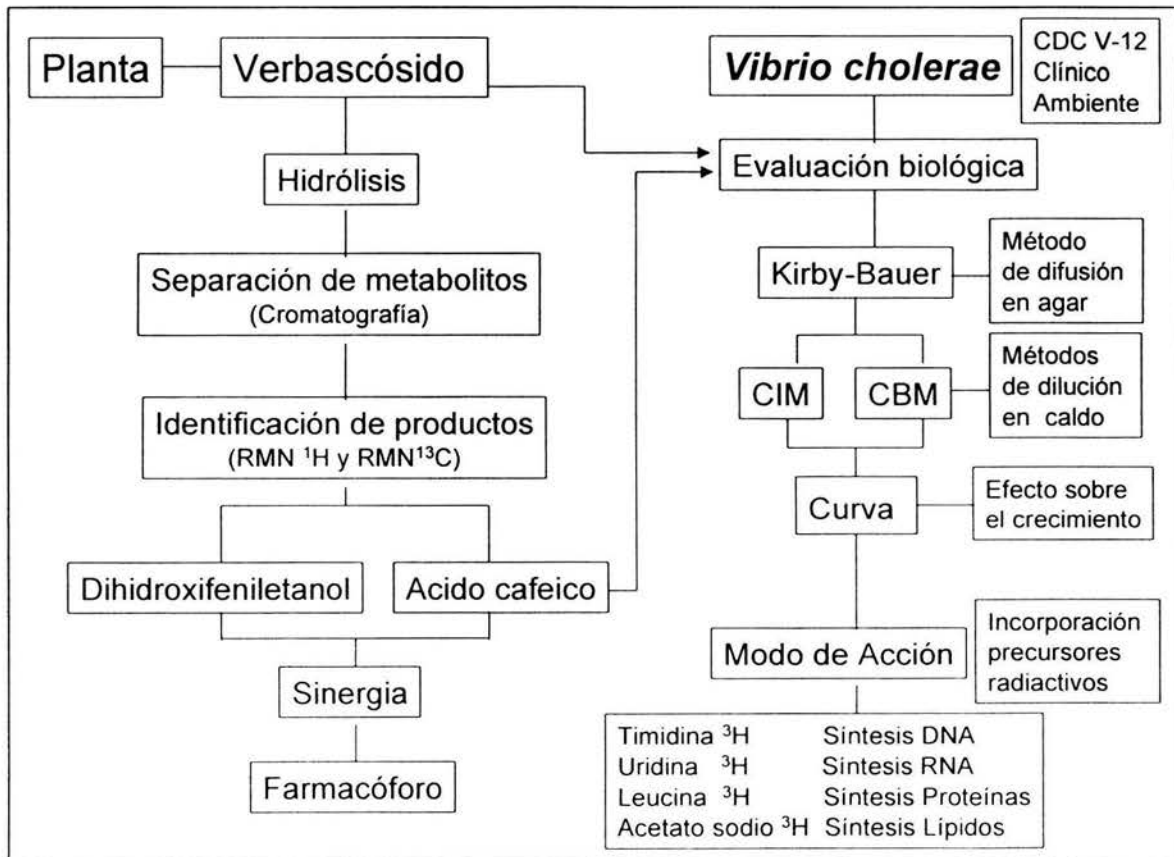
El modo de acción del verbascósido y del ácido cafeico se llevó a cabo mediante la evaluación de la incorporación de precursores radioactivos (Anhalt *et al.*, 1985; Mori *et al.*, 1987) (Anexo B-5 y B-6). Se prepararon cultivos bacterianos (10 ml), y después de alcanzar la fase exponencial (0.2 de absorbancia a 550 nm) se diluyeron 10 veces. Se prepararon 5 unidades de bioensayo (3 experimentales y 2 controles). A las unidades experimentales se agregaron las dosis de CIM,  $\frac{1}{2}$  CIM y CBM. Los precursores radioactivos se agregaron a una concentración de 0.1  $\mu\text{Ci/ml}$ . Los tubos se incubaron a 37°C y se tomaron alícuotas de 1 ml a la 1.0, 1.5 y 2.0 horas. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante (1.0 ml) se resuspendió con el líquido de centelleo (9.0 ml) (Ready Organic TM Beckman). La radiactividad se determinó utilizando un contador de centelleo (Beckman LS000SE). Las muestras se leyeron automáticamente durante un minuto. El porcentaje de precursor incorporado a la bacteria se calculó por la proporción de la cantidad remanente de radiactividad en cada tiempo. Se realizaron cinco réplicas de cada precursor marcado (Mori *et al.*, 1987).

### 4.3 Hidrólisis del verbascósido.

Finalmente, la hidrólisis ácida del compuesto activo se realizó de acuerdo con los métodos descritos por Vollhardt y Schore (1999) y Solomons y Fryhle (2000) (Anexo B-6).

Esta metodología se puede apreciar mejor en el esquema 4.4, en donde se observa que la actividad biológica del verbascósido se evaluó de manera cualitativa con el método de Kirby-Bauer y de manera cuantitativa con las determinaciones de CIM y CBM, así como el efecto de supervivencia a dosis de CIM y CBM con relación al tiempo, finalmente, se evaluó el modo de acción. Por otro lado, se realizó la hidrólisis del verbascósido. La separación de los productos de hidrólisis se llevó a cabo mediante cromatografía y la identificación de los mismos, mediante técnicas de espectroscopía. Los productos de la hidrólisis, el ácido cafeico y el 3,4-dihidroxifeniletanol, se sometieron a las mismas pruebas mencionadas para el verbascósido para determinar su actividad biológica.

#### 4.4 Estrategia general de la investigación.



## 5. Resultados y Discusión.

### 5.1 Actividad antibacteriana del verbascósido sobre *V. cholerae*.

La actividad antibacteriana del verbascósido se evaluó mediante la técnica de difusión en agar (Kirby-Bauer) sobre *V. cholerae*. Los resultados experimentales de esta prueba se muestran en la Tabla 5.1 en donde se observa la susceptibilidad de esta bacteria frente a este compuesto. Al comparar la actividad del verbascósido con la de la kanamicina, se puede apreciar que este compuesto tiene menor actividad antibacteriana (se presenta un halo de inhibición más pequeño). Se debe considerar que en las pruebas *in vitro* el grado de difusión del compuesto sobre el agar depende del grado de solubilidad en agua. En este caso, el compuesto activo es menos soluble que la kanamicina en medio acuoso, y esto podría explicar una actividad más baja (Vanden Berghe y Vlietnick 1991). Kelly y Post, (1991) afirman que el diámetro grande del halo de inhibición no indica necesariamente la efectividad de un compuesto activo bajo investigación *in vitro*. El diámetro del halo también depende de la susceptibilidad de la bacteria (resistencia natural) frente a un determinado compuesto. La utilidad de esta prueba, es que proporciona información que permite la elección de un determinado antibiótico. Se ha reconocido que el método de difusión en disco es generalmente impreciso porque el antibiótico inhibe o mata bacterias a una distancia variable alrededor del disco (Utrecht y Walmsley, 1998). Estos y otros autores coinciden en que la interpretación de estos resultados se deben confirmar con otros estudios utilizando pruebas de dilución en caldo (Litter, 1986; Koneman, 1999). Las pruebas de susceptibilidad (en agar y en caldo) son métodos estándares que actualmente se utilizan mucho ante la necesidad práctica no sólo para guiar a los médicos para el uso apropiado de los antibióticos (Koneman, 1987), sino también para investigar compuestos



no conocidos que se evalúan en muchos laboratorios de investigación (Vanden Berghe y Vlietnick, 1991).

**Tabla 5.1 Actividad antibacteriana del verbascósido sobre *Vibrio cholerae***

Bacteria	Verbascósido 400 µg/ disco	Kanamicina 30 µg/ disco	Control negativo
<i>V. cholerae</i> CDC V12	12 ± 0.5	20 ± 0.5	-
<i>V. cholerae</i> INDRE	12 ± 0.5	21 ± 0.5	-
<i>V. cholerae</i> C.C.	12 ± 0.5	20 ± 0.5	-

Se utilizó el método de difusión en agar; los halos de inhibición se presentan en mm; las cifras indican el promedio de seis experimentos y su error estándar; el control negativo en los ensayos fueron discos impregnados con DMSO. Control positivo kanamicina 30 µg/disco Bigaux E-03.

## 5.2 Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima del verbascósido sobre *V. cholerae*.

Para evaluar cuantitativamente la actividad antibacteriana y con el objetivo de determinar la dosis bacteriostática y bactericida se llevaron a cabo las pruebas de dilución en caldo para obtener la CIM y la CBM. Estos resultados se presentan en la Tabla 5-2.

**Tabla 5.2 Concentración Inhibitoria Mínima y Bactericida Mínima del verbascósido sobre *Vibrio cholerae***

Bacteria	CIM (µg/ ml) ±10 µg	CBM (µg/ ml) ±10 µg
<i>V. cholerae</i> CDC V12	400	800
<i>V. cholerae</i> INDRE	400	800
<i>V. cholerae</i> C.C.	400	800

Se utilizó el método de dilución en caldo. Los valores se estimaron a partir de un rango de 2 hasta 1024 µg/ml del compuesto activo en diluciones seriadas de logaritmo base 2.

En esta tabla, se observa que la dosis inhibitoria y bactericida son elevadas si las comparamos con compuestos comerciales, como los que se presentan en el Anexo C. Algunos de estos pueden tener valores grandes de acción inhibitoria del crecimiento bacteriano, dependiendo del microorganismo desafiado. En este anexo se puede apreciar, por ejemplo, que las tetraciclinas presentan CIM muy variables de acuerdo al microorganismo susceptible: para *Streptococcus pneumoniae* la CIM de doxiciclina es de 0.1 µg/ml y de >100 µg/ml para *Enterococcus faecalis* y ocurre lo mismo con el cloranfenicol, cuya CIM varía en el rango de 8 a 1000 µg/ml para *Pseudomonas aeruginosa*, esto es, el rango de resistencia de las cepas bacterianas a un antibiótico es variable (Utrecht y Walmsley, 1998). Otro ejemplo es la ampicilina (agente poco tóxico en dosis terapéuticas), cuya dosis inhibitoria sobre *Pseudomonas aeruginosa* es de >400 µg/ml, mientras que para inhibir el crecimiento de *Streptococcus viridans* se requieren 0.012 µg/ml (Litter, 1986; Utrecht y Walmsley, 1998). Por otro lado, muchos compuestos derivados de plantas con actividad antibacteriana que se han estudiado, presentan actividad en concentraciones variables y en muchas ocasiones muy altas. Por ejemplo, Feio, *et al.*, (1999) reportan la actividad de derivados ácidos de diterpenos contra bacterias gram-positivas y gram-negativas en rangos de concentración que variaron de 0.39 a 50 mg/ml. Chang *et al.*, (2001) reportaron la actividad antibacteriana de aceites esenciales y sus constituyentes de la planta *Cinnamomum osmophloeum* con CIM de 250 a 1000 µg/ml sobre algunas bacterias gram-positivas y gram-negativas. Rabe y van Staden (2000) reportaron las CIM de sesquiterpenos de *Warburgia salutaris* que variaron de 12.5 a >800 µg/ml sobre algunas bacterias gram-positivas y gram-negativas. Lindsay *et al.* (2000) reportaron que el compuesto deshidrocarissona obtenido de *Carissa lanceolata* R.Br., fue el

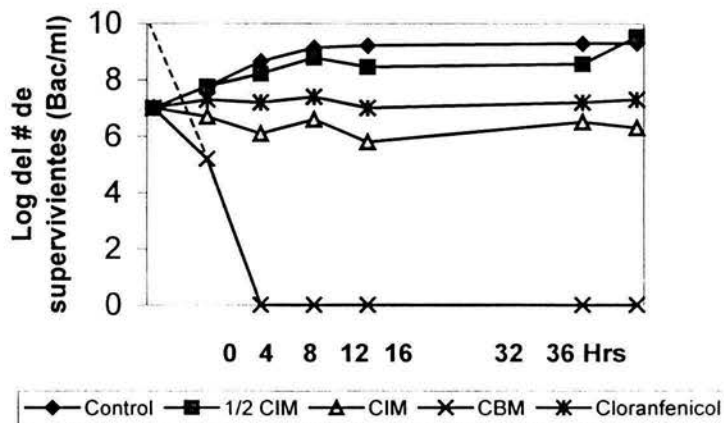
más activo con CIM de menos de 0.5 mg/ml contra *S. aureus* y *E coli* y entre 1 y 2 mg/ml contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Pardo *et al.*, (1993) reportaron una CIM de 624 µg/ml para el verbascósido sobre *Staphylococcus aureus*. En este caso, el compuesto se aisló de las hojas de *Buddleja globosa* observándose que la dosis es alta cuando se compara con antibióticos estándar.

### 5.3 Curva de supervivencia de *V. cholerae* expuesta al verbascósido.

Se determinó la curva de supervivencia de *V. cholerae* expuesta al verbascósido, para lo cual se emplearon las dosis inhibitoria (CIM), la mitad de la dosis inhibitoria (1/2 CIM) y la bactericida (CBM). En la gráfica 5.1 se observan los resultados de la actividad de este compuesto.

**Gráfica 5.1 Curva de supervivencia de *V. cholerae* expuesta al verbascósido.**



El verbascósido se agregó a cada cultivo experimental en el tiempo 0: CBM (800 µg/ml); CIM (400 µg/ml); 1/2 CIM (200 µg/ml); y control, sin verbascósido (100 µl DMSO). Cada experimento (n=3) se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones descritas en el Anexo B. El número de supervivientes se calculó mediante la cuenta de unidades formadoras de colonia (UFC). La dosis del cloranfenicol fue de 2 µg/ml.

De acuerdo con los resultados, el verbascósido provoca un efecto bacteriostático a dosis igual a la CIM, es decir, con respecto al control, inhibe el crecimiento bacteriano en aproximadamente dos unidades logarítmicas durante todo el tiempo de la prueba (36 horas). En contraste, la gráfica muestra que la concentración bactericida (CBM) produce una curva de supervivencia de tipo impacto múltiple (Maynard, 1977; Davis y Dulbecco, 1996). En la curva correspondiente a la CBM, se observa que antes de las ocho horas la población bacteriana sufre una disminución moderada del número de células viables; después de ese tiempo de exposición, hay una disminución drástica de la población formando una pendiente lineal negativa. Esto significa que la acción bactericida del verbascósido sobre cada microorganismo viable podría producirse como consecuencia de una gran cantidad de lesiones o alteraciones (impactos) irreversibles a diversos niveles (rompimiento de enlaces de grupos químicos en las proteínas y/o en los ribosomas de *V. cholerae*) antes de que exista pérdida de viabilidad. El número de alteraciones se puede determinar matemáticamente (Joklik, 1992) y se puede calcular extrapolando la pendiente lineal hacia el eje de las ordenadas en la curva de supervivencia (Davis y Dulbecco, 1996). El valor calculado fue de 10 impactos en *V. cholerae*. Esta curva indica también que el efecto del verbascósido sobre la bacteria es específico, puesto que la curva que produce, es de una sola pendiente, a diferencia de las que producen los desinfectantes (como el formaldehído, los ácidos aromáticos, los alcoholes y los fenoles, que presentan acción inespecífica, sus curvas son de tipo multicomponente con varias pendientes generalmente dos o más rectas) (Harvey, 1982; Davis y Dulbecco, 1996; Brul y Coote, 1999).

### 5.4 Modo de acción del verbascósido.

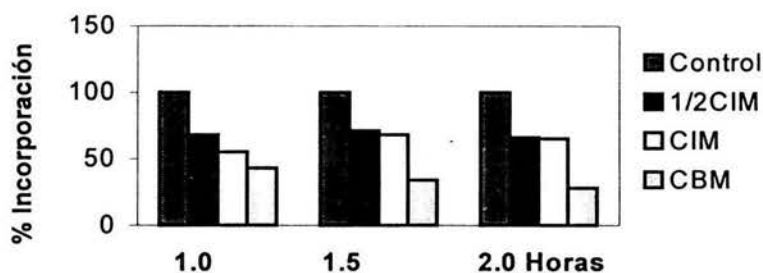
Se evaluó el efecto del verbascósido sobre cuatro vías metabólicas primordiales, esto es, sobre la síntesis de proteínas, la síntesis de DNA y RNA y la síntesis de lípidos, para lo cual *V. cholerae* fue expuesta a dosis de 200, 400 y 800 µg/ml de verbascósido, posteriormente se midió la cantidad de precursor incorporado a la bacteria y de esta forma se estableció qué vía metabólica era alterada por el verbascósido. Los resultados de los experimentos se muestran en la Tabla 5.3 y en la Gráfica 5.2

**Tabla 5.3 Incorporación de los precursores radiactivos en *V. cholerae* expuesto al verbascósido.**

	Leucina <sup>3</sup> H			Timidina <sup>3</sup> H			Uridina <sup>3</sup> H			Acetato <sup>3</sup> H		
	1 h	1.5 h	2 h	1 h	1.5 h	2 h	1 h	1.5 h	2 h	1 h	1.5 h	2 h
Control	100 ± 3.0	100 ± 1.5	100 ± 2.4	100 ± 3.7	100 ± 0.9	100 ± 2.7	100 ± 3.9	100 ± 2.7	100 ± 3.9	100 ± 3.4	100 ± 4.2	100 ± 3.1
½ CIM	68 ± 1.5	71 ± 2.7	66 ± 3.1	100 ± 4.6	100 ± 4.6	100 ± 4.4	100 ± 2.8	100 ± 1.3	100 ± 4.8	100 ± 2.1	100 ± 3.9	100 ± 4.2
CIM	55 ± 2.6	68 ± 5.9	65 ± 0.9	100 ± 2.8	100 ± 3.8	100 ± 4.6	100 ± 4.7	100 ± 1.9	100 ± 0.7	100 ± 0.8	100 ± 2.6	100 ± 5.7
CBM	43 ± 1.6	34 ± 1.2	28 ± 2.9	100 ± 2.1	100 ± 5.4	100 ± 2.3	100 ± 5.8	100 ± 0.5	100 ± 5.1	100 ± 2.9	100 ± 0.5	100 ± 3.3

La concentración de los 4 precursores fue de 3.7 KBq (0.1 µCi/ml). La dosis de CIM correspondió a 400 µg/ml; la CBM a 800 µg/ml; ½ CIM a 200 µg ml; el control consistió en dos partes, un tubo con bacteria y sin tratamiento y otro con caldo Müeller-Hinton solamente. Se tomaron muestras a la 1, 1.5, y 2.0 horas después de aplicar los tratamientos.

**Gráfica 5.2 Efecto del verbascósido sobre la incorporación de leucina  $^3\text{H}$  en *V. cholerae***



El porcentaje de incorporación de Leucina  $^3\text{H}$  se calculó transformando el número de cuentas por minuto leídas por el contador de centelleo comparando los tubos control (sin tratamiento,  $n=5$ ) con los experimentales (CBM=800  $\mu\text{g/ml}$ ; CIM=400  $\mu\text{g/ml}$ ;  $\frac{1}{2}$  CIM=200  $\mu\text{g/ml}$ ;  $n=5$  de cada concentración). La dosis radioactiva fue de 0.1  $\mu\text{Ci/ml}$ . Se tomaron muestras de cada unidad experimental a las 1, 1.5, y 2 horas después de incubar a 37°C.

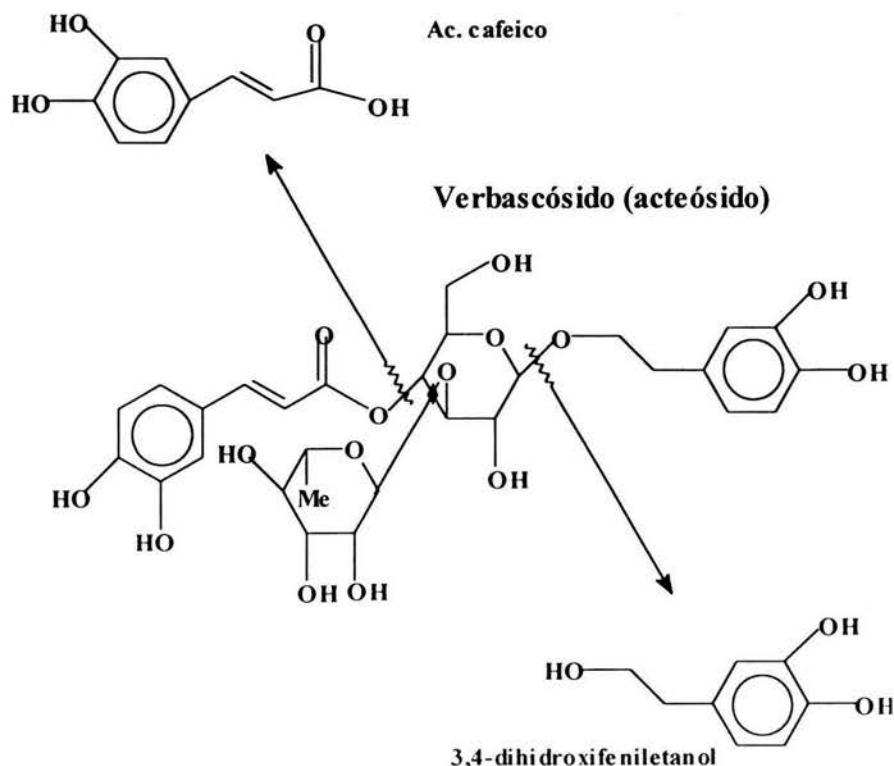
Como se puede apreciar, hay una reducción de la incorporación de Leucina radioactiva de 66% aproximadamente, mientras que los otros precursores radioactivos no mostraron cambio alguno, esto es, son incorporados por la célula bacteriana aproximadamente en un 100%, al igual que el control. De acuerdo con esto, el verbascósido probablemente sea activo contra *Vibrio cholerae* inhibiendo la síntesis de proteínas, puesto que la Leucina es un metabolito precursor importante para dicha síntesis. La acción de este compuesto podría ser el resultado de alguna alteración en el transporte de Leucina a nivel de la pared y/o la membrana celular, o un efecto inhibitorio en algún punto del proceso de la síntesis de proteínas. Este resultado indica cierta correlación con el hecho de que el verbascósido presenta una acción específica (una sola vía metabólica alterada) sobre el crecimiento de *V. cholerae*, esto se puede observar en la figura 5.1., donde la curva obtenida con la dosis de CBM aparece con una sola pendiente.

### 5.5 Hidrólisis del verbascósido.

De acuerdo a la metodología detallada en el Anexo B-7, a partir de un gramo de verbascósido se obtuvieron 100 mg de ácido cafeico y 94 mg de 3,4-dihidroxifeniletanol puros. Se confirmó la identidad de cada compuesto mediante cromatografía en placa fina y la identificación de los compuestos se llevó a cabo de acuerdo al análisis de sus propiedades espectroscópicas de resonancia magnética nuclear de protones (RMN  $^1\text{H}$ ) y la comparación de sus espectros con las de muestras de referencia, así como el análisis de sus propiedades físicas.

El verbascósido se hidrolizó de acuerdo al siguiente esquema (Esquema 5.1), con el objetivo de obtener el farmacóforo.

**Esquema 5.1 Hidrólisis ácida del verbascósido.**



Después de este procedimiento, se evaluaron los productos de hidrólisis: el ácido cafeico y el 3,4-dihidroxifeniletanol. Este último compuesto no presentó actividad anti-*Vibrio cholerae* en los ensayos preliminares, por lo que no se evaluaron sus demás parámetros. El ácido cafeico presentó actividad antibacteriana, por lo cual se procedió a determinar sus parámetros antibacterianos.

### 5.6 Actividad antibacteriana del ácido cafeico.

Se evaluó la actividad del ácido cafeico mediante la técnica de difusión en agar. Los resultados se observan en la Tabla 5.4.

**Tabla 5.4 Actividad antibacteriana del ácido cafeico sobre *V. cholerae***

Bacteria	Acido cafeico 1 mg/ disco	Cloranfenicol 50 µg/disco	Control negativo
<i>V. cholerae</i> CDC V12	10 ± 0.5	25 ± 0.5	-
<i>V. cholerae</i> INDRE	9 ± 0.5	25 ± 0.5	-
<i>V. cholerae</i> C.C.	9 ± 0.5	25 ± 0.5	-
<i>V.cholerae</i> NO-01	9 ± 0.5	25 ± 0.5	-

Se utilizó el método de difusión en agar (Kirby-Bauer), los halos de inhibición se presentan en mm, también se exponen los valores del promedio de seis experimentos y el error estándar. El control negativo fue el dimetilsulfóxido (DMSO). Las dosis de ácido cafeico que se utilizaron fueron: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024 y 2048 µg/ml.

Como se puede observar, el ácido cafeico presenta actividad inhibitoria sobre *V. cholerae* a la dosis indicada en la tabla 5.4, pero dicha actividad es baja en comparación con la del control positivo (cloranfenicol); también lo es comparada con la del verbascósido. El ácido cafeico presenta una solubilidad parcial en un medio acuoso, similar al que presenta el verbascósido, y por ello difunde parcialmente sobre el agar, por ello, los halos de inhibición



no son grandes. Kelly y Post, (1991) indican que los halos de inhibición grandes indican un nivel grande de actividad antimicrobiana, o bien una mayor difusibilidad de la sustancia en evaluación. Por otro lado, no se encontraron reportes que indiquen la actividad del ácido cafeico contra *V. cholerae*.

### 5.7 Concentración Inhibitoria Mínima y Bactericida Mínima del ácido cafeico.

Se evaluó la actividad antimicrobiana del ácido cafeico mediante la técnica de dilución en caldo (esta técnica se describe en el Anexo B). En la tabla 5.5 se presentan los resultados.

**Tabla 5.5 Concentración Inhibitoria Mínima y Bactericida Mínima del ácido cafeico**

Bacteria	CIM $\mu\text{g/ml}$ ( $\pm 10 \mu\text{g/ml}$ )	CBM $\mu\text{g/ml}$ ( $\pm 10 \mu\text{g/ml}$ )
<i>V. cholerae</i> CDC V12	1000	1500
<i>V. cholerae</i> INDRE	1000	1500
<i>V. cholerae</i> C.C.	1000	1500
<i>V. cholerae</i> NO-01	1000	1500

Se utilizó el método de dilución en caldo. Los valores se estimaron a partir de un rango de 2 hasta 2048  $\mu\text{g/ml}$  del compuesto activo en diluciones seriadas de logaritmo base 2.

Los resultados indicaron que este compuesto presentó efecto inhibitorio a dosis de 1000  $\mu\text{g/ml}$  sobre la población de *Vibrio cholerae* y la dosis de 1500  $\mu\text{g/ml}$  produjo un efecto bactericida. No se han reportado estudios que indiquen la actividad del ácido cafeico sobre bacterias patógenas al humano o a los animales. Sin embargo, sí se ha reportado que el ácido cafeico presenta actividad antibacteriana contra *E. coli* cuando está unido covalentemente con la lisozima (Schnürch *et al.*, 1998) y cuando está presente en mezclas

de compuestos fenólicos que tienen actividad contra bacterias gram-positivas y gram-negativas, y las CIMs reportadas van desde 0.25 a 5.5 mg/ml (Fernández *et al.*, 1996).

Ames *et al.*, (1990) reportaron que este compuesto puede tener una acción cancerígena en los roedores si se exponen a 23.9 mg/día durante toda su vida. Esto puede ser un factor adverso si consideramos probable que el ácido cafeico sea un producto útil terapéuticamente, aunque las dosis tóxicas reportadas por estos autores son muy altas. Muchos reportes indican que este compuesto presenta otras actividades favorables para los sistemas vivos, principalmente como agente antioxidante (Kono *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1999; Benavente-García *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001; Rajan *et al.*, 2001).

### **5.8 Curva de supervivencia de *V. cholerae* expuesto al ácido cafeico.**

En los primeros experimentos para obtener la curva de supervivencia de ácido cafeico contra *V. cholerae*, no se observó claramente un efecto inhibitorio ni bactericida a las dosis de CIM y CBM, por lo que se realizaron experimentos a dosis intermedias y mayores a la CIM y la CBM y así poder observar la cinética. Los resultados se observan en la Tabla 5.6 y en la Gráfica 5.3.

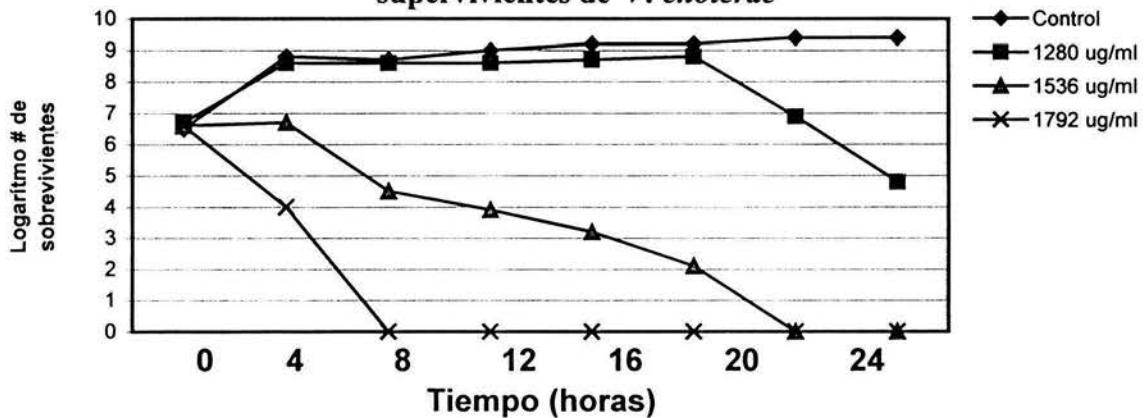
**Tabla 5.6 Resultados correspondientes a la curva de supervivencia de *V. Cholerae* expuesta al ácido cafeico.**

**(Logaritmo del número de sobrevivientes).**

Tiempo hrs.	Control	1280 $\mu\text{g/ml}$	1536 $\mu\text{g/ml}$	1792 $\mu\text{g/ml}$
0	6.5	6.7	6.7	6.6
4	8.8	8.6	6.6	4.0
8	8.7	8.6	4.5	0.0
12	9.0	8.6	3.9	0.0
16	9.2	8.7	3.2	0.0
20	9.2	8.8	2.1	0.0
24	9.4	6.9	0.0	0.0
28	9.4	4.8	0.0	0.0

Los valores mostrados son el resultado del promedio de tres experimentos y transformados a la forma logarítmica.

**Gráfica 5.3 Actividad del ácido cafeico sobre el número de sobrevivientes de *V. cholerae***



El ácido cafeico se agregó a cada cultivo experimental en el tiempo 0: CBM (1792  $\mu\text{g/ml}$ ); CIM (1536  $\mu\text{g/ml}$ ); 1/2 CIM (1280  $\mu\text{g/ml}$ ); y control, sin ácido cafeico (100  $\mu\text{l}$  DMSO). Cada experimento ( $n=3$ ) se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones descritas en el Anexo B. El número de sobrevivientes se calculó mediante la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC).

Las curvas de supervivencia tienen relación con la teoría “del blanco” (Maynard, 1977), mecanismo de acción de las radiaciones, que incluye además, el modelo de impacto múltiple y se refiere a la posibilidad de que una célula o cualquier otro punto pueda ser afectado por la acción conjunta de dos o más impactos (Meynell y Meynell, 1969).

En la gráfica 5.3 se observa que a dosis de 1792  $\mu\text{g/ml}$  el ácido cafeico se comporta como un agente bactericida. A las 4 horas de incubación ya hay una reducción de dos unidades logarítmicas del número de sobrevivientes y a las 8 horas ya no se observa ninguna unidad formadora de colonia. A dosis de 1280  $\mu\text{g/ml}$ , el comportamiento de la población bacteriana es similar a la del control, pero a las 24 horas se observa una reducción significativa de la población. En cambio, a dosis de 1536  $\mu\text{g/ml}$  no se presenta letalidad en las primeras 4 horas, disminuyendo drásticamente la población a partir de las 8 horas y hasta las 24, cuando se presentó un efecto letal. Se realizó un análisis de la dosis con relación al número de supervivientes. Si se expone una población de microorganismos a un agente letal, la proporción de gérmenes supervivientes, puede representarse gráficamente en función al tiempo de exposición (Meynell y Meynell, 1969). De esta manera se obtiene la curva de supervivencia, la cual generalmente es exponencial, ya que al representar el logaritmo de la proporción de supervivientes en función del tiempo de la exposición expresada en unidades aritméticas, se obtienen una línea recta. En el caso de la Gráfica 5.3, la curva correspondiente a la CBM no es exponencial, ya que bajo el mismo sistema de representación, se obtiene una curva con un hombro en la parte superior, antes de formar una línea recta. Esto indica, en términos de la teoría del sitio blanco, que para que muera un microorganismo es necesaria la acción conjunta de varios sucesos inactivantes dentro de la célula. Esta teoría se puede aplicar a los agentes bactericidas. La curva de supervivencia de

impacto múltiple, como la que se observa en la Gráfica 5.3, indica que cada bacteria tiene que resultar “tocada” para evitar la formación de una colonia, es decir, que una bacteria tiene primero que recibir el impacto de varias unidades para que se produzca una respuesta. En esta curva de supervivencia, si la porción lineal descendiente se extrapola hacia arriba y a la izquierda, su intersección con el eje de las ordenadas da el valor de los impactos (Davis y Dulbecco, 1996). Si la forma de la gráfica fuera de una línea recta desde el origen en el eje de las ordenadas, se produciría una curva de “impacto único”, indicando que una partícula (una molécula) es capaz de producir un cambio en una molécula esencial, como puede ser el ácido desoxirribonucleico del genoma bacteriano o la membrana celular, y no podría ser una enzima u otro constituyente celular presente en múltiples copias (Lea, 1946; Moseley y Laser, 1965; Haynes, 1966; Tyrrell *et al.*, 1972; Brooks *et al.*, 2002). El resultado obtenido y representado en la gráfica 5.3 indica que *Vibrio cholerae* puede perder su viabilidad por la acción conjunta de un gran número de impactos (Moats *et al.*, 1971), sugiriendo que los cambios producidos en esta bacteria pueden ser en sitios diferentes del genoma o la membrana citoplasmática. (Meynell y Meynell, 1969; Russell *et al.*, 1992).

### **5.9 Modo de acción del ácido cafeico.**

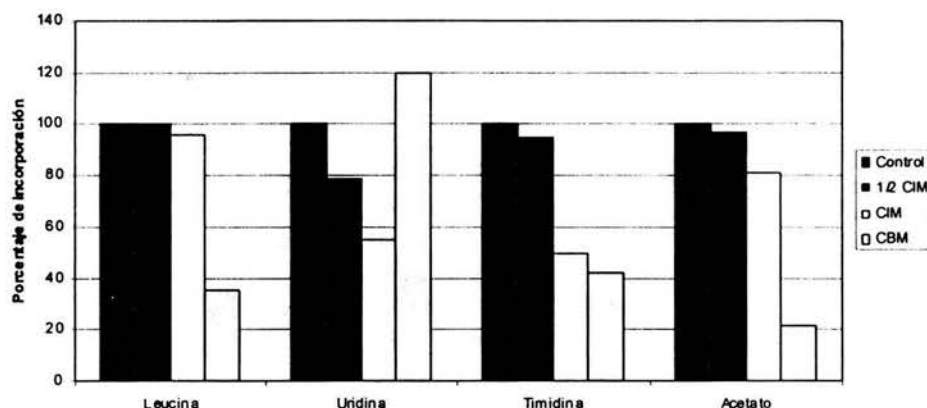
El modo de acción del ácido cafeico se determinó mediante experimentos de incorporación de metabolitos marcados radioactivamente en *V. cholerae*. Los resultados se observan en la Tabla 5.7 y en la Gráfica 5.4.

**Tabla 5.7 Efecto del ácido cafeico sobre la incorporación de precursores radioactivos sobre *V. cholerae*.**

Precursor	Control (%)	½ de CIM (%)	CIM (%)	CBM (%)
Leucina <sup>3</sup> H	100	100	95.9	35.13
Uridina <sup>3</sup> H	100	78.47	54.95	121.8
Timidina <sup>3</sup> H	100	94.6	49.77	42.32
Acetato de Na <sup>3</sup> H	100	96.9	81.2	21.7

%.- porcentaje de incorporación a las 2 horas de incubación. ½ de CIM.- 768 µg/ml; CIM.- 1536 µg/ml; CBM.- 1792 µg/ml. Resultados de un experimento por triplicado.

**Gráfica 5.4 Efecto del ácido cafeico sobre la incorporación de precursores radioactivos en *V. cholerae*.**



El porcentaje de incorporación de cada precursor se calculó transformando el número de cuentas por minuto leídas en el contador de centelleo en valores por ciento, comparando las cuentas de los tubos control (sin tratamiento, n=5) con los experimentales (CBM=1792 µg/ml; CIM=1536 µg/ml; ½ CIM=768 µg/ml; n=5 de cada concentración). La dosis radioactiva fue de 0.1 µCi/ml. Se tomaron muestras de cada unidad experimental a las 1, 1.5, y 2 horas después de incubar a 37°C. La gráfica muestra los valores a las 2 horas.

Se puede observar que a dosis igual a la CBM, el ácido cafeico altera la incorporación de leucina, uridina, timidina y acetato de sodio a las 2 horas de incubación, esto es, existe menor incorporación de estos precursores (excepto la incorporación de uridina) en relación con el control. En lo que se refiere a la incorporación de la uridina, se observa una

alteración, pero en este caso, se observa una incorporación mayor de este metabolito comparada con la del control. Se observa que en todos los casos hay alteración en la incorporación, lo que indica que en comparación con el verbascósido, el ácido cafeico es menos selectivo a nivel celular. El ácido cafeico altera la incorporación de uridina, a diferencia de lo que ocurre con lo reportado para el verbascósido el cual altera la incorporación de leucina. Es interesante observar que el modo de acción es diferente debido, quizá, a que estos compuestos son muy diferentes estructuralmente y por ello presentan comportamientos diferentes. De acuerdo con los resultados, el ácido cafeico afecta a las cuatro rutas metabólicas evaluadas hasta las dos horas. Es probable que el orden de afectación de estas rutas se inicie con la disminución de la síntesis de proteínas, y como respuesta a la deficiencia de proteínas y enzimas se genere un aumento en la síntesis de RNA, en particular los RNA de tipo mensajero con el objetivo de crear rutas alternas. Como consecuencia de la falta de proteínas (entre ellas, las enzimas), la incorporación de acetato se puede ver alterada. Esta vía metabólica requiere el complejo de la sintetasa de los ácidos grasos. La incorporación de timidina se debe llevar a cabo principalmente para la síntesis y replicación del DNA, pero para que se incorpore, se requiere de las enzimas polimerasas (las cuales pueden estar inhibidas o ausentes como consecuencia de una deficiente síntesis de proteínas).

Es probable, sin embargo, que si no hay síntesis de RNA tampoco haya RNA mensajeros, y esto puede alterar las otras vías metabólicas generales de la bacteria (síntesis de proteínas, DNA y lípidos), de hecho, se puede observar que a dosis iguales a la CBM se alteró la incorporación de leucina, timidina y acetato de sodio.

### 5.10 Acción sinérgica del ácido cafeico y del 3,4-dihidroxifeniletanol.

Como se señaló en la sección “Hidrólisis del Verbascósido,” el 3,4-dihidroxifeniletanol, no presentó actividad antibacteriana contra *V. cholerae*; el ácido cafeico sí presentó dicha actividad. Estas evaluaciones forman parte de uno de los objetivos de este trabajo, uno de ellos, fue determinar la actividad biológica de los productos de hidrólisis del verbascósido ya que existe la idea de que el uso etnobotánico de *B. scordioides*, preparación de infusión, el verbascósido pudiera ser hidrolizado en el tracto digestivo y que tales productos de hidrólisis pudieran actuar de manera sinérgica. Este es un aspecto importante en las pruebas de susceptibilidad, puesto que se deben evaluar los efectos *in vitro* de una combinación de agentes activos (Utrecht y Wamsley, 1998). Por ello, se llevaron a cabo los experimentos *in vitro* correspondientes para verificar la acción sinérgica de los productos mencionados. Los resultados se presentan en la Tabla 5.8.

**Tabla 5.8 Efecto sinérgico del ácido cafeico y del 3,4-dihidroxifeniletanol**

Compuesto (Dosis)	Actividad
Acido cafeico (1 mg/ml)	+
3,4-dihidroxifeniletanol (1 mg/ml)	-
Acido cafeico (512 µg/ml)	-
3,4-dihidroxifeniletanol (512 µg/ml)	-
Acido cafeico (512 µg/ml) + 3,4-dihidroxifeniletanol (512µg/ml)	+

(+)= Inhibición del crecimiento visible de la población bacteriana; (-)= crecimiento visible.

Se utilizaron las dosis de 512 µg/ml de ácido cafeico y 512 µg/ml de dihidroxifeniletanol combinados y aplicados a un cultivo de *V. cholerae*, después de la incubación a 37°C, se



observó el efecto sobre el crecimiento. Pero por separado, a dosis de 512 µg/ml el ácido cafeico no presentó acción inhibitoria sobre el crecimiento bacteriano; y a dosis de 512 µg/ml de 3,4-dihidroxifeniletanol tampoco se presentó actividad.

También se puede observar que el ácido cafeico a dosis inhibitoria de 1 mg/ml (CIM) presentó actividad antimicrobiana. El 3,4-dihidroxifeniletanol a 1 mg/ml no presentó actividad. Sin embargo, estos compuestos combinados presentaron actividad inhibitoria del crecimiento de *V. cholerae*, sugiriendo la existencia de un efecto sinérgico. Existen pocos estudios de sinergia de compuestos de origen vegetal pero Stermitz *et al.*, (2000) reportaron un efecto de sinergia del compuesto berberina, un alcaloide que se encuentra en muchas plantas medicinales, con el compuesto identificado como 5'-metoxihidnocarpina (el cual por sí solo no presentó actividad contra *Staphylococcus aureus*). Sin embargo, después de realizar una revisión en la literatura, no se encontraron más investigaciones relacionadas con este tema.

Como se mencionó anteriormente, se sabe que un grupo de átomos que forma parte de un compuesto activo y que es el responsable de una actividad biológica se conoce como farmacóforo (Cory, 1996). En este trabajo, el ácido cafeico fue el grupo farmacóforo del verbascósido.

La región clave de este farmacóforo podría servir (en estudios posteriores) para un reconocimiento y unión molecular con otra molécula, la cual, podría ser un receptor en particular (Hollinger, 1997).

## 6. Conclusiones.

- 1) Los resultados indicaron que *V. cholerae* fue sensible al verbascósido.
- 2) Los valores de CIM y CBM del verbascósido evaluados *in vitro* fueron relativamente altos en comparación con los antibióticos comerciales.
- 3) La curva de supervivencia indicó que el efecto del verbascósido sobre *V. cholerae* es específico (no existió efecto multipendiente).
- 4) Probablemente, el verbascósido inhibe la síntesis de proteínas, ya que solamente altera la incorporación de Leucina.
- 5) El compuesto 3,4-dihidroxifeniletanol, uno de los productos de hidrólisis del verbascósido, no presentó actividad anti-*Vibrio cholerae*.
- 6) El ácido cafeico, que es otro producto de hidrólisis del verbascósido, sí presentó acción inhibitoria sobre el crecimiento de *V. cholerae*. El efecto de este metabolito es menor al del verbascósido.
- 7) La CIM y la CBM del ácido cafeico fueron muy altas (1 y 1.5 mg/ml, respectivamente).
- 8) El ácido cafeico provocó menor incorporación de los precursores marcados radioactivamente ( timidina, leucina y acetato de sodio), pero en el caso de la uridina, la incorporación fue mayor con respecto al control.
- 9) El ácido cafeico es el grupo farmacóforo del verbascósido.
- 10) Los productos de hidrólisis del verbascósido, el 3,4-dihidroxifeniletanol y el ácido cafeico presentaron acción sinérgica.

## 7. Anexos.

## 7.1 ANEXO A. Algunos compuestos de plantas y bacterias susceptibles.

## A-1. Actividad antibacteriana de algunos terpenos.

Origen	Actividad contra	Tipo de compuesto	Referencia
<i>Tanacetum densum</i>	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	lactona sesquiterpénica	Goren <i>et al.</i> , 1992
<i>Tanacetum argyrophyllum</i>	<i>Staphilococcus aureus</i> <i>S. magatenum</i> <i>B. subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>	Isoprenil aromático	Goren <i>et al.</i> , 1992
<i>Picea glauca</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Terpenoides	Ritch-Krc <i>et al.</i> , (a), 1996
<i>Pinus contorta</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Terpenoides	Ritch-Krc <i>et al.</i> , (b), 1996
<i>Vochysia divergens</i>	<i>S. aureus</i>	$\beta$ -sitosterol	Hess <i>et al.</i> , 1995
<i>Haplopappus diplopappus</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>P. vulgaris</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Terpenos	Ursúa <i>et al.</i> , 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>	Terpenos	Ursúa <i>et al.</i> , 1995
<i>H. uncinatus</i>	<i>E. coli</i> <i>P. vulgaris</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Terpenos	Ursúa <i>et al.</i> , 1995

## A-2. Actividad antibacteriana de flavonoides.

Origen	Actividad contra	Tipo de compuesto	Referencia
<i>Psidia trinitaria</i>	<i>B.cereus</i>	Flavonoide	Wang <i>et al.</i> , 1989
<i>Elaeagnus glabra</i>	<i>P. vulgaris</i> <i>S. aureus</i>	Flavonoides	Mori <i>et al.</i> , 1987
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>P. maltophilia</i> <i>E. cloacae</i>	Flavonol-glucósido	Waage y Hedin, 1984
<i>Camellia sinensis</i>	<i>Shigella spp</i>	Catequinas	Vijaya <i>et al.</i> , 1995
<i>Euphorbia hirta</i>	<i>Shigella spp</i>	Catequinas	Vijaya <i>et al.</i> , 1995
<i>Sophora exigua</i>	<i>S. aureus</i>	Flavona	Tsuchiya <i>et al.</i> , 1996
<i>Poliurus spina</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. faecalis</i> <i>S. sonei</i> <i>E. coli</i>	Flavonoides	Brantner <i>et al.</i> , 1996
<i>Haplopappus multifolius</i>	<i>P. vulgaris</i> <i>S. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Flavonoides	Ursúa <i>et al.</i> , 1995

## A-3. Actividad antibacteriana de quinonas.

Origen	Actividad contra	Tipo de compuesto	Referencia
<i>Karwinskia</i>	<i>S.aureus</i>	Dimetil	Mitscher <i>et al.</i> , 1985
<i>humboldtiana</i>	<i>M.smegmatis</i>	benzocromonos	

**A-4. Actividad antibacteriana de glucósidos.**

Origen	Actividad contra	Tipo de compuesto	Referencia
<i>Ipomoea bahiensis</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. faecalis</i> <i>B. subtilis</i>	Glucósido hidroxiácido	Bieber <i>et al.</i> , 1986

**A-5. Actividad antibacteriana de lignanos.**

Origen	Actividad contra	Tipo de compuesto	Referencia
<i>Rhynchosia suaveolens</i>	<i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Difenilos	Khan y Shoeb, 1984
<i>Scrophularia frutescens</i>	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	Fenoles	Fernández <i>et al.</i> , 1996

**A-6. Actividad antibacteriana de pterocarpanos.**

Origen	Actividad contra	Tipo de compuesto	Referencia
<i>Erythrina milohraedii</i>	<i>S. aureus</i> <i>M. smegmatis</i>	Pterocarpano	Mitscher, 1988

**A-7. Actividad antibacteriana de taninos.**

Origen	Actividad contra	Tipo de compuesto	Referencia
<i>Machaerium floribundum</i>	<i>P. maltophilia</i>	Tanino	Waage <i>et al.</i> , 1984

## 7.2 Anexo B. Material y Métodos.

### B-1. Método de difusión en agar (Kirby-Bauer)

(Barry y Thornsberry, 1987; Vanden Berghe y Vlietnick, 1991).

Con este método se evaluó cualitativamente la actividad antibacteriana del verbascósido, el ácido cafeico, y el 3,4-dihidroxifeniletanol.

**Medio.** Se seleccionó como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton (Bioxon 110-1), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente importantes. Es necesario que el medio tenga un espesor uniforme de 4 mm en la placa. Si el espesor del medio es menor de esta cantidad, 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 difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar las zonas de inhibición.

**Inóculo.** Con un asa de siembra se tomaron 3 ó 4 colonias de un cultivo puro de *Vibrio cholerae* y se colocaron en 3 ml de caldo soya tripteína (Bioxon 111). El tubo de cultivo se incubó a 37°C durante 2 a 3 horas, o hasta que la turbidez del medio fuera equivalente al estándar No 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias/ml.

El estándar 0.5 de McFarland se preparó añadiendo 0.5 ml de sulfato de bario a 99.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36 N (Hendrickson, 1987). La comparación de la turbidez entre el estándar y el caldo con el organismo en estudio se puede efectuar visualmente contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o en su defecto, en un espectrofotómetro (Spectronic 21 Milton Roy) a 600 nm.

Se introdujo un hisopo estéril en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlo, se eliminó el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inoculó la superficie de una placa de agar de Müller-Hinton. Previamente, se dejó que la placa alcanzara la temperatura ambiente; es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad en la superficie del agar. Finalmente, la bacteria se sembró mediante estría en por lo menos tres direcciones, girando la placa en ángulos de aproximadamente 60° después de cada estría. De esta forma, la placa queda lista para la aplicación de las muestras para su evaluación antibacteriana.

**Aplicación de sustancias.** Se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro de papel Whatman del No.5. Las concentraciones de verbascósido, ácido cafeico, y 3,4-dihidroxifeniletanol empleadas en cada sensidisco fueron: 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 y 1024 µg/ml.

**Preparación de muestras.** Los sensidiscos se impregnaron con el verbascósido, el ácido cafeico, y el 3,4-dihidroxifeniletanol solubilizados en DMSO. Los discos se dejaron evaporar durante un periodo de 12 horas.

Los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocaron en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril, colocándose por lo menos a 22 mm de distancia uno del otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se presionaron suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar.

**Controles negativos.** Los discos a los que se les agregó el disolvente funcionaron como controles negativos; se dejaron evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

**Control positivo.** La susceptibilidad de las bacterias frente a los antibióticos se evaluó mediante el uso de sensidiscos para bacterias gram-negativas (Bigaux). Se encontró que la kanamicina presentaba halos de inhibición dentro de los límites de susceptibilidad reportados (Barry y Thornsberry, 1987), por ello, se utilizaron discos de kanamicina de 30  $\mu\text{g}$  (Bigaux E-03).

**Incubación.** Una vez preparadas las placas convenientemente para la prueba de susceptibilidad, éstas se colocaron en una estufa bacteriológica a 35°C.

**Interpretación de resultados.** Las zonas de inhibición se midieron con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se realizó por triplicado y se reportaron los valores promedio y la desviación estándar (Barry y Thornsberry, 1987; Vanden Berghe y Vlietnick, 1991).

## **B-2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).**

La solución de verbascósido y la del ácido cafeico se prepararon a concentraciones de 62.5, 125, 250, 500 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ . La prueba se realizó en tubos de ensayo de 13 por 100 mm con tapa de rosca o con tapones de algodón. Se prepararon diluciones de base 2 directamente en los tubos, del modo siguiente: se colocaron 2 ml de solución de los compuestos en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añadió 1 ml de caldo de Müeller-Hinton. Con una pipeta esterilizada, se transfirió 1 ml del primer tubo al segundo. Después de mezcló bien el contenido del segundo tubo, se transfirió 1 ml con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al



tercer tubo. El proceso continuó hasta el penúltimo tubo, al que se le quitó 1 ml, el cual se eliminó. El último tubo no recibió agente antimicrobiano y sirvió de control de crecimiento

**Inoculación e incubación de los tubos.** Se preparó un inóculo que contenía de  $10^6$  UFC/ml (unidades formadoras de colonias/ml) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utilizó el estándar 0.5 de McFarland y diluyendo luego 1:200 en caldo). Se añadió a cada tubo 1 ml del inóculo ajustado. Se incuban los tubos a 37°C durante 16-20 horas.

**Interpretación de resultados.** La menor concentración del compuesto que produjo una inhibición completa del desarrollo visible de la bacteria representó la CIM. Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se consideró evidencia de que el compuesto fue incapaz de inhibir por completo el desarrollo bacteriano a esa concentración. (Jones *et al.*, 1987).

### **B-3. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).**

(Finegold y Jo Baron, 1989).

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un microorganismo, se realizó la prueba que emplea el mismo sistema de dilución en caldo. Cuando la suspensión inicial del microorganismo se inoculó en los tubos de caldo, se tomó una alícuota del tubo del control de crecimiento inmediatamente después de sembrarse, la cual se inoculó en una placa de agar de Müeller-Hinton para determinar el número real de unidades formadoras de colonias. Este número se obtuvo al contar las colonias presentes en la placa de agar y multiplicarlas por el factor de dilución. El procedimiento fue como sigue.

Después de determinar la CIM, se sembró una cantidad conocida (0.1 ml) en las placas de agar a partir de los tubos experimentales que no presentaron turbidez. El número de colonias que se desarrolló en estas placas, después de incubar durante 18 horas, se contaron y se compararon con el número de UFC/ml del cultivo original. En aquellos tubos que no presentaron turbidez, los microorganismos permanecieron viables o bien, fueron destruidos por el agente antimicrobiano. Debido a que los compuestos, incluyendo a los bactericidas, no siempre matan 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 Mínima (CBM) (Finegold y Jo Baron, 1989).

#### **B-4. Curva de supervivencia (efecto sobre el crecimiento).**

(Kubo, 1993; Shoenknecht *et al.*, 1987; Anhalt *et al.*, 1985; Mori *et al.*, 1987).

El crecimiento de *V. cholerae* se investigó mediante medidas de turbidez (en caldo Müeller-Hinton), y cuenta de células viables de la bacteria sometida a la sustancia vegetal.

El desarrollo fue el siguiente:

Se preparó y rotuló por lo menos un tubo con la sustancia problema; se tomó una muestra desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora, hasta las 6 horas. A partir de este muestreo, se prepararon los tubos para realizar lecturas cada 4 horas.

Se preparó y rotuló un tubo sin compuesto activo que sirvió como control de desarrollo. El inóculo contenía  $3 \times 10^8$  bacterias/ml en un tubo de ensayo con 10 ml de caldo de Müeller-Hinton (esta concentración se obtuvo en un periodo de 12-18 horas de incubación).

Se hicieron muestreos cada hora durante las 6 primeras horas. Además se realizaron diluciones 1:10 para determinar las UFC en cada tubo, a partir de este tiempo se tomaron muestras cada 4 horas. Concomitantemente, se leyó en el espectrofotómetro cada dos horas

a 600 nm. La duración del experimento fue de 24 horas. (Kubo, 1993; Shoenknecht *et al.*, 1997).

La suspensión de bacterias (0.1 ml) se colocó en los tubos que contenían el antimicrobiano (a una concentración igual a la bactericida mínima) y sus múltiplos medios; esto es, la CIM y la mitad de la CIM. La concentración final fue de  $3 \times 10^7$  bacterias/ml de caldo en cada tubo. Se incubó en una estufa a 37°C.

Microorganismos que se utilizaron en este estudio.

*Vibrio cholerae* CDC V12, *V. cholerae* INDRE 206 aislada de agua contaminada y *V. cholerae* aislada de un caso clínico. Estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba, biotipo El Tor.

#### **B-5. Modo de acción del verbascósido y del ácido cafeico.**

**Cultivo del microorganismo.** Se realizó en caldo Müeller-Hinton (Bioxon 260-1).

**Reactivos.** Verbascósido obtenido de *B. scordioides*. Acido cafeico obtenido de la hidrólisis ácida del verbascósido. Acetato de sodio [ $^3\text{H}$ ] (ICN 2200405), Leucina [ $^3\text{H}$ ] (Amersham TRK 683), Timidina [ $^3\text{H}$ ] (Amersham TRK 758), y Uridina [ $^3\text{H}$ ] (Amersham TRK 410).

**Bioensayos para determinar el número de sobrevivientes.** Se llevaron a cabo en caldo Müeller-Hinton que contenía las concentraciones correspondientes a la concentración inhibitoria mínima (CIM): 400  $\mu\text{g/ml}$ , un medio de la concentración inhibitoria: 200  $\mu\text{g/ml}$  y la concentración bactericida mínima (CBM): 800  $\mu\text{g/ml}$ . El inóculo inicial de bacteria fue de  $3 \times 10^7$  UFC/ml y se incubó a 37°C. Para determinar las UFC/ml, se tomaron las muestras

de cada tubo experimental cada 4 horas y hasta las 24 horas. Las células viables se contaron mediante la técnica de dilución (Anhalt *et al.*, 1985).

#### **B-6. Incorporación de precursores radioactivos.**

Para incorporar cada precursor radioactivo en las células, se procedió de la siguiente manera:

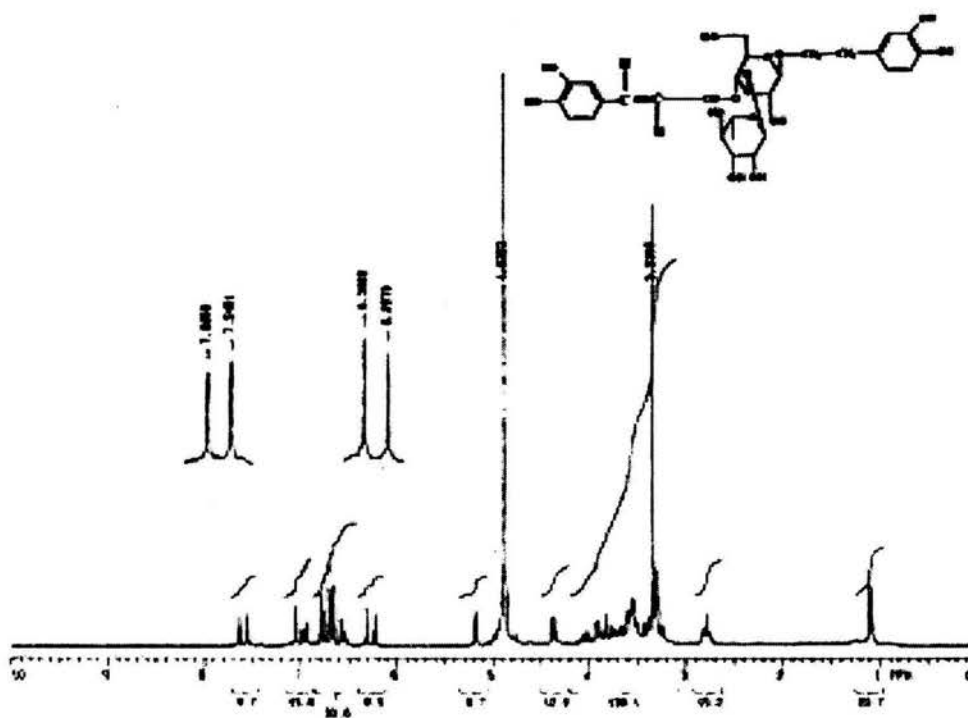
Se prepararon cultivos bacterianos en 10 ml de caldo Müeller-Hinton y se incubaron durante 12 horas a 37°C (Thelco Laboratory Oven Model 160). Cuando el crecimiento bacteriano alcanzó la fase exponencial (0.2 de absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Spectronic 21 Milton Roy Company) el cultivo se diluyó 10 veces. Se prepararon 5 unidades para bioensayo (3 experimentales y 2 controles). A las unidades experimentales se les agregó el compuesto bioactivo a concentraciones que corresponden a  $\frac{1}{2}$  CIM, CIM y CBM. A un control se le agregaron 100  $\mu$ l de vehículo (disolvente utilizado para diluir el compuesto) y al otro control no se le agregó el disolvente (contenía sólo bacterias). Los precursores radioactivos se agregaron a los tubos en concentraciones de 0.1  $\mu$ Ci/ml (3.7 K bq). Los tubos se incubaron a 37°C, y se tomaron alícuotas de 1.0 ml de cada unidad experimental a las 1.0, 1.5, y 2.0 horas. Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante ( $\cong$ 1.0 ml) se resuspendió en líquido de centelleo (9.0 ml) (Ready Organic TM Beckman).

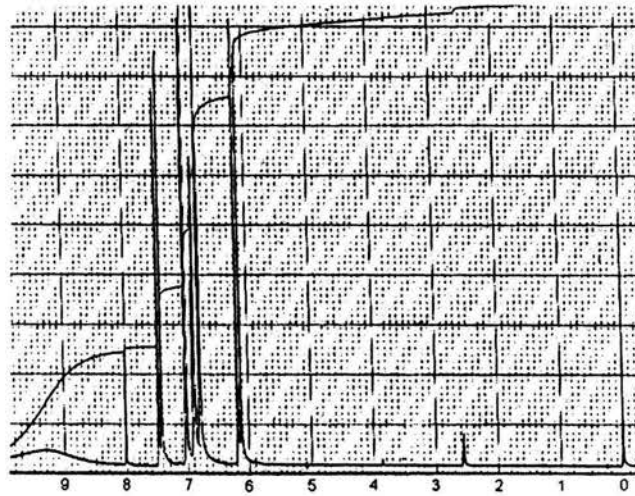
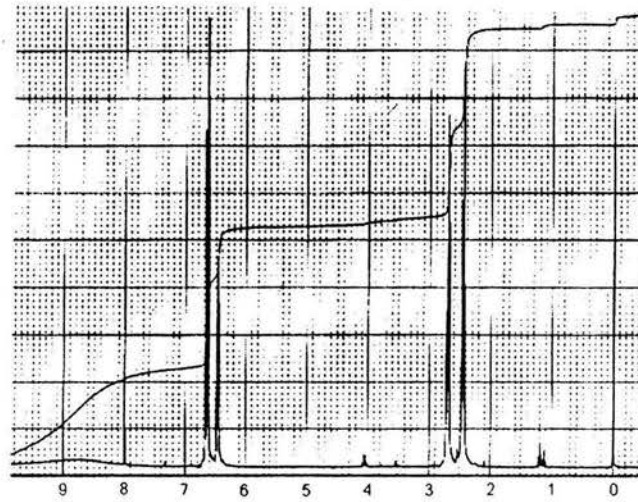
La radiactividad se determinó usando un contador de centelleo líquido (Beckman LS000SE). Las muestras se procesaron durante un minuto en este aparato. El porcentaje del precursor incorporado a la bacteria se calculó mediante la proporción de la cantidad

remanente de radiactividad en cada tiempo. Se realizaron 5 réplicas por cada precursor marcado (Mori *et al.*, 1987).

#### **B-7. Hidrólisis ácida e identificación de metabolitos.**

El verbascósido se trató con HCl 6N y se calentó en baño de vapor durante 6 horas. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se neutralizó con Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> y se le agregó agua. Posteriormente, el hidrolizado se separó mediante partición con CHCl<sub>3</sub>; los componentes de la fase clorofórmica, a su vez, se separaron mediante cromatografía de placa preparativa de sílica gel (Vollhardt y Schore, 1999 y Solomons y Fryhle, 2000). La identificación de los productos de hidrólisis se realizó mediante la determinación de parámetros físicos (punto de fusión) y espectroscópicos en el ultravioleta, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de protones y de <sup>13</sup>C. El punto de fusión se determinó en un aparato Fisher Johns. El espectro UV se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis Lambda II; el disolvente utilizado fue metanol grado HPLC. Los espectros de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C se obtuvieron en un Varian Géminis 200A. El espectro de masas se determinó en un espectrómetro de masas Jeol JMS-Sx102A con base de datos. Sin embargo, para los fines de esta tesis, solamente se presentan los espectros de RMN <sup>1</sup>H

**B-8. Espectros de resonancia magnética nuclear****B-8.1. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del verbacósido**

**Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del ácido cafeico****Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del 3,4-dihidroxifeniletanol**

## 7.3 ANEXO C. CIM de algunos agentes quimioterapéuticos.

C-1. CIM de algunas penicilinas ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Bacterias	Penicilina G	Cloxacilina	Ampicilina	Ticarcilina	Piperacilina
<b>Gram-positivas</b>					
<i>Staphylococcus aureus</i> , penicilinas (-)	0.03	0.25	0.05	1.25	0.8
<i>Staphylococcus aureus</i> , penicilinas (+)	25->800	0.5	125.0	25.0	25.0
<i>Streptococcus</i> Grupo A	0.007	0.1	0.05	0.5	0.05
<i>Streptococcus viridans</i>	0.01	-	0.012	0.2	1.2
<i>Enterococcus faecalis</i>	2.0	25.0	0.38	34.0	4.0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.015	0.5	0.05	0.25	0.05
<i>Listeria</i>	0.1	-	0.1	2.5	1.25
<i>Clostridium</i>	0.06	-	0.05	0.5	-
<b>Gram-negativas</b>					
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.05	0.5	0.02	0.1	0.05
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.06	1.0	0.125	0.1	0.05
<i>Haemophilus influenzae</i>	0.16	-	0.05	0.5	0.25
<i>Salmonella</i> spp.	5.0	>250	2.0	4.0	4.0
<i>Shigella</i>	16.0	>250	6.0	-	-
<i>Klebsiella</i>	50.0	>250	50.0	50.0	4.0
<i>Escherichia coli</i>	64.0	>250	5.0	5.0	2.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>400	>250	>400	25.0	10.0
<i>Proteus mirabilis</i>	32.0	>250	1.25	1.25	1.25
<i>Bacteroides fragilis</i>	32.0	-	37.5	37.5	-
Otros <i>Bacteroides</i>	0.12	-	2.0	2.0	-

(Utrecht y Walmsley, 1998)



C-2.CIM de algunas cefalosporinas ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Bacterias	Cefalotina	Cefamandol	Cefoxitina	Cfotaxima
<b>Gram-positivas</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i> , penicilinasa (-)	0.2	0.25	3.1	2.0
<i>Staphylococcus aureus</i> , penicilinasa (+)	0.4	0.5	3.1	2.0
<i>Streptococcus</i> Grupo A	0.1	0.06	0.4	0.01
<i>Streptococcus viridans</i>	-	0.5	1.6	0.125
<i>Enterococcus faecalis</i>	50.0	32.0	100.0	>128
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.1	0.25	3.12	0.03
<i>Listeria</i>	4.0	6.0	25.0	25.0
<i>Clostridium</i>	0.4	0.12	1.0	0.25
<b>Gram-negativas</b>				
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.5	<0.125	0.12	0.004
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	3.1	<0.125	0.12	0.015
<i>Haemophilus influenzae</i>	6.3	0.5	8.0	0.03
<i>Salmonella</i> sp.	2.0	1.0	2.0	0.25
<i>Shigella</i>	125.0	2.0	25.0	0.25
<i>Klebsiella</i>	10.0	1.0	12.5	0.25
<i>Escherichia coli</i>	20.0	0.5	8.0	0.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>200	>125	>400	16.0
<i>Proteus mirabilis</i>	10.0	1.0	6.3	0.1
<i>Bacteroides fragilis</i>	<25	64.0	16.0	8.0
Otro <i>Bacteroides</i>	12.5	1.0	1.0	-

(Utrecht y Walmsley, 1998).

C-3. CIM de aminoglucósidos ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Bacterias	Gentamicina	Tobramicina	Amicacina	Netilmicina
<b>Gram-positivas</b>				
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.39	0.5	1.8	0.5
<i>Streptococcus</i> Grupo A	6.3	>25.0	>200	4.0
<i>Streptococcus viridans</i>	4.0	-	>40	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	25.0	25.0	>80	16.0
<b>Gram-negativas</b>				
<i>Haemophilus influenzae</i>	1.0	0.8	5.0	1.0
<i>Salmonella</i>	0.78	0.4	0.8	0.4
<i>Shigella</i>	0.78	0.8	4.0	0.8
<i>Klebsiella</i>	1.0	1.5	3.0	1.0
<i>Escherichia coli</i>		2.0	2.0	0.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3.2	1.6	6.0	8.0
<i>Proteus mirabilis</i>	4.0	1.0	2.0	1.0
<i>Serratia marcescens</i>	1.0	3.0	4.0	3.0

(Utrecht y Walmsley, 1998).

C-4. CIM de tetraciclinas ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Bacterias	Tetraciclina	Doxiciclina	Minociclina
<b>Gram-positivas</b>			
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.19	1.6	0.78
<i>Streptococcus</i> Grupo A	0.78	0.39	0.39
<i>Streptococcus viridans</i>	3.1	0.39	0.39
<i>Enterococcus faecalis</i>	>100	>100	>100
<i>Strptococcus pneumoniae</i>	0.8	0.2	0.2
<b>Gram-negativas</b>			
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.8	1.6	1.6
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.78	0.39	0.39
<i>Haemophilus influenzae</i>	1.6	1.6	1.6
<i>Shigella</i>	100.0	100.0	100.0
<i>Klebsiella</i>	50.0	50.0	25.0
<i>Escherichia coli</i>	12.5	12.5	6.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	200.0	100.0	200.0
<i>Proteus mirabilis</i>	>100	>100	>100
<i>Serratia</i>	200.0	50.0	25.0
<i>Bacteroides fragilis</i>	12.5	-	-
Otros <i>Bacteroides</i>	0.25	-	-
<b>Otros</b>			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1.6	1.6	1.6
<i>Treponema pallidum</i>	0.4	0.1	-
<i>Chlamydia</i>	2.0	2.0	2.0

(Utrecht y Walmsley, 1998).

C-5. Rangos de CIM de cloranfenicol ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Bacterias	Rango de concentración
<b>Gram-positivas</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.0-5.0
<i>Streptococcus Grupo A</i>	0.3-6.0
<i>Streptococcus viridans</i>	0.6-2.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	6.3->100
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.06-12.5
<b>Gram-negativas</b>	
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.78-6.25
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.78-6.3
<i>Haemophilus influenzae</i>	0.2-3.5
<i>Salmonella</i>	0.75-5.0
<i>Shigella</i>	2.5-6.0
<i>Klebsiela</i>	0.5-25.0
<i>Escherichia coli</i>	3.0-50.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.0-1000
<i>Proteus mirabilis</i>	3.0-25.0
<i>Serratia marcescens</i>	2.5-5.0
<i>Bacteroides fragilis</i>	0.5-16.0
Otros <i>Bacteroides</i>	0.1-16.0

(Utrecht y Walmsley, 1998).

C-6. CIM de clindamicina y eritromicina ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Bacterias	Clindamicina	Eritromicina
<b>Gram-positivas</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	0-1	0.5
<i>Streptococcus</i> Grupo A	0.04	0.04
<i>Streptococcus viridans</i>	0.02	0.5
<i>Enterococcus faecalis</i>	100.0	1.5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.01	0.1
<b>Gram-negativas</b>		
<i>Neisseria meningitidis</i>	12.5	0.78
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	3.1	0.94
<i>Haemophilus influenzae</i>	12.5	2.5
<i>Salmonella</i>	>100	>100
<i>Shigella</i>	>100	>100
<i>Klebsiela</i>	>100	>100
<i>Escherichia coli</i>	>100	>100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>100	>100
<i>Proteus mirabilis</i>	>100	>100
<i>Serratia marcescens</i>	>100	>100
<i>Bacteroides fragilis</i>	0.1	1.6
Otros <i>Bacteroides</i>	0.1	1.0

(Utrecht y Walmsley, 1998).

C-7. CIM de rifampina ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Bacterias	$\mu\text{g/ml}$
<b>Gram-positivas</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.001
<i>Streptococcus</i> Grupo A	0.04
<i>Streptococcus viridans</i>	0.05
<i>Enterococcus faecalis</i>	4.0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.05
<b>Gram-negativas</b>	
<i>Neisseria meningitidis</i>	0.016
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0.2
<i>Haemophilus influenzae</i>	0.5
<i>Klebsiella</i>	10.0
<i>Escherichia coli</i>	5.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20.0
<i>Proteus mirabilis</i>	3.9
<i>Serratia</i>	64.0
<i>Bacteroides fragilis</i>	0.26
Otros <i>Bacteroides</i>	0.1
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0.5

(Utrecht y Walmsley, 1998).

C-8. CIM de sulfonamidas y trimetoprim ( $\mu\text{g/ml}$ ).

Bacterias	Sulfonamidas	Trimetoprim
<b>Gram-positivas</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	50.0	0.2
<i>Streptococcus</i> Grupo A	12.5	0.4
<i>Streptococcus viridans</i>	8.0	0.25
<i>Enterococcus faecalis</i>	100.0	1.0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	32.0	1.0
<b>Gram-negativas</b>		
<i>Neisseria meningitidis</i>	5.0	8.0.0
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	4.0	12.0
<i>Haemophilus influenzae</i>	0.5	0.12
<i>Salmonella</i>	10.0	0.4
<i>Shigella</i>	4.0	0.4
<i>Klebsiella</i>	16.0	0.5
<i>Escherichia coli</i>	8.0	0.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25.0	>100
<i>Nocardia</i>	12.5	>100

(Utrecht y Walmsley, 1998).

## 8. Referencias.

**Aguilar A.**, Camacho J.R., Chino S., Jacquez P. y López M.E. (1994). Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. México. IMSS.

**Ames B.N.**, Profet M. y Swirsky L.G. (1990). Dietary pesticides (99.99 % all natural). Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, **87** (19): 7777-7781.

**Andary C.**, Privat G., Chevallet P., Orzalesi H., Serrano J. y Bouchard M. (1980). II Pharmacol., **35**: 3-30.

**Anhalt J.P.**, Sabath L.D. y Barry A.L. (1985). Pruebas especiales: actividad bactericida, actividad de los antimicrobianos combinados y detección de producción de beta-lactamasa. En: Lennette E.H. (editor). Manual de Microbiología Clínica. 4ª edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. Pp. 579-587.

**Asakawa Y.** (1990). Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity from bryophytes. In: Zinmeister H.D. (ed). Bryophytes, their chemistry and chemical taxonomy. Oxford, England. Clarendon-Press. Pp. 394-397.

**Avila A. J.G.**, Martínez Cortés G. y Muñoz López J.L. (1993). *In vitro* Antimicrobial Activity of Various Plant Extracts used by Purepecha against some Enterobacteriaceae. International Journal of Pharmacognosy, **31**(1): 61-64.

**Avila J.G.**, Golberg de Liverant J., Martínez A., Martínez G., Muñoz J.L., Arciniegas A. y Romo de Vivar A. (1999). Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. Journal of Ethnopharmacology, **66**: 75-78.E

**Avila J.G.** y Romo de Vivar A. (2002). Triterpenoid saponins and other glycosides from *Buddleja scordioides*. Biochemical Systematics and Ecology, **30**: 1003-1005.



**Baquero F.** y Blazquez J. (1997). Evolution of antibiotic resistance. *Trends in Ecological Evolution*, **12**: 482-487.

**Barry A. L.** y Thornsberry C. (1987). Pruebas de susceptibilidad: Técnicas para pruebas de difusión. En: Lennette E.H. (editor). *Manual de Microbiología Clínica*. 4ª Edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana Argentina. Pp. 561-574.

**Benavente-García O.**, Castillo J., Lorente J., Ortuño A. y Del Río J.A. (2000). Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europea* L. leaves. *Food Chemistry*, **68**: 457-462.

**Bieber L. W.**, Da Silva Filho A.A., Correa Lima R.M.O., Chiappeta A.A., Do Nascimento S.C., De Souza I. A., De Mello J.F. y Veith H. J. (1986). Anticancer and antimicrobial glycosides from *Ipomoea bahiensis*. *Phytochemistry*, **25** (5): 1077-1081.

**Borris R.P.** (1996). Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*, **51**: 29-38.

**Brantner A.**, Males Z., Pepeljnjak S. y Antolic A. (1996). Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* Mill. *Journal of Ethnopharmacology*, **52**: 119-122.

**Brooks G.f.**, Butel J.S. y Morse S.A. (2002). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Edición 17. México. El Manual Moderno.

**Brul S.** y Coote P. (1999). Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, **50**: 1-17.

**Bustamante M.E.** (1992). La situación epidemiológica de México en el siglo XIX. En: *Ensayos sobre la historia de las epidemias en México*. México. Colección Salud y Seguridad Social, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

**Cassady J. M., Baird W.M. y Chang C. J. (1990).** Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Journal of Natural Products*, **53** (1): 23-41.

**Chang S.T., Chen P.F. y Chang S.C. (2001).** Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, **77**: 123-127.

**Chawla V.K., Gupta A.S., Passannanti S. y Paternostro M.P. (1989).** Constituents of *Buddleia* species leaves. *Fitoterapia*, **52**(5): 235-237.

**Chopra I., Hodgson J., Metcalf B. y Poste G. (1997).** The search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **41**: 497-503.

**Chopra I. (1998).** Research and development of antibacterial agents. *Current Opinion in Microbiology*, **1**: 495-501.

**Chu D.T.W., Plattner J.J. y Katz L. (1996).** New directions in antibacterial research. *Journal of Medicinal Chemistry*, **39** (20): 3853-3874.

**Cooper R., Solomon P.H., Kub I., Nakanishi K., Shooleri J.N. y Occolowitz J.C. (1980).** Myricoside, an african armyworm antifeedant: separation by droplet countercurrent chromatography. *Journal of American Chemical Society*, **102**: 7953-795.

**Cory M. (1996).** Computer-assisted drug design. In: Munson P.L., Mueller R.A. y Breese G.R. (eds). *Principles of pharmacology*. USA. Chapman and Hall. P. 1522.

**Cowan M.M. (1999).** Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12** (4): 564-582.

**Davis B. D. y Dulbecco R.** (1996). Aspectos moleculares de la replicación y variación del DNA. En: Davis R. D., Dulbecco R., Eisen H. N. y Ginsberg H. S. (editores). Tratado de Microbiología. 4ª Edición. México. Masson. Pp. 166-168.

**Didry N., Seidel V., Dubreuil L., Tillequin F. y Bailleul F.** (1999). Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*. Journal of Ethnopharmacology, **67**: 197-202.

**Ding N., Yahara S. y Nohara T.** (1992). Structure of mimengosides A and B, new triterpenoid glycosides from *Buddlejae Flos* produced in China. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **40** (3): 780-782.

**Eisenberg D.M., Kessler R.C., Foster C., Norlock F.E., Calkins D.R. y Delbanco T.L.** (1993). Unconventional medicine in the United States: prevalence, costs, and patterns of use. New England Journal of Medicine, **328**: 246-252.

**Eloff J.N.** (1998). Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? Journal of Ethnopharmacology, **60**: 1-8

**Evans W.C.** (1991). Trease-Evans Pharmacognosia. Edición 13. México. Interamericana Mc Graw-Hill. Pp. 65-71.

**Faruque S.M., Albert M.J. y Mekalanos J.J.** (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, **62**(4): 1301-1314.

**Feio S.S., Gigante B., Roseiro J.C. y Marcelo-Curto M.J.** (1999). Antimicrobial activity of diterpene resin acid derivatives. Journal of Microbiological Methods, **35**: 201-206.

**Fernández** M. A., García M. D. y Sáens M. T. (1996). Antibacterial activity of the phenolic acid fractions of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, **53**: 11-14.

**Finegold** S.M. y Jo Baron E. (1989). *Diagnóstico Microbiológico*. 7ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. Pp.191-210.

**Fischer** N.H. (1991). Sesquiterpenoid lactones. In: Charlwood B.V. and Banthorpe D.V. (eds). *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 7 Terpenoids. Series. Dey P.M. (ed). San Diego, California. USA. Academic Press. Pp. 187-210.

**González** S.N. y Saltigeral S.P. (1992). *Cólera*. Conceptos actuales. México. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill.

**Gören** N., Jakupovic J. y Topal S. (1992). Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum jensum* subesp. *sivasicum*. *Phytochemistry*, **30** (1): 101-104.

**Hamburger** M. y Hostettmann K. (1991). Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, **30** (12): 38643874.

**Hancock** R.E.W. y Strohl W.R. (2001). Antimicrobials in the 21<sup>st</sup> century. Editorial overview. *Current Opinion in Microbiology*, **4**: 491-492.

**Harborne** J.B.(1989). *Phytochemical methods*. 2<sup>nd</sup> Edition. London. Chapman and Hall.

**Harborne** J.B. y **Baxter** H. (1993). *Phytochemical dictionary*. Great Britain. Taylor and Francis.

**Harvey** S.C. (1982). Antisépticos y desinfectantes; fungicidas; ectoparasiticidas. En: Goodman A., Goodman L.S. y Gilman A. (Editores). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Sexta edición. México. Editorial Médica Panamericana. Pp 950-972.

**Harvey A.** (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, **5** (7): 294-300.

**Haynes R.H.** (1966). The interpretation of microbial inactivation and recovery phenomena. *Radiation Research Supplement*, **6**: 1-29.

**Helander I.M., Alakomi H.L., Kala K.L., Sandholm T.M., Pol I., Smid E.J., Gorris L.G.M. y von Wright A.** (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **46** (9): 3590-3595.

**Hendrickson D.A.** (1987). Reactivos y colorantes. En: Lennette E.H. (Ed). *Manual de Microbiología Clínica*. 4ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana.

**Hess S. C., Brum R. L., Honda N. K., Cruz A. B., Moretto E., Cruz R. B., Messana I., Ferrari F., Cechinel F. V. y Yunes R. A.** (1995). Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Vochysia divergens* (Vochysiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **47**: 97-100.

**Hollinger M.A.** (1997). *Introduction to pharmacology*. Washington. Taylor y Francis. Pp.218-219.

**Houghton P.J.** (1984). Ethnopharmacology of some *Buddleia* sp. *Journal of Ethnopharmacology*, **11**: 293-308.

**Houghton P.J.** (1985). Phenylpropanoid glycosides in *Buddleia davidii*. *Journal of Natural Products*, **8**(6): 1005-1006.

**Houghton P.J., Woldemariam T.Z., Candau M., Barnardo A., Omedele K. y Li S.** (1996). Buddlejone, a diterpene from *Buddleja albiflora*. *Phytochemistry*, **42** (2): 485-488.

**Ibrahim R.** y Barrón D.(1989). Phenylpropanoids. In: Harborne J. (ed). Methods in Plant Biochemistry. Vol.1. USA. Academic Press Limited.

**INI** (Instituto Nacional Indigenista). (1994). Flora medicinal indígena de México. México. Instituto Nacional Indigenista. Vols. 1-3: 155, 261, 1096, 1370.

**Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos** (INDRE). (1991). Situación de cólera en México. Boletín. Quincenal Colera/Diarreas Infecciosas, **1**(5): 1.

**Joklik W.K.**, Willett H.P., Amos D.B. y Wilfert C.M. (eds) (1992). Zinsser Microbiology, 20<sup>th</sup> Edition. Norwalk, Connecticut. Appleton and Lange.

**Jones R.N.**, Barry A.L., Gavan T.L. y Washington II J.A. (1987). Pruebas de susceptibilidad: Técnicas de microdilución y macrodilución en caldo. En: Lennette E.H. (ed). Manual de Microbiología Clínica. 4<sup>a</sup> Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. Pp. 1206-1212.

**Kaper J.B.**, Morris J.B. y Levine M.M. (1995). Cholera. Clinical Microbiological Reviews, **8**: 48-86.

**Karaolis D.K.R.**, Johnson J.A., Bailey C.C., Boedeker E.C., Kaper J.B. y Reeves P.R. (1998). A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, **95**: 3134-3139.

**Karlin S.** (2001). Detecting anomalous gene clusters and pathogenicity islands in diverse bacterial genomes. Trends in Microbiology, **9**(7): 335-343.

**Kelly S.G.** y Post F.J. (1991). Microbiology techniques. USA. Star Publishing Company. P. 471.

**Khan K. A. y Shoeb A. (1984).** Two antibacterial biphenyls from *Rhynchosia suaveolens*. *Phytochemistry*, **23** (4): 765-766.

**Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R. y Sommers H.M. (1985).** Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana.

**Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenber P.C. y Winn W.C. (1999).** Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. 5ª Edición. España. Editorial Médica Panamericana.

**Konishy K., Ito C. y Kanbara H. (1987).** Tannic acid in membranes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **35**: 1169.

**Kono Y., Kobayashi K., Tagawa S., Adachi K., Ueda A., Sawa Y. y Shibata H. (1997).** Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1335**: 335-342.

**Kubo I. (1993).** Antimicrobial activity of green tea flavor components. In: Teranishi R. and Buttery R.G (Eds). *Bioactive volatile compounds from plants*. Washington D.C. American Chemical Society. Pp. 57-70.

**Kumate J., Sepúlveda J. y Gutiérrez J. (1993).** El Cólera. Epidemias, endemias y pandemias. México. Interamericana Mc Graw-Hill.

**Lacey S.W. (1995).** Cholera: calamitous past, ominous future. *Clinical of Infectious Diseases*, **20**: 1409-1419.

**Lea D.E. (1946).** Actions of radiations on living cells. Cambridge University Press.

**Levy S.B.**(1995). Antimicrobial resistance: a global perspective. In: Jungkind D.L., Mortensen J.E., Fraimow H.S. y Calandra G.B. (eds). Antimicrobial resistance: a crisis in health care. Vol. 390. Series, Advances in experimental medicine and biology. New York. Plenum Press. Pp. 1-13.

**Levy S.B.** (1998). The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American*, **278**(3): 46.

**Lewis N.G.** y **Yamamoto E.** (1990). Lignin: occurrence, biogenesis and degradation. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **41**: 455-496.

**Li X.**, **Cai Z.**, **Katsumura Y.**, **Wu G.** y **Muroya Y.** (2001). Reactions of reducing and oxidizing radicals with caffeic acid: a pulse radiolysis and theoretical study. *Radiation Physics and Chemistry*, **60**: 345-350.

**Liao Y.H.**, **Houghton P.J.** y **Hoult J.R.S.** (1999). Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *Journal of Natural Products*, **62**(9): 1241-1245.

**Lindsay E.A.**, **Berry Y.**, **Jamie J.F.** y **Bremner J.B.** (2000). Antibacterial compounds from *Carissa lanceolata* R. Br. *Phytochemistry*, **55**: 403-406.

**Litter M.** (1986). *Farmacología: Experimental y Clínica*. Séptima Edición. Buenos Aires. Ateneo.

**López J.**, **Sierra J.**, **Vegazo M.E.** y **Cortés M.** (1979). Chemical constituents of *Buddleja globosa* Lam. *Fitoterapia*, **50**: 195-198.

**Lozoya L. X.** (1987). *Flora medicinal de México*. México. IMSS.

**Madigan M.T.**, **Martinko J.M.** y **Parker J.** (1997). *Brock. Biology of microorganisms*. Eighth edition. USA. Prentice Hall.



**Mansoor A.**, Maktoob A. y Gray M. (1992). Biridoside, a new iridoid from *Buddleja davidii*. *Spectroscopic Letters*, **25**(3): 363-374.

**Marin G.**, Giménez B., Cortés M., Pardo F., Núñez J. y Naranjo J. (1977). Estudio fitoquímico de *B. globosa* Lam. Buddlejaceae. *Revista Latinoamericana de Química*, **10**: 19-21. Santiago, Chile.

**Martin F.T.** (1998). Molecular mechanisms of bacterial pathogenicity. *Naturwissenschaften*, **85**: 99-108.

**Maynard S.J.** (1977). Ideas matemáticas en biología. México. Editorial Continental.

**Mc Laughlin J.C.** (1995). Vibrio. In: Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., y Tenover F.C. (eds). *Manual of clinical microbiology*. Washington D.C. American Society for Microbiology, 465-476.

**Mensah A.Y.**, Houghton P.J., Bloomfield S., Vlietinck A. y Vanden Berghe D. (2000). Known and novel terpenes from *Buddleja globosa* displaying selective antifungal activity against dermatophytes. *Journal of Natural Products*, **63**(9) 1210-1213.

**Meyer A.S.**, Heinonen M. y Frankel E.N. (1998). Antioxidant interactions of catechi, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, **61** (1 y 2): 71-75.

**Meynell G.G.** y Maynell E. (1969). *Bacteriología experimental*. Barcelona. Ediciones Omega. Pp. 109-232.

**Mitra R.**, Basu A., Dutta D., Nair G.B. y Takeda Y. (1996). Resurgence of *Vibrio cholerae* O 139 Bengal with altered antibiogram in Calcutta, India. *Lancet*, **348**: 1181.

**Mitscher** L. A., Gollapudi S. R., Oburn D. S. y Drake S. (1985). Antimicrobial agents from higher plants: two dimethylbenziso-chromans from *Karwinskia humboldtiana*. *Phytochemistry*, **24** (8): 1681-1683.

**Mitscher** L. A. (1988). Antimicrobial pterocarpanes of Nigerian *Erythrinus mildbraedii*. *Phytochemistry*, **27** (11): 3449-3452.

**Miyase** T., Akahori C., Kohsaka H. y Ueno A. (1991). Acylated iridoid glycosides from *Buddleja japonica*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **39**(11): 2944-2951.

**Moats** W.A., Dabbah R. y Edward V.M. (1971). Interpretation of non-logarithmic survivor curves of heated bacteria. *Journal of Food Science*, **36**: 523-526.

**Molgaard** P. y Ravn H. (1988). Evolutionary aspects of caffeoyl esters distribution in dicotyledons. *Phytochemistry*, **27**: 2411-2421.

**Mori** A., Nishino C., Enoki N. y Tawata S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, **26** (8): 2231-2234.

**Moseley** B.E.B. y Laser H. (1965). Similarity of repair of ionizing and ultraviolet radiation damage in *Micrococcus radiodurans*. *Journal of Bacteriology*, **97**: 647-652..

**Moseley** B.E.B. (1967). Repair of ultraviolet radiation damage in sensitive mutants of *Micrococcus radioduran.*, *Journal of Bacteriology*, **97**: 647-652.

**Murray** P.R., Kobayashi G.S., Pfaller M.A. y Rosenthal K.S. (1997). *Microbiología Médica*. Segunda Edición. Barcelona. Harcourt Brace.

**Nishibe F., Okabe K., Sukamoto H., Sacoshima A., Hisada F., Baba H. y Akisada P.** (1982). Studies on the chinese crude drug "Forsythiae fructus" VI. The structure and antibacterial activity of suspensaside isolated from *Forsythia suspensa*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, **30**: 4548-4553.

**Norman E.M.** (1967). The genus *Buddleia* in North America. Gentles Herbarum, **10**:1-116.

**Organización Panamericana de la Salud.** Organización Mundial de la Salud. World Health Organization. (1992). Cholera in 1991. Weekly Epidemiol. Rec., **67**: 253-260.

**Organización Panamericana de la Salud.** Organización Mundial de la Salud. (2002). Cólera: número de casos y defunciones en las américas (1991-2001, por país y año). Boletín, 2002.

**Pardo F., Perich F., Villarroel L. y Torres R.** (1993). Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. Journal of Ethnopharmacology, **39**: 221-222.

**Rabe T. y van Staden J.** (2000). Isolation of an antibacterial sesquiterpenoid from *Warburgia salutaris*. Journal of Ethnopharmacology, **73**: 171-174.

**Rajan P., Vedernikova S., Cos P., Vanden Berghe D., Augustyns K. y Haemers A.** (2001). Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants. bioorganic and medicinal chemistry. Letters, **11**: 215-217.

**Raufman J.P.**(1998). Cholera. The American Journal of Medicine, **104** (4): 386-394.

**Ritch-Krc (a) E. M., Thomas S., Turner N. J. y Towers G. H. N.** (1996). Carrier herbal medicine: traditional and contemporary plant use. Journal of Ethnopharmacology, **52**: 85-94.

**Ritch-Krc (b)** E. M., Turner N. J. y 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.

**Roeder** E., Wiedenfeld H. y Hoening A. (1985). Isolation of a new tricyclic piperidine alkaloid from *Buddleja davidii*. *Planta Medica*, **2**: 164-165.

**Russell** A.D., Hugo W.B. y Ayliffe G.A.J. (eds) (1992). Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Second Edition. Oxford. Blackwell Scientific Publications. Pp. 544-556.

**Rzedowsky** J. y Rzedowsky G. (1985). Flora Fanerogámica del Valle de México. Vol. II: Dicotyledoneae. México. Ed. E.N.C.B. Pp. 212-215.

**Sack** R.B., Albert M.J. y Siddique A.K. (1996). Emergence of *Vibrio cholerae* O139. *Current Clinical Topics of Infectious Diseases*, **16**:172-193.

**Sánchez** J.L. y Taylor D.N. (1997). Cholera. *Lancet*, **349** (9068): 1825.1830.

**Scalbert** A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, **30**(12): 3875-3883.

**Schnürch** A.B., Krist S., Vehabovic M. y Valenta C. (1998). Synthesis and evaluation of lyzozyme derivatives exhibiting an enhanced antimicrobial action. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **6**: 301-306.

**Secretaría de Salud**. (1991). Boletín de información sobre cólera. México. DGE.

**Shoenknecht** F.D., Sabath L.D. y Thornsberry C. (1987). Pruebas especiales de susceptibilidad. En: Lennette E.H.(Ed). *Manual de Microbiología Clínica*. 4ª Edición. Buenos Aires, Argentina. Editorial Médica Panamericana. Pp. 1239-1249.

**Solomons** T.W.G. y **Fryhle** C.B. (2000). *Organic Chemistry*. 7<sup>th</sup> Edition. New York. John Wiley.

**Stermitz** F.R., **Lorenz** P., **Tawara** J.N., **Zenewics** L.A. y **Lewis** K. (2000). Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydrnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of National Academy of Sciences*, **97** (4):1433-1437.

**Suffness** M. y **Douros** J. (1981). Current status of the NCI plant and animal product program. *Journal of Natural Products*, **45** (1): 1-14.

**Swerdlow** D.L. y **Rics** A.A. (1993). *Vibrio cholerae* non-O1: the eight pandemic? *Lancet*, **342**:382-383.

**Trace** B. (1993). *Tratado de farmacognosia*. 15<sup>a</sup> Edición. México. Editorial Interamericana. Pp. 730-732.

**Tsai** T.H., **Chen** Y.F., **Chen** I.F. y **Chen** C.F. (1999). Measurement of unbound caffeic acid in rat blood by on-line microdialysis coupled with liquid chromatography and its application to pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, **729**: 119-125.

**Tsuchiya** H., **Sato** M., **Miyazaky** T., **Fujiwara** S., **Tanigaki** S., **Ohyama** M., **Tanaka** T. y **linuma** M. (1996). Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, **50**: 27-34.

**Tyrrell** R.M., **Moss** S.H. y **Davies** D.J.G. (1972). The variation in u.v. sensitivity of four K12 strains of *Escherichia coli* as a function of their stage of growth. *Mutation Research*, **16**: 1-12.

**Utrecht J.** y **Wamsley S.L.**(1998). Principles of antimicrobial therapy. In: Harold Kalant and Walter H.E. (eds). Principles of medical pharmacology. Sixth Edition. Oxford, USA. Oxford University Press. Pp 650-655.

**Ursúa A.**, **Torres R.**, **Muñoz M.** y **Palacios Y.** (1995). Comparative antimicrobial study of the resinous exudates of some Chilean *Haplopappus* (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology, **45**: 71-74.

**Vanden Berghe D.A.** y **Vlietnick A.J.** (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Hostettmann K (ed). Methods in Plant Biochemistry. Vol. 6 Assays for Bioactivity. Series. Dey P.M. (ed). New York. Academic Press. Pp. 47-71.

**Verpoorte R.** (1998). Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. Drug Discovery Today, **3**: 232-238.

**Vijaya K.**, **Ananthan S.** y **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.

**Vollhardt K.P.** y **Schore N.E.** (1999). Organic chemistry: structure and function. 3<sup>rd</sup> Edition. New York. W.H. Freeman.

**Waage S. K.** y **Hedin P. A.** (1984). Biologically-active flavonoids from *Gossypium arboreum*. Phytochemistry, **23** (11): 2509-25-11.

**Waage S. K.**, **Hedin P. A.** y **Grimley E.** (1984). A biologically-active procyanidin from *Machaerium floribundum*. Phytochemistry, **23** (12): 2785-2787.

**Wachsmuth** I.K., Olsvic O., Evins G.M. y Popovic T. (1994). The molecular epidemiology of cholera. In: Wachsmuth K., Blake P.A., y Olsvic O. (eds). *Vibrio cholerae* and cholera: molecular to global perspectives. Washington D.C. American Society for Microbiology. Pp. 357-370.

**Wang** Y., Hamburger M., Gueho J. y Hostettmann K. (1989). Antimicrobial flavonoids from *Psiadia trinervia* and their methylated and acetylated derivatives. *Phytochemistry*, **28** (9): 2323-2327.

**Yamamoto** A., Miyase T., Ueno A. y Maeda T. (1991). Buddleja saponins I-IV, four new oleanane-triterpene saponins from the aerial parts of *Buddleja japonica* Hemsl. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **39** (10): 2764-2766.

**Yoshida** T., Nobuhara J., Uchida M. y Okuda T. (1978). 1-Studies on the constituents of *Buddleja* species. Y structures of buddledin a and b, two new toxic sesquiterpenes from *Buddleja davidii*. Franch. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **26**(8): 2535-2542.

**Yoshida** T., Nobuhara J., Fiji N. y Okuda T. (1978). 2- Studies on the constituents of *Buddleja* species. Ii buddledin c, d, and e, new sesquiterpenes from *Buddleja davidii*. Franch. *Chemical and Pharmacological Bulletin*, **26**(8): 2543-2449.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA