



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA.**

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CINCO
NEGRITOS BLANCO (*Lantana
achyranthifolia* Desf.: VERBENACEAE)**

TESIS PROFESIONAL A
NIVEL LICENCIATURA
QUE PARA OBTENER
EL TÍTULO DE
B I O L O G O
ES PRESENTADA POR:

Roberto Garcilazo Tovar

Bajo la Asesoría y Dirección de:
**M. en C. Claudia Tzasna Hernández
Delgado.**



**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo. Mex
septiembre 2003**



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.

Proyecto realizado en el Laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.

Con financiamiento de El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Proyecto con número de registro 400389G35450-V VR2130.

El presente trabajo es fruto del trabajo de equipo de: M. en C. Claudia Tzasna Hernández Delgado en la dirección, M. en C. Margarita Canales Martínez en la co-Dirección, quienes con su asesoría a sus alumnos y su vigilancia para equivocarnos lo menos posible nos cuidaron a sus alumnos como si fuéramos sus hijos. M. en C. Ana María García Bores y el Dr. J. Guillermo Ávila Acevedo con sus asesorías técnicas y académicas. El Maestro Andres Martínez C., El biólogo Gabriel M. Cortez y el Psicólogo Rodolfo Barroso con sus asesorías técnicas en el laboratorio. Mis compañeras Claudia Isela Guijon Ibarra y Rocio Serrano Parrales y junto con un servidor nos colaborábamos mutuamente en nuestros respectivos proyectos, aprendiendo de nuestras experiencias, errores y aciertos.

CADA MOMENTO DE ÉXITO ES EL
CONJUNTO DE ESPUERZOS
PERSONALES APOYADOS POR UN
CUMULO DE INDIVIDUOS.
ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO A
LA ENERGIA UNIVERSAL QUE LE DA
PERFECCIÓN A LA BIODIVERSIDAD
MEDIANTE LOS ENLACES
MOLECULARES ATOMICOS Y
SUBATOMICOS, A MI PROGENITORA
E INDIVIDUOS DE MI ESPECIE (*)
QUE ME IMPULSARON:
“ARRIBA Y ADELANTE”.

***Con mención especial aparte de mi mami Concha, mis “sisters” Sandra G. y Rocio G., mi “brother” Jesús G., mis “enanos” Christian, Gerardo, Ricardo y Fernando, mis “hijas” Elvia L., Lorena y Heidi P.C. esta ultima con su paciencia me hizo comprender lo necio que soy; mis “up-line” Octavio J. y su esposa Patricia V., vectores de cambio en mi vida profesional.**

“De quien más esperaba recibí poco y a quien poco pedí me dio de sobra. Lo poco, lo mucho. Gracias.”

Roberto Garcilazo T.

ÍNDICE GENERAL

INDICE GENERAL.....	I
INDICE DE TABLAS.	III
INDICE DE FIGURAS E ILUSTRACIONES.	III
INDICE DE ESPECTROS DE LOS COMPUESTOS QUIMICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	IV
ABREVIATURAS UTILIZADAS.	V
RESUMEN.....	VII
INTRODUCCION.	1
Importancia de las plantas medicinales.	1
Investigaciones farmacológicas.	3
Antibacterianos de origen vegetal.	4
Factores que promueven la producción de compuestos con actividad antibacteriana.	6
Importancia de los aceites esenciales.	8
ANTECEDENTES.	12
Plantas con propiedades antidiarreicas.....	12
Estudios Fitoquímicos.	12
Especies del genero <i>Lantana</i>	13
DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA.	15
Botánica.	15
Etnobotanica.....	16
Ecología y distribución.	18
JUSTIFICACION.....	20
OBJETIVOS.	21
General.	21
Particulares.	21
MATERIAL Y METODOS.	22
Colecta y secado de la planta.	22
Obtención de los aceites esenciales.	22
Obtención de extractos por percolación.	22

Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.	22
Microorganismos utilizados.	23
Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.	23
Identificación de compuestos constituyentes de los aceites esenciales.	23
RESULTADOS.	25
Rendimientos de los aceites esenciales y los extractos.	25
Evaluación cualitativa de los aceites esenciales y los extractos.	26
Evaluación cuantitativa de los aceites esenciales y los extractos.	29
Identificación de los compuestos presentes en los aceites esenciales.	31
ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	33
Generalidades de la planta.	33
Rendimientos.	33
Actividad antibacteriana de los extractos.....	34
Aceites esenciales: Composición química.	35
Aceites esenciales: Actividad antibacteriana.	36
CONCLUSIONES.	39
PERSPECTIVAS.	40
REFERENCIAS.....	41
APÉNDICES.	48
I.- Estructuras químicas de compuestos previamente identificados en <i>L. achyranthifolia</i>	48
II.- Destilación por arrastre de vapor.	49
III.- Extracción por percolación.	50
IV.- Difusión en agar de Kirby-Bauer.	51
V.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM).	54
VI.- Régimen pluvial de Zapotitlán de las Salinas Puebla.....	57
VII.- Espectros de los compuestos detectados en los aceites esenciales.....	58

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1.- Datos generales de la planta <i>Lantana achyranthifolia</i> Desf.....	25
Tabla 2.- Rendimiento de los extractos obtenidos por percolacion de <i>L. achyranthifolia</i> ..	25
Tabla 3.- Actividad antibacteriana de los diferentes extractos y los aceites esenciales de <i>Lantana achyranthifolia</i> Desf.	26
Tabla 4.- Análisis de varianza de los halos de inhibición mostrados por las bacterias ante los extractos.....	29
Tabla 5.- CMI y CBM de los extractos activos y los aceites esenciales de <i>Lantana achyranthifolia</i> Desf.	30
Tabla 6.- Compuestos identificados en los aceites esenciales de <i>L. achyranthifolia</i> Desf., mediante análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.....	31

INDICE DE FIGURAS E ILUSTRACIONES.

Figura 1.- "Cinco Negritos Blanco" (<i>Lantana achyranthifolia</i> Desf.).....	17
Figura 2.- Distribución de <i>L. achyranthifolia</i> Desf en la República Mexicana.....	19
Figura 3. - Comparación de la actividad antibacteriana basados en los halos de inhibición.....	26
Figura 4. - Comparación de la actividad antibacteriana de los extractos y los aceites esenciales.....	28
Figura 5.- Estructuras químicas de compuestos identificados previamente en <i>L. achyranthifolia</i>	48
Figura 6.- Destilación por arrastre de vapor.	49
Figura 7.- Diagrama del proceso de percolación.	50
Figura 8.- Temperatura y precipitación de Zapotitlán de las Salinas Puebla.....	57

ÍNDICE DE ESPECTROS DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS DE LOS ACEITES ESENCIALES.

1.- 1,8 cineol.....	58
2.- Acetato de terpineno.....	59
3.- Linalol.....	60
4.- Alcanfor.....	61
5.- Terpinen-4-ol.....	62
6.- 4-(1,1-dimetiletil) Bencenometanol.....	63
7.- Acetato de borneol.....	64
8.- Carvacrol.....	65
9.- 4-etenil-4-metil-3-(1-metiletenil)-1-(1-metiletil) Ciclohexeno.....	66
10.-4Isopropil-3,7-dimetil-3 ^a ,3b,4,5,6,7-hexahidro-1H- ciclopenta (1,3)ciclopropa(1,2)benceno.....	67
11 .- Minacida.....	68
12 Y 19.- Candina 4(5), 10(14) dieno.....	69
13.- Guaia 1(10), 11(12) dieno.....	70
14 Y 16.- Isocariofileno.....	71
15.- 1-etenil-1-metil-2-(1-metiletenil)-4-(1-metiletil) Ciclohexano.....	72
17.- Humuleno.....	73
18.- Aristol 1(10) eno.....	74
20.- 1H-ciclopenta 1,3 ciclopropa octahidro-7-metil -3-metilen, 1,2 benceno.....	75
21.- β -bisaboleno.....	76
22 Y 27.- α -bisabolol.....	77
23.- β -cadineno.....	78
24.- hexahidro-1,4,9,9-tetrametil,1H-3a,7-metanoazuleno.	79
25.- Himachaleno.....	80
26.- 1,2,4a,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil), Naftaleno.....	81
28.- Cedreno.....	82

ABREVIATURAS UTILIZADAS.

A. C.	Asociación civil.
a.C.	Antes de Cristo
AcOEt	Acetato de etilo
Bs	<i>Bacillus subtilis</i>
CBM	Concentración bactericida mínima.
cc	Caso clínico
cm	centimetro
CMI	Concentración mínima inhibitoria
dm ⁻³	sobre decimetro cúbico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Eae	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Eag	<i>Enterobacter agglomerans</i>
EtOH	Etanol
eV	electron volt
g	gramo
GABA _A	Neutroreceptor tipo A del ácido gama aminobutírico.
hrs	horas
ie.	Por ejemplo
Imeplam	Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
kg	kilogramo
Kpa	Kilopascal
LD ₅₀	Dosis letal media
m	metro
MeOH	Metanol
µg	microgramo
mg	miligramo
µl	microlitro
ml	mililitro
mm	milimetro
mmol	milimol
msnm	metros sobre el nivel mar
NA	No mostró actividad
NAPRALERT	Natural Products Alert Chicago Illinois
ND	No determinada
nm	nanometro
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
precip	precipitación
Psi	Libra fuerza por pulgada

Sa	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sb	<i>Shigella boydii</i>
Se	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Sl	<i>Sarcina lutea</i>
St	<i>Salmonella typhi</i>
temp	temperatura
TR	Tiempo de retención
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
UV	Ultravioleta
V.ch	<i>Vibrio cholerae</i>
v/v	volumen por volumen
WWF	World Wide Fund for Nature
Ye	<i>Yersinia enterocolitica</i>

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CINCO NEGRITOS BLANCO. (*Lantana achyranthifolia* Desf.: VERBENACEAE).**RESUMEN.**

El uso de las plantas medicinales tiene sus orígenes en los albores de la humanidad. La proporción de especies medicinales puede variar sensiblemente, ya que aún se desconoce la totalidad de la flora. Muchas plantas y compuestos continúan sin verificarse sus propiedades, tal es el caso de *Lantana achyranthifolia* especie utilizada en Zapotitlán de las Salinas Puebla, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico extraídos por percolación y los aceites esenciales obtenidos por arrastre de vapor de las partes aéreas fueron evaluados en cuanto a la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar de Kirby-Bauer sobre catorce cepas. Los extractos mostraron actividad antibacteriana con cuatro bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Sarcina lutea* y *Bacillus subtilis*) y una bacteria Gram negativa (*Shigella boydii*), los aceites esenciales fueron activos sobre las catorce cepas. El extracto de acetato de etilo mostró los parámetros microbiológicos más bajos (CMI 0.25mg/mlb y CBM 0.50mg/ml). El extracto metanólico mostró los parámetros microbiológicos más altos (CMI 1.50mg/mlb y CBM 2.00mg/ml). El análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de los aceites esenciales arrojó 25 compuestos de los cuales sobresalen: carvacrol (30.64%), isocariofileno (11.82%) y α -bisabolol (11.23%).

Palabras clave:

Lantana achyranthifolia, actividad antibacteriana, extractos herbales, aceites esenciales, Verbenaceae.

INTRODUCCIÓN.

Importancia de las plantas medicinales.

La relevancia de las plantas con usos medicinales es innegable. A lo largo de la historia de la humanidad han quedado registros que proporcionan información acerca de plantas y sus usos etnomédicos. En China y el resto de Asia existen registros del uso de plantas para tratar enfermedades que se remonta a más de 10,000 años. En la época de los sumerios, los asirios, los babilonios y los fenicios, los herbarios eran importantes principalmente por las aplicaciones terapéuticas. En la Biblia están descritas unas 200 plantas medicinales y sus aplicaciones. El Papiro de Ebers (1700 a.C.), encontrado en las ruinas de Luxor, contiene descripciones de enfermedades e indicaciones para tratarlas con plantas mencionando hasta 700 especies. Entre los griegos y romanos, Dioscórides, en su obra "*De Materia Medica*", describe más de 600 plantas de uso medicinal (Domínguez, 1973).

En la Nueva España Bernardino de Sahagún realizó una compilación de fuentes Náhuatl, registrada en el código Florentino (Ortiz, 1986), en 1582 este fraile tradujo al castellano libros como " Historia General de las Cosas de la Nueva España"; "Problemas y escritos maravillosos de los indios" de Juan Cárdenas escrito en 1519, "Tesoro de la medicina o de las plantas medicinales de la Nueva España" de Gregorio López escrito en 1580 y el "*Libellus de Medicinalibus indorum herbis*" o "Libro de las hierbas medicinales de los indios" escrito por Martín de la Cruz y traducido por Juan Badiano (Gutiérrez, 1989).

Todos estos registros han servido como fuente de información acerca de muchas plantas y usos terapéuticos. Más hoy en día, todavía una gran proporción de conocimientos son transmitidos verbalmente, principalmente en tribus y comunidades de África y América (Domínguez, 1973).

En décadas recientes se han perfeccionado métodos para la obtención de nuevos fármacos, a partir de las plantas usadas en practicas etnomédicas. Tales métodos se les encuentra en disciplinas como la Etnobotánica y la Farmacognosia. La primera disciplina abarca el

estudio de las relaciones hombre-planta en tiempo y espacio, su estudio implica la historia de tal relación, procesos de aprendizaje, beneficios y utilidades de los recursos naturales, tales estudios muestran a plantas de usos diversos, tanto de orden alimenticio como forrajero o medicinal, desprendiéndose otra área como la Botánica Económica en cuanto a la explotación racional de tales recursos. La Farmacognosia es una ciencia multidisciplinaria que abarca conocimientos de los constituyentes químicos de las plantas, métodos de identificación y de cómo diferentes culturas las han empleado en su beneficio poniendo especial atención en sus aplicaciones médicas (Trease y Evans, 1991).

Los estudios etnobotánicos y farmacognósicos han sobresalido de tal forma, que han despertado el interés de organizaciones como El Fondo Mundial para la Naturaleza (WWF), la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, Ciencia y Cultura (UNESCO), El Real Jardín Botánico de Kew, La Organización Darwiniana para la supervivencia de Especies y el Departamento de Bosques Tropicales del Departamento de Agricultura del Reino Unido, entre otros quienes han destinado recursos para la conservación, recabación y aprovechamiento de tal conocimiento (Martín, 1990).

En México en 1975, bajo el auspicio del Poder Ejecutivo Federal surge el Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales A. C. (Imeplam) el cual pone de manifiesto la importancia de los recursos de la medicina popular a la medicina oficial y sus instituciones. Esta experiencia fue reconocida en 1981 por el IMSS al crearse el instituto del Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Herbolaria. La creación de este Centro ha servido para dar a conocer en el país los estudios e investigaciones experimentales, farmacológicas o fitoquímicas de las plantas medicinales (Aguilar *et al.*, 1994).

Argueta *et al* (1994) calculan que se conocen unas 260,000 especies de plantas a nivel mundial de las cuáles el 10% se pueden considerar medicinales. La proporción de especies medicinales varía sensiblemente cada año, ya que aún se desconoce la totalidad de la flora. En México se conocen registros donde se menciona alrededor de 3130 especies empleadas como medicinales y de estas 1024 son usadas para curar enfermedades del aparato

digestivo. Aguilar *et al* (1994) mencionan a las enfermedades por predominancia tratadas con plantas, donde el primer lugar es ocupado por las gastrointestinales, seguida de aquellas relacionadas con el aparato reproductor femenino, traumatismos, enfermedades del llamado “síndrome de filiación cultural”, del aparato urinario, del sistema músculo-esquelético, del aparato circulatorio y del sistema nervioso

Estudios como el anterior realzan la importancia de esta fuente natural destacando su relevancia en la medicina tradicional popular mexicana y ha representado desde siempre una alternativa terapéutica para poblaciones de bajos recursos (Aguilar y Camacho, 1985). Esto se ha notado en regiones donde la medicina moderna ha sustituido por completo a la tradicional, sin embargo los costos restringieron su uso a los grupos con mayor poder adquisitivo, obligando con esto, al resto de la población el retornar a prácticas alternativas (Simmond y Grayer, 1999).

Investigaciones farmacológicas.

Hasta el momento se han identificado una cantidad incalculable de compuestos químicos aislados de plantas medicinales, registrados en bases de datos a partir de publicaciones (ie. NAPRALERT Natural Products Alert Chicago Illinois). Sin embargo las bases de datos se encuentran incompletas en parte a que empresas privadas reservan sus conocimientos para su beneficio (Simmond y Grayer, 1999).

Para comprobar las propiedades de la planta, se han aislado e identificado compuestos partiendo de criterios sociales, geográficos y etnobotánicos, siendo estos últimos los que proporcionan más información. Otra técnica de localización de compuestos es aprovechar la quimiotaxonomía, buscando en otras plantas del mismo género ó familia al cual pertenece la especie de donde inicialmente fueron identificados los compuestos con determinada actividad (Simmond y Grayer, 1999).

Muchos compuestos tienen propiedades diversas (antivirales, antibacterianos, antifúngicos, insecticidas, alelopáticos, etc.). En los estudios farmacológicos aquellos compuestos que

son inespecíficos en contrarrestar agentes patológicos se dejan de lado, buscando opciones que exhiban acción más directa ó modificando estructuras químicas hasta obtener aquellas que cumplan con el objetivo deseado (Simmond y Grayer, 1999).

Hay que notar que muchas especies vegetales usadas para aliviar padecimientos estomacales presentan compuestos que actúan de diversas formas. Algunos combaten a bacterias generadoras de patologías, otros a los proceso de inflamación, otros como los pinenos poseen propiedades irritantes y por último algunos regulan la transmisión del receptor GABA_A ionotrópico cambiando el estado de ánimo de la mente humana como lo hace el alcohol simulando estados de alivio (Cobos *et al.*, 2001; Pascual *et al.*, 2001; Simmond y Grayer, 1999).

Antibacterianos de origen vegetal.

Los antibacterianos de origen natural pueden ser divididos en varias categorías. Aquí se mencionará una categoría basada en sus estructuras químicas. Polifenoles (Acidos fenólicos y fenoles simples, quinonas, flavonas, flavonoides y flavonoles, taninos y coumarinas), terpenoides y aceites esenciales, alcaloides, lectinas, polipéptidos y poliacetatos (Murphy, 1999).

La actividad de los polifenoles radica en la presencia de los grupos hidroxilo (OH⁻). Existe evidencia de que un aumento en la hidroxilación aumenta la toxicidad contra los microorganismos y que los fenoles altamente oxidados aumentan su actividad antimicrobiana. Se presume que la actividad de los fenoles se realice por interacción con los grupos sulfidrilos (SH) ó interacciones no especificas con las proteínas (Murphy, 1999).

Las quinonas han mostrado un alto potencial para formar complejos irreversibles con aminoácidos nucleofílicos de proteínas. Probablemente inactivan las células microbianas al establecer vínculos con las adhesinas expuestas en la superficie celular, polipéptidos de la pared y enzimas unidas a la membrana compitiendo por los substratos (Murphy, 1999).

Algunos flavonoides son producidos en respuesta a la presencia de microorganismos, como productos de defensa. Su actividad se debe a su capacidad de formar complejos con proteínas solubles extracelulares como se describió con las quinonas. Se tenía la idea de que los compuestos más lipofílicos son más activos, estudios posteriores mostraron que no hay una cierta claridad en el grado de hidroxilación con respecto a la actividad. Los flavonoides más lipofílicos también rompen las membranas microbianas. Esta afirmación es soportada al observar que compuestos a los que les falta el grupo hidroxilo (OH^-) en el anillo B que son más activos que los que tienen un grupo OH^- (Murphy, 1999).

En cuanto a los taninos se sabe que forman complejos irreversibles con las proteínas a través de fuerzas no específicas como los puentes de hidrógeno, efectos hidrofóbicos, así como la formación de enlaces covalentes y al igual que las quinonas podrían actuar contra adhesinas, enzimas, proteínas de transporte en la envoltura celular de la bacteria, etc. (Murphy, 1999).

Las lectinas y polipéptidos están positivamente cargadas y presentan puentes disulfuro, se presume que pueden actuar formando canales de iones en la membrana microbiana ó por inhibición competitiva de adhesión de las proteínas microbianas a los receptores polisacáridos del huésped (Murphy, 1999).

Las coumarinas actúan como supresores catalíticos de la actividad de la ATPasa y de la girasa del DNA, afectando principalmente la subunidad B de la girasa. Su uso no ha tenido éxito en la práctica clínica debido a: la pobre solubilidad y biodisponibilidad oral, baja actividad contra bacterias Gram negativas, toxicidad, efectos colaterales y rápida emergencia de cepas bacterianas resistentes (Li y Liu, 2001).

En los terpenos se especula que actúan rompiendo la membrana bacteriana por medio de los enlaces lipofílicos, en estos compuestos se ha encontrado que un aumento de la hidrofiliidad disminuye drásticamente su actividad (Murphy, 1999).

Los aceites esenciales son una mezcla de alcoholes, aldehidos, ésteres, cetonas y terpenoides. Estos actúan: a) Interfiriendo en la capa de fosfolípidos de la membrana celular bacteriana, causando incremento en la permeabilidad y pérdida de constituyentes celulares; b) Separando una variedad de sistemas enzimáticos, incluyendo aquellos que involucran la producción de energía y síntesis de componentes estructurales; c) Destrucción ó inactivación del material genético. El orden de efectividad antimicrobiana de mayor a menor grado de los aceites esenciales es el siguiente: Fungi, bacterias Gram positivas y finalmente bacterias Gram negativas (Kim *et al.*, 1995).

Un ejemplo de lo anterior es el timol. Este compuesto atravieza la pared bacteriana, interactúa con la enzimas periplasmáticas y después de penetrar en el interior rico en lípidos de la membrana citoplasmática bacteriana, interactúa con las proteínas de la membrana y causa recontraflujo de protones a través de la membrana afectando la actividad celular que obtiene energía de la fuerza de los protones, la cantidad utilizada no está asociada al incremento de la concentración, ya que una vez que actúa, su efecto es definitivo (Juven *et al.*, 1994).

Hasta el momento, a pesar del gran número de investigaciones realizadas, existe gran cantidad de compuestos de los cuales se desconocen sus propiedades y mecanismos de acción (Simmond y Grayers, 1999). Esta situación abre un campo de acción muy amplio para los investigadores.

Factores que promueven la producción de compuestos con actividad antibacteriana.

Las plantas al igual que la mayoría de los organismos del planeta desarrollan mecanismos de defensa contra condiciones adversas. Entre estos mecanismos se puede mencionar la producción de compuestos con función defensiva consecuencia de invasión microbiana y/o las condiciones ambientales. (Boller, 1995).

Invasión microbiana.- Desencadena una cascada de procesos metabólicos para producir un grupo de compuestos con propiedades defensivas conocidos como Fitoalexinas; dentro de este grupo se puede encontrar flavonoides, lignanos y derivados de ácido

hidroxicinámico. El primer paso es la producción de compuestos de oxígeno reactivo, esto sucede en respuesta a un elicitador derivado de la expresión genética de un microorganismo invasor (ie. proteínas, quitinas, oligosacaridos, etc.), si la acumulación de compuestos de oxígeno reactivo es excesiva puede resultar tóxico para la planta, así que para evitarlo estos son transformados en compuestos denominados Fitoalexinas (Boller, 1995; Chapin *et al.*, 1998).

Condiciones ambientales.- La materia orgánica proveniente de las plantas se ha clasificado en dos tipos: En material estructural, que es más resistente a la descomposición (Lignina, celulosa y hemicelulosa), invirtiéndose más tiempo en este proceso y material metabólico el cual es fácilmente descompuesto por la microbiota del suelo. La materia orgánica de regiones a mayores elevaciones sobre el nivel del mar se descompone más rápido y los nutrientes que inicialmente son retenidos en el material estructural al ser liberados se pierden fácilmente por lixiviación, esta situación se acentúa cuando está asociada a regímenes pluviales más secos. Aunado a lo anterior las ligninas y polifenoles contenidas en la materia desprendida de la vegetación, contrarrestan la actividad descomponedora de la microbiota, por sus propiedades antimicrobianas. Esta interrelación de eventos disminuye la disponibilidad de nutrientes para que la planta realice sus procesos de crecimiento y reproducción, cambiando la eficiencia de uso de agua por la eficiencia de uso de nutrientes (Vitousek y Turner, 1994).

La Teoría del Balance Carbón Nutriente se ha planteado para explicar los niveles de inversión en metabolitos secundarios basados en carbón (C, H, O). Cuando hay nutrientes el carbón es conducido al crecimiento, si la concentración de nutrientes disminuye, lo primero que se afecta es la fotosíntesis por lo tanto el poco carbón asimilado, que es usado para producir carbohidratos es conducido para producir metabolitos secundarios basados en carbón (Chapin *et al.*, 1998). Bajo estas condiciones adversas este tipo de compuestos tendrán la función de proteger a la planta durante su desarrollo, puesto que se ha observado que compuestos con función defensiva son producidos en mayor cantidad en las hojas jóvenes que en las maduras y en las herbáceas y arbustos más que en las plantas leñosas, ya que por su alto contenido de nitrógeno son las preferidas por una variedad de organismos,

para nutrirse, ya sea bacterias, hongos, artrópodos ó vertebrados (Coley y Baron, 1996). Entre las estrategias fisiológicas defensivas por parte de los vegetales está la de producir en mayor proporción aquellos compuestos con determinadas propiedades, como: atrayentes de depredadores de los herbívoros, de polinizadores y alelopáticos para eliminar competidores por espacio (Coley y Baron, 1996).

Importancia de los aceites esenciales.

Como ya se mencionó los aceites esenciales son una mezcla de alcoholes, aldehidos, ésteres, cetonas y terpenoides. Las diferentes combinaciones en presencia y proporción de estos compuestos le confiere a los aceites esenciales propiedades insecticidas, fungicidas, alelopáticas y antimicrobianas, además son los causante del olor y sabor característico de cada planta (Harborne, 1988; Chapin *et al.*, 1998).

Los terpenoides son los compuestos más abundantes en los aceites esenciales. Son producidos mediante una serie de procesos enzimáticos de oxido-reducción, partiendo de isoprenoides como sustrato. Los sesquiterpenos son más abundantes y diversos debido a que son producidos a partir de tres precursores de cinco carbonos cada uno. A diferencia de los monoterpenos, con los cuales se parte de dos precursores (Bohlmann *et al.*, 1998).

La proporción de los constituyentes principales de los aceites esenciales varía entre la misma especie y más aún cuando provienen de regiones geográficas diferentes. Es un hecho reconocido que las especies vegetales sometidas a estrés hídrico presentan una mayor variedad de compuestos en los aceites, en comparación de aquellas bajo condiciones fisiológicas óptimas. Tal variedad le confiere protección contra factores bióticos (invasión de microorganismos) y abióticos (estrés hídrico, fotónico, etc.) antagonistas; aunque un compuesto con una actividad detectada puede estar presente sin requerirse su uso por parte de la planta. Algunas especies se caracterizan por producir determinados compuestos en determinadas proporciones. Esta característica es producto de la condiciones ambientales y la intrapolinización a lo largo de generaciones (Agelopoulos *et al.*, 2000; Echeverrigaray *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002).

En los siguientes párrafos se comentará acerca de características y propiedades de algunos compuestos identificados en los aceites esenciales de algunas plantas. Lo cual permitirá comprender las propiedades atribuidas a tales especies que producen aceites esenciales.

El linalol y 1,8-cineol son monoterpenos volátiles. Se ha reportado previamente que el cineol se produce en mayor cantidad en los días más cálidos y baja su producción al disminuir la precipitación pluvial. El linalol por otra parte se mantiene en concentraciones menores y constantes (Sabillon y Cremades, 2001). Sin embargo se ha encontrado que la producción de linalol aumenta conforme se eleva la altura sobre el nivel del mar y la precipitación pluvial disminuye. También se observa que entre estos dos compuestos es mayoritaria la proporción del 1,8-cineol (Echeverrigaray *et al.*, 2003).

El linalol es un monoterpeno acíclico asociado principalmente con la atracción de polinizadores. Forma parte del olor de algunas plantas, como es el caso de las orquídeas. Estas plantas atraen a artrópodos machos y aprovechan su presencia para el proceso de polinización (Harborne, 1988). Este compuesto es producido principalmente por los pétalos y en menor grado en el pistilo y los estambres, de tal forma que su producción está asociada con el periodo de floración. Una vez que la polinización se ha realizado disminuye la proporción del metabolito, convirtiéndose en óxidos ó derivados. Cabe mencionar que el hecho de encontrarse este compuesto en plantas carecientes de esencia sugiere una función fisiológica diferente a la de atrayente hasta ahora desconocida (Pichersky *et al.*, 1994), más en este punto se plantea que puede ser un proceso evolutivo para desarrollar atrayentes de polinizadores (Bohlman *et al.*, 1998).

El linalol junto con otros compuestos es liberado por *Phaseolus lunatus* en respuesta al ataque del ácaro herbívoro *Tetranychus urticae* sirviendo de atrayente al depredador de este herbívoro, el ácaro *Phytoseilus persimilis*. Estos compuestos volátiles sirven de intercomunicadores para las plantas, como una señal de alarma, como lo hace el ácido jasmónico, de tal forma que se ha encontrado que hay plantas que sin haber sido atacadas por el herbívoro liberan los atrayentes volátiles de “guardaespaldas”, de tal forma, es

suficiente que una sola planta de la especie sea invadida para indicar a las demás que liberen atrayentes (Chapin *et al.*, 1998).

El compuesto 1,8-cineol ha mostrado actividad insecticida contra el barrenador de cereales *Rhizopertha dominica* (F.) y el escarabajo rojo fosforescente *Tribolium castaneum* Herbst (Pratesa *et al.*, 2003). En contraste, en el plátano, este compuesto actúa como atrayente del coleóptero *Cosmopolites sordidus*, este insecto es una plaga de este cultivo, aprovecha este compuesto volátil para detectar la posición del fruto, esto se verifica al observar que las plantas resistentes a este artrópodo no presentan tal compuesto (Ndiegea *et al.*, 1996). Además este compuesto al igual que el alcanfor ha mostrado actividad alelopática, tal actividad es más patente en zonas secas y con precipitación pluvial escasa (Harborne, 1988; Chapin *et al.*, 1998).

El compuesto D-bornyl acetato a la concentración de 0.07mg/ml, excita sexualmente a la cucaracha americana *Periplaneta americana*. Con el gorgojo *Rhabdocelum obscurus* ocurre de forma diferente, este ácaro libera atrayentes sexuales hasta que se ha alimentado de la planta donde se localiza este compuesto (Harborne, 1988), lo cual podría indicar que es un precursor metabólico, tal aspecto puede ser aprovechado en control biológico.

En lo referente a los sesquiterpenos se ha encontrado que α -bisabolol es producido en mayor proporción durante los fotoperiodos largos, a diferencia de otros compuestos, en los cuales la temperatura es el principal factor que provoca tal variación (Fahlén *et al.*, 1997). En las flores de naranja $\alpha(-)$ -bisabolol es responsable de su olor característico (Harborne, 1988). El compuesto $\pm \alpha$ -bisabolol aislado de extractos de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) mostró propiedades antiinflamatorias en edemas inducidos con carragenina en patas de ratas, eritemas provocados por luz UV en puercos de guinea y en fiebre en ratas provocada por levaduras inyectadas intramuscularmente. Además este compuesto reduce la producción de mucopolisacáridos en cultivos celulares (Jakovlev *et al.*, 1979). Torrado *et al* (1995) demuestran la actividad gastroprotectora del bisabolol a una concentración de 200mg/kg contra efectos ulcerogénicos generados por ácido acetilsalicílico. Por otro lado se ha encontrado que la planta *Peperomia galioides* presenta a epi-alpha-bisabolol como el

principal principio activo inductor de sanación de heridas a una concentración de 228 µg/g en ratones (Villegas *et al.*, 2001).

De los compuestos aquí mencionados se reporta que la mezcla de isómeros ópticos (±)alcanfor (cetona bicíclica) y el compuesto cineol no son sustancias genotóxicas. Las pruebas se realizaron con cepas de *Salmonella typhimurium* TA100, TA98, TA97. El terpinenol mostró efecto genotóxico dependiente de la concentración, de tal forma que solo presentan genotoxicidad a concentraciones altas sin ningún activador metabólico. Los autores sugieren corroborar estos efectos en estudios con humanos (Gomes *et al.*, 1997).

Lo anterior permite comprender la importancia de incrementar el conocimiento de la composición química de las plantas utilizadas en las practicas etnomédicas.

ANTECEDENTES.

Plantas con propiedades antidiarreicas.

La familia Verbenaceae está ampliamente distribuida en México. En esta se encuentran reportadas las siguientes especies que son usadas como antidiarreicas: *Verbena litoralis*, *V. attrecta*, *Priva tuberosa*, *Stachytarpheta jamaicensis*, *Vitex pyramidata* y *Vitex mollis*, esta última al igual que *Cornutia grandifolia* se emplean contra la disentería. *Aloysia triphylla*, *Lippia alba*, *Phyla scaberrima*, *Verbena carolina* y *V. ciliata* para aliviar dolores estomacales. *Lippia reptans* para aliviar los vómitos (Díaz, 1976; Aguilar *et al.*, 1994). Tascon (1997) reporta el uso de *Aloysia triphylla* (L'Hér.) Britton, para aliviar el dolor de estómago y vómito; además de mencionar a *Verbena carolina* L. para tratar la úlcera gástrica (Aguilar *et al.*, 1994).

Varias especies del género *Lippia* contienen flavonoides como principales principios activos, a los cuales se les atribuyen propiedades antimalariales, antiespasmódicas, sedativas, hipotensivas y antiinflamatorias, destacando principalmente aquellas útiles para tratamientos gastrointestinales y desórdenes respiratorios (Pascual *et al.*, 2001).

Estudios Fitoquímicos.

Los extractos alcohólicos de la especie *Stachytarpheta jamaicensis* mostraron mutagénesis oxidativa en colonias de *Escherichia coli*, sugiriendo acción prooxidativa por un posible aumento de radicales hidroxilo (Ramos *et al.*, 2000). Los extractos alcohólicos y n-butanólicos de la planta *Stachytarpheta cayennensis* inhiben la brakinina y la histamina confirmándose sus propiedades antiinflamatorias. El aislamiento por el método biodirigido de los componentes activos de la planta mostró un glicósido fenilpropanoide acetósido y el iridoide ipolamiida (Schapoval *et al.*, 1998).

Extractos de *Verbena officinalis* principalmente los clorofórmicos mostraron actividad antiinflamatoria, detectándose los siguientes compuestos: β -sitosterol, β -sitosterol-D-glucósido, ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido 3-epiursólico, ácido 3-epioleanólico y triterpenoides menores derivados de ácido ursólico y ácido oleanólico, dos glucósidos

iridoides, verbenalina y hastatósido, un glicósido fenilpropanoide y verbascósido (Deepak y Handa, 2000).

Por otro lado los extractos hexánicos y diclorometánicos de *Vitex trifolia* mostraron toxicidad contra cuatro líneas celulares cancerígenas (de cervix, ovarios, colon y nasofaringe) y en menor grado en cuatro especies fúngicas (*Penicillium* sp., *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp.). La actividad antibacteriana fue mayor en la cepas Gram positivas comparadas con las Gram negativas (Hernández *et al.*, 1999).

Las propiedades antidiarreicas de *Clerodendrum phlomidis* fueron confirmadas al administrar extractos metanólicos que disminuyeron la frecuencia de defecación provocada por aceite de castor, en ratas winstar (Rani *et al.*, 1999).

Especies del genero *Lantana*.

El Instituto Mexicano del Seguro Social reporta, del género *Lantana*, a *L. frutilla* como antidiarreica, *L. involucrata* para el vómito y *L. Cf. vetulina* para aliviar el dolor de estómago, *L. camara* para aliviar diversos malestares estomacales (Aguilar *et al.*, 1994). La especie *L. camara* ha sido la más estudiada; se reporta para aliviar una gran variedad de malestares (Aguilar *et al.*, 1994; Deena y Thoppil, 2000). Deena y Thoppil (2000) mostraron que los aceites esenciales de *L. camara* poseen una amplia actividad antibacteriana y antifúngica. Ghisalberti (2000) hace una revisión completa de todos los compuestos aislados de esta especie y otras del genero. Se puede destacar como antibacterianos los ácidos camarínico y lantánico (Saleh *et al.*, 1999) y el triterpeno acetato de ursolato contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* (Barre *et al.*, 1997).

En cuanto a la especie *Lantana achyranthifolia* Desf, se han realizado análisis fitoquímicos con la raíz, los cuales mostraron compuestos naftoquinonas con sus derivados iso y metilo y esteroides (β -sitosterol). En las partes aéreas de la planta se encontraron los flavonoides crisosplenetina y penduletina y nuevamente β -sitosterol (Domínguez *et al.*, 1983) (ver Apéndice I). Abeygunawardena *et al* (1991) hacen una corrección a una de las estructuras

de las naftoquinonas mencionadas (ver Apéndice I), aclarando que son producidos simultáneamente con dos análogos más. Posteriormente se obtuvieron por síntesis cuatro furonaftoquinonas probándose su citotoxicidad en líneas celulares (epidermoides nasofaríngeos K562 y linfocítica P388 de leucemia humana) obteniéndose una LD₅₀ de 1.3-17.4 mmol dm⁻³ (Perry *et al.*, 1997). Las propiedades antibacterianas fueron evaluadas por Rocha (2002). Este autor reportó actividad de tres extractos (etanólico, cloroformico y de tetracloruro de carbono) contra once cepas bacterianas.

DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA.

Botánica.

División: Embryophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Subclase: Asteridae.

Orden: Lamiales.

Familia: Verbenaceae.

Lantana achyranthifolia Desf., Cat. Pl. Hort. París, Ed. 3:392. 1829.

= *Camara purpurea* Kuntze Revis. Gen. Pl. 2: 504. 1891

= *Lantana cabreræ* Moldenke Lilloa Rev. Bot. Tuc. Arg. 5: 406. 1940.

= *Lantana macropodioides* Greenman, Publ. Field Columbian. Mus. Bot. Ser. 2:3339.

= *Lantana purpurea* Benth. & Hook. F., Gen. Pl 2:1142.1876.; Jacq. F. Ecol. 1:126, t. 85. 1816; D. C. Prodr 11:581. 1847.

= *Lippia fimbriata* Rusby Mem. Torrey Bot. Club 4: 244. 1895

= *Lippia imbricata* Kuntze Revis. Gen. Pl. 3, pt. 2: 252. 1898

= *Lippia purpurea* Jacq.f. Eclog. i. 126. t. 85.

Lantana achyranthifolia Desf. (ver figura 1) es una especie que se puede encontrar como herbácea anual de 0.5-1.0m ó arbusto erecto de 0.7-2.0m de alto. Los tallos y las ramas son inermes, estrigosas con numerosos pelos blancos adpresos. Las hojas son opuestas, con la lámina lanceolada a lanceolada ovada, generalmente de 3-11cm. de largo. El haz y el envés son estrigosos, con los márgenes agudamente aserrados con 6 a 12 dientes en cada lado. El ápice puede ser de acuminado a largamente acuminado. La base es cuneada a redondeada y entonces contraída y decurrente en el peciolo. Los peciolos son cortos 0.3-1.5cm de largo.

Las inflorescencias generalmente son solitarias y se localizan en cada axila de las hojas, las cuales son de forma pedunculada. Las espigas están acomodadas semejanado cabezuelas cortas en antesis (5mm de largo) pero alargándose con la edad. El fruto tiene algunas veces una longitud de 2.5cm. generalmente están solitarios, localizándose en cada axila de las hojas pedunculadas. El pedúnculo es bastante rígido y recto (de 4.5, 8.0-13cm de largo),

más largo que las hojas (a menudo 2 veces la longitud de largo ó más). Las brácteas externas son verdes, peludas, lanceolado-ovaladas ó lanceoladas, acuminadas a largamente acuminadas de hasta 13cm, las más inferiores algunas veces con la longitud de 3-8mm, densamente estrigosas. El cáliz es inconspicuo 1.5-2.0mm de largo, con un margen irregular y sinuadamente dentado a casi truncado puberulento. El pistilo es de 4mm de largo. Los frutos tienen de 2 a 3mm de largo y son de color púrpura. Presentan dos pírenos cada uno con una semilla hialina. La corola es generalmente de color blanco, a blanco con amarillo, blanco con rosa, rosa-violacea ó púrpura con amarillo (en este trabajo se usó la blanca), con una longitud de 6-8mm, externamente es puberulenta. El tubo tiene de 3 a 4mm de largo, con la superficie externa también puberulenta (Nash y Nee, 1984; Segura, 1996).

Nombres Comunes. *Lantana achyranthifolia* Desf., es conocida por varios nombres. En Nayarit se le nombra “Orozus” y en el Estado de México se le conoce como “Frutilla”, “oreganillo” y “verbena” (Nash y Nee, 1984), en San Luis Potosí se le denomina como "Kanil bakan, tdak patelax (tenek)" (Argueta *et al.*, 1994). En Texas y la zona fronteriza con México se le conoce como: “caraquito blanco”, “cariaco de San Juan”, “frutilla blanca” y “organillo cimarrón” (Texas A&M University, 2002). En Zapotitlán de las Salinas Puebla se le conoce con los nombres de “Cinco Negritos Blanco” (Hernández *et al.*, 2003) y San Cayetano (Rocha, 2002).

Etnobotánica.

L. achyranthifolia es utilizada en el Estado de Hidalgo contra la tos. Las hojas se preparan en una cocción y se administra por vía oral. Cuando se utiliza para combatir el flujo blanco se prepara una cocción del tallo, la cual se aplica por vía vaginal (Espinoza, 1985). En algunas regiones del estado de Guerrero se le ocupa para aliviar lastimaduras y torceduras (Argueta *et al.*, 1994). En el municipio de Zapotitlán de las Salinas Puebla se utilizan las partes aéreas (flor, hoja y tallo) preparadas como infusiones contra la diarrea (Hernández *et al.*, 2003).

Figura 1.- “Cinco Negritos Blanco” (*Lantana achyranthifolia* Desf.)



Ecología y distribución.

Lantana achyranthifolia es originaria de América tropical, habita principalmente en climas cálidos y semicálidos. Tiene una distribución muy amplia. Se ha reportado en la parte sureña de Estados Unidos de América, Honduras, Guatemala, Colombia, Venezuela, Belice, Paraguay, Argentina y algunas regiones del Viejo Mundo. En La República Mexicana se tiene registro de su presencia en la mayoría de los estados (excepto, Baja California Sur y Norte, Aguascalientes, Campeche y Tabasco, ver figura 2) (Segura, 1996).

Se le puede encontrar a elevaciones que van desde el nivel del mar hasta 2300 msnm. Creciendo a orilla de caminos, asociada a vegetación secundaria de bosque tropical caducifolio perturbado, subcaducifolio, subperennifolio, de selva alta y mediana perennifolia, además en matorral xerófilo (Argueta *et al.*, 1994), matorral con crassulaceas (Tenorio, 1997) en potreros localizados en dunas costeras (Nash y Nee, 1984) y desarrollándose abundantemente en forma de herbácea en Bosque mixto de Pino-Encino (Torres, 1991). La floración de esta especie es de abril a Noviembre (Nash y Nee, 1984).

Figura 2.- Distribución de *L. achyranthifolia* Desf en la República Mexicana.



JUSTIFICACIÓN

Día con día los listados florísticos, aumentan el conocimiento acerca de los recursos vegetales con los que cuenta cada región. Además los registros etnobotánicos proporcionan información valiosa de cómo tales recursos son utilizados, siendo diferente el uso, dependiendo del grupo étnico o social que los aprovecha. De entre estas aplicaciones, destacan las médicas. El regreso a las prácticas herbolarias con fines terapéuticos, la regulación en la ingesta de determinadas drogas por sus efectos secundarios y el desconocimiento de los principios activos de las plantas utilizadas incrementan la necesidad de realizar estudios fitoquímicos que proporcionen información al respecto.

El presente estudio se deriva de un estudio etnobotánico (Hernández et al., 2003), en el cual se reporta que la planta *Lantana achyranthifolia* Desf conocida como “Cinco Negritos Blanco” es utilizada para aliviar infecciones gastrointestinales en Zapotitlán de las Salinas Puebla. Aunque se desconoce cuáles son los principios activos contra las bacterias que provocan las afecciones mencionadas. Este trabajo está encaminado a contribuir al conocimiento de los principios activos de *Lantana achyranthifolia* contra las bacterias generadoras de enfermedades gastrointestinales, para lo que se establecen los siguientes objetivos:

OBJETIVOS.

General.

- Determinar la actividad antibacteriana de la planta “Cinco Negritos Blanco” (*Lantana achyranthifolia* Desf).

Particulares.

- Evaluar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales y de los extractos herbales de diferente polaridad de *L. achyranthifolia* Desf
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos activos y en su caso de los aceites esenciales.
- Identificar los principales constituyentes de los aceites esenciales.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Colecta y secado de la planta.

La parte aérea de la planta "Cinco Negritos Blanco" (*Lantana achyranthifolia* Desf.) se recolectó en la localidad de Zapotitlán de las Salinas Puebla durante el mes de Julio de 2001. Un ejemplar se depositó en el herbario IZTA de la FES-Iztacala UNAM (Registro 26472). Una parte del material (2.060kg) se puso a secar, el cual completamente deshidratado se trituró.

Zapotitlán de las Salinas se localiza en el estado de Puebla entre las coordenadas 18°20'N y 97°28'O (INEGI, 1999). Se ubica dentro de la provincia florística de Tehuacán-Cuicatlán, a una elevación de 1480 msnm promedio. Presenta un clima árido, una precipitación anual de 5421.5mm y una temperatura de 19.8°C promedio. La vegetación característica es matorral xerófilo, bosque espinoso y bosque caducifolio (Rzedowsky, 1988).

Obtención de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales se obtuvieron destilando por arrastre de vapor 500g de la parte aérea de la planta. El proceso se realizó con la planta fragmentada y en estado fresco (ver Apéndice II).

Obtención de extractos por percolación.

Las partes aéreas de la planta, flor, tallo y hojas (2.060 Kg), se sometieron al proceso de percolación (ver Apéndice III), para obtener extractos de diferente polaridad. Los solventes empleados fueron hexano, acetato de etilo (AcOEt) y Metanol (MeOH).

Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo al método de difusión en Agar de Kirby-Bauer (ver Apéndice IV). La concentración utilizada para evaluar los extractos fue de 2mg/disco. La concentración de los aceites esenciales fue de 4µl/disco (36µg/disco), la concentración del control positivo (cloramfenicol) fue de 25 µg/disco. Los solventes empleados en la extracción se usaron como control negativo. Cada bioensayo se realizó por

triplicado. A los datos de los halos de inhibición obtenidos se les realizó Análisis de Varianza para determinar si existían diferencias significativas.

Microorganismos utilizados.

Para determinar la actividad antibacteriana se utilizaron catorce cepas. A las cuales se les reconoce que provocan enfermedades gastrointestinales en México (Avila, 1996): *Vibrio cholerae* No. 01, tres cepas *Vibrio* que corresponden al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba (INDRE 206 aislada de agua contaminada, Caso Clínico (cc) y biotipo El Tor CDC V12), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Shigella boydii* ATCC 8700. *Enterobacter aerogenes* y *Bacillus subtilis* donadas por el laboratorio de microbiología de la FES-Cuautitlán. *Yersinia enterocolitica* donada por el laboratorio de Análisis Clínicos de la Clínica Universitaria de Servicios Integrales de la FES-Iztacala. *Staphylococcus aureus* ATCC 12938, *Staphylococcus epidermidis* y *Sarcina lutea* donadas por la FES-Cuautitlán.

Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.

Se determinaron los parámetros microbiológicos con las cepas que mostraron sensibilidad ante los extractos con la evaluación cualitativa: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM). Los extractos se evaluaron usando la macrotécnica de difusión en agar y los aceites esenciales con la microtécnica de dilución en caldo (ver Apéndice V).

Identificación de compuestos constituyentes de los aceites esenciales.

La identificación de los constituyentes de los aceites esenciales se realizó en El Instituto de Química UNAM, mediante un análisis en Cromatografía de Gases acoplado a espectrometría de Masas, utilizando un cromatografo Hewlett Packard modelo 5890 serie II conectado a un espectrómetro Jeol AXC50HA. Utilizando una columna DB WAX de 30m x 0.32mm con diámetro interno de 0.25mm.

Las condiciones de separación fueron: temperatura del horno 80-220°C (aumentando gradualmente la temperatura a razón de 8°C por minuto); temperatura del inyector 225°C;

gas de acarreo He, a presión de 134 Kpa (19 Psi) y velocidad linear de 20cm/s; cantidad de muestra empleada, 1.0 μ l; energía de ionización 70eV.

Los nombres comunes de los compuestos identificados se obtuvieron, auxiliandose de la base de datos del Instituto de Química.

RESULTADOS.

La planta "Cinco Negritos Blanco" *Lantana achyranthifolia* Desf. se colectó en la localidad de Zapotitlán de las Salinas Puebla durante el mes de Julio de 2001. Un ejemplar fue depositado e identificado en el Herbario IZTA de la FES-Iztacala UNAM. Los datos generales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.- Datos generales de la planta *Lantana achyranthifolia* Desf.

Familia	Verbenaceae
Especie	<i>Lantana achyranthifolia</i>
Nombre común en Zapotitlán	Cinco negritos blanco
No. de Registro Herbario IZTA	26472
Parte utilizada para remedio	Partes aéreas (tallo, flor y hoja)
Forma de preparación	Infusión.
Epoca de colecta	Julio.

Rendimientos de los aceites esenciales y los extractos.

El rendimiento de los aceites esenciales por arrastre de vapor fue de 2.70g (0.54%) con una densidad de 0.9g/ml, a partir de 500g de planta fresca.

El rendimiento de cada uno de los extractos por percolación se muestra en la tabla 2.

Tabla 2.- Rendimiento de los extractos obtenidos por percolación de *L. achyranthifolia*.

(Referido a 2.060 Kg. de planta)

SOLVENTE	GRAMOS	RENDIMIENTO (%)
Hexano	17.89	0.87
Acetato de Etilo	46.64	2.26
Metanol	227.89	11.06

La tabla 2 muestra que el extracto metanólico presentó el mayor rendimiento, lo cual puede ser resultado de diversos compuestos muy polares.

Evaluación cualitativa de los aceites esenciales y los extractos.

En la Tabla 3 se muestran los halos de inhibición de los diferentes extractos obtenidos por percolación y de los aceites esenciales sobre las diferentes cepas bacterianas.

Tabla 3.- Actividad antibacteriana de los diferentes extractos y los aceites esenciales de *Lantana achyranthifolia* Desf.

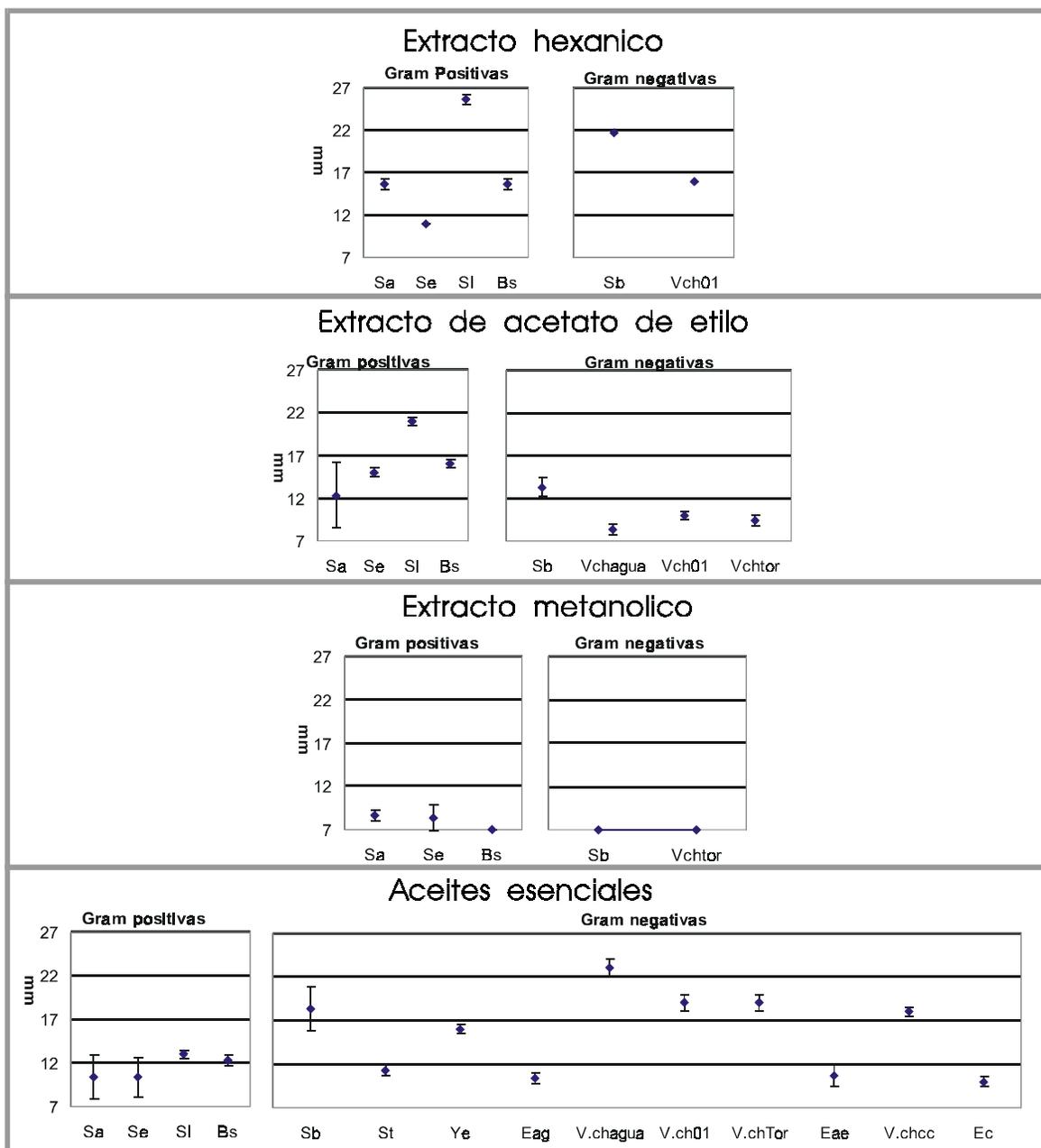
BACTERIA	Halos de inhibición (mm)				
	CLORAMFENICOL (CONTROL +) ^a	EXTRACTOS ^b			Aceites Esenciales ^c
		HEXANO	AcOEt	MeOH	
<i>Staphylococcus aureus</i>	24.00±0.50	15.70±0.58	12.30±3.79	8.67±0.58	10.33±2.52
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	23.50±4.95	11.00±0.50	15.00±0.50	8.33±1.53	10.33±2.31
<i>Sarcina lutea</i>	26.00±2.83	25.70±0.58	21.00±0.50	NA	13.00±0.50
<i>Bacillus subtilis</i>	23.00±2.83	15.67±0.58	16.00±0.50	7.00±0.50	12.33±0.57
<i>Shigella boydii</i>	19.50±0.50	14.67±0.58	13.33±1.15	7.00±0.50	18.33±2.52
<i>Salmonella typhi</i>	25.00±0.71	NA	NA	NA	11.33±0.58
<i>Yersinia enterocolitica</i>	21.00±0.50	NA	NA	NA	16.00±0.50
<i>Enterobacter agglomerans</i>	22.00±1.41	NA	NA	NA	10.33±0.57
<i>V. cholerae</i> Agua	30.00±1.41	NA	8.33±0.58	NA	23.00±1.00
<i>V. cholerae</i> No. 01	30.50±0.71	9.00±1.00	10.00±0.50	NA	19.00±1.00
<i>V. cholerae</i> cc	26.00±0.50	NA	NA	NA	18.00±0.50
<i>V. cholerae</i> Tor	22.00±1.41	NA	9.33±0.58	7.00±0.50	19.00±1.00
<i>Enterobacter aerogenes</i>	22.00±2.83	NA	7.00±0.50	NA	10.67±1.15
<i>Escherichia coli</i>	19.00±0.50	NA	NA	NA	10.00±0.50

NA.- No presentó actividad. AcOEt.- Acetato de etilo. MeOH.- Metanol.
a.- 25µg/disco b.- 2mg/disco c.- 36µg/disco

Se destaca que la cepa más sensible al extracto hexánico es *Sarcina lutea* y el halo más cercano es el de la cepa *Vibrio cholerae* agua con los aceites esenciales. Las cepas Gram positivas en general tienden a mostrar mayor sensibilidad, tanto con los extractos como con los aceites esenciales. Las cepas Gram negativas son menos sensibles ante los extractos, ya que cinco cepas ninguna inhibición mostraron, dos solo mostraron inhibición ante dos extractos, dos fueron inhibidas por dos extractos y solo una fue inhibida por los tres

extractos. Los aceites esenciales son activos contra todas las cepas, las cepas gram negativas mostraron mayor sensibilidad.

Figura 3. - Comparación de la actividad antibacteriana basados en los halos de inhibición.

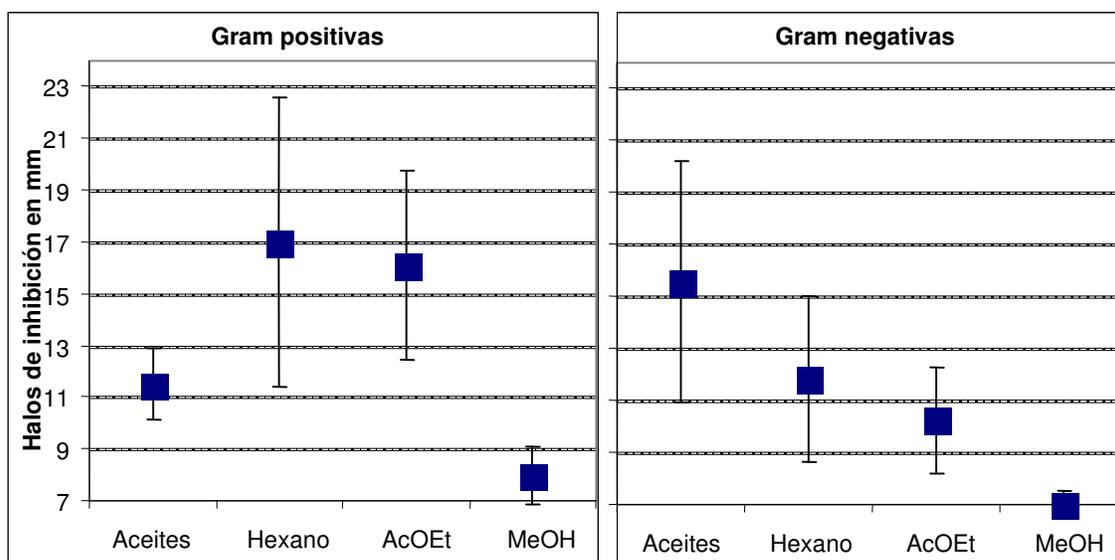


La Figura 3 muestra que entre las bacterias Gram positivas, la cepa *Sarcina lutea* es la más sensible, pues mostró los halos de inhibición de mayor diámetro ante los extractos hexánico

y de AcOEt. En el caso de las bacterias Gram negativas, *Shigella boydi* es la única cepa sensible ante los tres extractos. Por otro lado la bacteria *V. cholerae* 01 muestra sensibilidad ante los extractos de baja e intermedia polaridad. *Vibrio cholerae* Tor muestra sensibilidad ante el extracto de media (AcOEt) y el de alta (MeOH) polaridad. Cabe hacer notar que el extracto de AcOEt muestra un rango de actividad antibacteriana más amplio con respecto a los otros dos extractos.

En el caso de los aceites esenciales se muestra inhibición en todas las cepas tanto negativas como positivas; las cepas de *V. cholerae* muestran mayor sensibilidad, la cepa aislada de agua presenta el halo mayor.

Figura 4. - Comparación de la actividad antibacteriana de los extractos y los aceites esenciales.



La figura 4 indica que las cepas Gram positivas son más sensibles ante los extractos que las cepas Gram negativas. Con los aceites esenciales sucede diferente, las bacterias Gram negativas son más susceptibles a la actividad antibacteriana. Cabe hacer notar como los halos de inhibición disminuyen conforme aumenta la polaridad del extracto probado.

Una vez obtenidos los datos de los halos de inhibición de los diferentes extractos se decidió realizar análisis de Varianza para determinar si existían diferencias significativas en este tipo de evaluación. Los resultados de tal análisis se muestran en la tabla 4.

Tabla 4.- Análisis de varianza de los halos de inhibición mostrados por las bacterias ante los extractos.

GRAM	COMPARACIÓN	P	F _{calc.}	F _{crit.}
+	Entre extractos	0.05847	4.1343	4.45
	Entre bacterias	0.04917	4.3804	4.35
-	Entre extractos	0.2234	1.9219	4.25
	Entre bacterias	0.2242	1.7764	4.07
α 0.05				

El análisis de varianza de las medias de los halos de inhibición se realizó separando bacterias Gram positivas y Gram negativas. La tabla 4 muestra que las F_{calculadas} son inferiores a las F_{críticas}, indicando que las diferencias no son significativas, excepto entre las bacterias Gram positivas, tales diferencias demuestran que la cepa *Sarcina lutea* es significativamente más sensible a los extractos. Se realizó el análisis omitiendo los valores mostrados por esta cepa y el resultado no mostró diferencias significativas, lo cual corrobora tanto que la cepa *Sarcina lutea* es la cepa más sensible y que el resto de las cepas muestran una respuesta de sensibilidad homogénea.

Evaluación cuantitativa de los aceites esenciales y los extractos.

Se determinaron los parámetros microbiológicos, CMI y CBM, con las cepas que mostraron sensibilidad ante los extractos con el método de difusión en Agar de Kirby-Bauer.

En la tabla 5 se muestra las CMI y CBM obtenidas de los extractos ensayados y los aceites esenciales. Se puede observar que el extracto AcOEt presentó los parámetros microbiológicos de CMI y CBM más bajos al obtenerse 0.12 y 0.25mg/ml respectivamente, seguido del hexánico y el metanólico. Con los aceites esenciales las cepas Gram positivas

muestran las CBM más baja (0.50mg/ml), con respecto a las Gram negativas (CBM de 0.75mg/ml).

Tabla 5.- CMI y CBM de los extractos activos y los aceites esenciales de *Lantana achyranthifolia* Desf.

Parámetros microbiológicos. (valores expresados en mg/ml)								
BACTERIA	HEXANO		AcOEt		MeOH		Aceites e.	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25	0.50	0.12	0.25	1.00	1.50	0.50	0.75
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.50	0.75	0.125	0.25	1.50	2.00	0.50	0.75
<i>Sarcina lutea</i>	0.25	0.50	ND	ND	ND	ND	0.25	0.50
<i>Bacillus subtilis</i>	0.50	0.75	0.125	0.25	1.50	2.00	0.50	0.75
<i>Shigella boydii</i>	0.50	0.75	0.125	0.25	1.00	1.50	0.75	1.00
<i>V. cholerae</i> No. 1	0.25	0.50	0.125	0.25	ND	ND	0.50	0.75
<i>V. cholerae</i> Tor	ND	ND	0.25	0.50	0.75	1.00	1.00	1.50
<i>V. cholerae</i> Agua	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.50	0.75
<i>V. cholerae</i> cc	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.50	0.75
<i>Salmonella typhi</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.00	1.50
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.50	0.75
<i>Enterobacter agglomerans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.00	1.50
<i>Enterobacter aerogenes</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.00	1.50
<i>Escherichia coli</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.00	1.50

ND: no determinado. La Cepa mostró insensibilidad en la prueba cualitativa.

Nota: Los parámetros microbiológicos de *Sarcina lutea* no determinados, se debió a que la cepa ningun crecimiento mostró incluyendo el control.

Identificación de los compuestos presentes en los aceites esenciales.

Tabla 6.- Compuestos identificados en los aceites esenciales de *L. achyranthifolia* Desf., mediante análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

	Compuesto	TR	%	Fórmula	PM
1	1,8 cineol	7.86	5.03	C ₁₀ H ₁₈ O	154
2	Acetato de terpineno	8.52	0.74	C ₁₂ H ₂₀ O	196
3	Linalol	9.69	1.26	C ₁₀ H ₁₈ O	154
4	Alcanfor	10.96	0.49	C ₁₀ H ₁₆ O	152
5	Terpinen-4-ol	11.83	0.72	C ₁₀ H ₁₈ O	154
6	4-(1,1-dimetil) Bencenometanol	13.16	0.78	C ₁₁ H ₁₆ O	164
7	Acetato de borneol	14.50	0.56	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196
8	Carvacrol	15.38	30.64	C ₁₀ H ₁₄ O	150
9	4-etenil-4-metil-3-(1-metiletenil)-1-(1-metiletil) Ciclohexeno	15.83	1.06	C ₁₅ H ₂₄	204
10	4-Isopropil-3,7-dimetil-3 ^a ,3b,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopenta 1,3 ciclopropa 1,2 benzeno	16.10	0.46	C ₁₅ H ₂₄	204
11	Minacida	16.64	1.01	C ₁₂ H ₁₇ O ₂ N	207
12 y 19	Candina 4(5),10(14)dieno	16.79	3.38	C ₁₅ H ₂₄	204
13	Guaia 1(10),11(12)dieno	17.15	2.76	C ₁₅ H ₂₄	204
14 y 16	Isocariofileno	18.01	11.82	C ₁₅ H ₂₄	204
15	1-etenil-1-metil-2-(1-metiletenil)-4-(1-metiletil) Ciclohexeno	18.14	4.51	C ₁₅ H ₂₄	204
17	Humuleno ó α-cariofileno	18.71	3.78	C ₁₅ H ₂₄	204
18	Aristol 1(10)eno	18.83	0.65	C ₁₅ H ₂₄	204
20	1H-ciclopenta 1,3 ciclopropa octahidro-7-metil-3-metilen,1,2 benzeno	19.29	4.07	C ₁₅ H ₂₄	204
21	β-bisaboleno	19.68	5.68	C ₁₅ H ₂₄	204
22 y 27	α-bisabolol	19.88	11.23	C ₁₅ H ₂₆ O	222
23	β-cadieno	20.11	2.77	C ₁₅ H ₂₄	204
24	hexahidro-1,4,9,9-tetrametil,1H-3 ^a ,7-metanoazuleno	20.28	4.55	C ₁₅ H ₂₄	204
25	Himachaleno	20.38	1.17	C ₁₅ H ₂₄	204
26	1,2,4 ^a ,5,6,8 ^a ,hexahidro-4-7-dimetil-1-(1-metiletil) Naftaleno	20.46	0.46	C ₁₅ H ₂₄	204
28	Cedreno	25.67	0.43	C ₁₅ H ₂₄	204

TR.- Tiempo de retención.
PM.- Peso molecular.

En la tabla 6 se listan los 25 compuestos detectados mediante el análisis de cromatografía de gases acoplado a gases masas. Se reportan los compuestos, el tiempo de retención (TR), el porcentaje de composición en el aceite, la fórmula molecular y el peso molecular (PM). Los espectros obtenidos y las estructuras químicas se muestra en el apéndice VII.

De los 25 componentes identificados en los aceites esenciales, el 41.23% son monoterpenos y el 58.78% son sesquiterpenos. Los compuestos carvacrol, isocariofileno, α -bisabolol, β -bisaboleno y 1,8-cineol conforman los constituyentes principales de los aceites esenciales, representando el 77.53%.

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Generalidades de la planta.

La especie *Lantana achyranthifolia* conocida como “Cinco Negritos blanco” en Zapotitlán de las Salinas, es una planta ampliamente distribuida a lo largo de la República Mexicana (ver figura 2). Perteneció a un género que se caracteriza por ser hibridizable. Las propiedades de las plantas de este género son utilizadas en la medicina tradicional con fines terapéuticos similares (Ghisalberti, 2000).

Recientemente se ha detectado que las especies vegetales consideradas como herbáceas y que se encuentran dentro del grupo utilizado con fines medicinales presentan la característica de crecer en ecosistemas perturbados. Esta característica es conocida por las personas encargadas de coleccionar plantas para usos terapéuticos. Los colectores obtienen la planta en los linderos de bosques y áreas que han recibido un impacto por actividades antropogénicas ó perturbaciones naturales (Stepp y Moerman, 2001).

L. achyranthifolia muestra las características de distribución arriba mencionadas. Crece asociada a vegetación secundaria de ecosistemas perturbados (Argueta *et al.*, 1994; Nash y Nee, 1984; Torres, 1991). Su obtención es accesible. Más a pesar de estar reportada en la mayoría de los estados de la República Mexicana (ver figura 2), sólo se utiliza en algunas regiones de los estados de Guerrero, Hidalgo y Puebla, lo cual es un claro indicativo de la poca difusión de las propiedades medicinales que de esta especie se tiene. Esta situación realza la necesidad de estudios adicionales que subsanen tal situación.

Rendimientos.

Los rendimientos de los extractos mostrados en la tabla 2, indican que es mayor la proporción en el extracto metanólico (11.06%), con respecto a los otros dos, el de acetato de etilo (2.26%) y el hexánico (0.87%), incluyendo los aceites esenciales (0.30%).

Zapotitlán de las Salinas Puebla se caracteriza por presentar un clima seco, reflejado en el tipo de vegetación xerófila y de bosque espinoso. La época de colecta de *L. achyranthifolia* (julio) coincide con el fenómeno denominado “canícula” que es una sequía entre dos periodos pluviales (ver apéndice VI). Las especies vegetales sometidas a estrés hídrico tienden a elevar la proporción de material metabólico, en este, se puede encontrar compuestos con funciones protectoras para la planta (Harborne, 1988; Vitousek y Turner, 1994; Chapin *et al.*,1998). El rendimiento de sólidos obtenidos en el proceso de percolación podría ser el resultado principalmente de las condiciones ambientales de Zapotitlán de las Salinas durante el periodo de colecta. El alto rendimiento del extracto metanólico puede ser debido a que la planta sintetiza mayor cantidad de compuestos polares (ie. glucosidos, flavonoides, etc.).

Actividad antibacteriana de los extractos.

En la Tabla 3 se muestra que con la técnica de difusión en agar, los extractos inhiben principalmente la actividad de las cepas Gram positivas, predominando la actividad antibacteriana del extracto hexánico, seguidos de los de acetato de etilo y en menor proporción los metanólicos. *Shigella boydii* es la única bacteria Gram negativa que muestra sensibilidad con los tres extractos.

La evaluación de los parámetros microbiológicos muestra que con la microtécnica, el extracto de AcOEt tiene mayor actividad antibacteriana puesto que presenta las concentraciones más bajas (CMI=0.12mg/ml). La técnica de difusión en agar exhibió los halos de mayor diámetro por parte del extracto hexánico (ver figuras 3 y 4), aunque el análisis de varianza no mostró diferencias significativas (ver tabla 4). La diferencia de acción antibacteriana de un método a otro se podría explicar por la afinidad del antibacteriano con la emulsión del medio. En la técnica de difusión en agar el contacto se produce por efecto de difusión, mientras que en la microtécnica hay un contacto más íntimo entre bacteria y compuesto (Por ser un medio más homogéneo).

En el halo de inhibición existe un gradiente de concentraciones bactericidas y bacteriostáticas. Se ha detectado que a concentraciones subletales, las células bacterianas

producen fosfolípidos adicionales en la membrana que proporcionan resistencia al antibacteriano (Burt y Reinders, 2003). Este mecanismo de resistencia permite reiniciar el crecimiento de colonias bacterianas; de tal forma, que un halo con un diámetro inicial se verá reducido en tamaño al momento de leer los resultados. Este proceso también podría explicar que el extracto hexánico muestre los halos con diámetro mayor en comparación con el extracto de AcOEt.

El estudio prospectivo realizado por Rocha (2002) con *L. achyranthifolia*, muestra un rango de actividad antibacteriana de los extractos, más amplio que el aquí mostrado; el autor reporta actividad contra siete cepas Gram negativas. Esto podría explicarse, por el hecho de que su época de colecta (Septiembre) coincide con uno de los meses de mayor precipitación pluvial (ver Apéndice VI). Lo cual pudo haber permitido la dispersión y proliferación de colonias de microorganismos fitopatógenos que invadieron las plantas desencadenando los procesos de defensa con un mayor rango de acción. Aunado a este evento meteorológico, la época de producción de fruto se presenta dentro de ese periodo, cabe recordar que estas estructuras son una fuente rica de azúcares los cuales permiten la sobrevivencia de los microorganismos. Las bacterias, al igual que los invasores fúngicos puede ser transportado por artrópodos vectores (Atlas y Bartha, 1998), por lo que mientras las colonias bacterianas se estén desarrollando en la planta hospedera, esta desencadenará mecanismos de defensa, entre ellos la producción de compuestos con función protectora (Fitoalexinas) (Boller, 1995).

El compuesto β -sitosterol ha sido detectado previamente en *L. achyranthifolia* (ver apéndice I). Especies vegetales que contienen este compuesto sirven de alimento a algunos artrópodos. Los artrópodos al consumir este metabolito ahorran pasos biosintéticos en el proceso para la producción de α -ecdisona, hormona involucrada en la muda del exoesqueleto (Harborne, 1988). Esta podría ser una posible interacción donde el artrópodo puede estar fungiendo como vector transmisor de bacterias, desencadenando los procesos de producción de antibacterianos en *L. achyranthifolia*; contribuyendo en la conformación de las propiedades de la planta y por ende de los extractos.

Aceites esenciales: Composición química.

En los aceites esenciales se detectaron 25 compuestos (ver tabla 6). El 41.23% del aceite está constituido por monoterpenos y el 58.78% por sesquiterpenos. Los compuestos carvacrol, isocariofileno, α -bisabolol, β -bisaboleno y 1,8-cineol conforman los constituyentes principales de los aceites esenciales, representando el 77.53%. Las proporciones de 1,8-cineol mayores que linalol coinciden con lo reportado por Echeverrigaray *et al* (2003).

El 6.78% de los compuestos detectados en los aceites esenciales están reportados como volátiles con actividad atrayente de organismos que contribuyen al proceso de polinización (linalol, 1,8-cineol y alcanfor), el α -bisabolol con el 11.23% es reportado con actividad gastroprotectora y como aromatizante (Harborne, 1988 ; Villegas *et al.*, 2001).

Aceites esenciales: Actividad antibacteriana.

Los aceites esenciales mostraron un espectro de actividad muy amplio, ya que inhibieron el crecimiento de las catorce cepas bacterianas utilizadas.

Mazzanti *et al* (1998) encontraron actividad antibacteriana en los aceites esenciales de *Hyssopus officinalis* var. *decumens* contra *E. coli*. Los compuestos 1,8-cineol y alcanfor constituían el 64% del total de los aceites de esta planta. Esos dos compuestos también fueron detectados en dos especies del género *Achillea* (Compositae), Ünlü *et al* (2002) determinaron que eran bactericidas y el que el compuesto terpinen-4-ol era bacteriostático, contra *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. Kim *et al* (1995) ya habían reportado que terpinenol junto con linalol presentaban propiedades bacteriostáticas. También mencionan, que el carvacrol presenta actividad dependiente de la concentración, bacteriostática a 250 μ g/ml y bactericida a 500 μ g/ml.

El mecanismo de acción del carvacrol fue investigado por Helander *et al* (1998). Este compuesto provoca desintegración de la membrana exterior de las bacterias Gram negativas ó aumento de permeabilidad provocando la salida del ATP y disminuye el crecimiento bacteriano. Este mecanismo de acción podría explicar el que los halos de inhibición de las

cepas Gram negativas sean mayores que los de las cepas Gram positivas ante los aceites esenciales (ver figura 4). Aunque en términos generales los parámetros microbiológicos mostrados en la tabla 5, concuerdan con lo expuesto por Kim *et al* (1995) en los que los aceites esenciales muestran mayor actividad antibacteriana con las cepas Gram positivas que con las cepas Gram negativas.

Las propiedades antifúngicas del flavonoide crisosplenetina y el esteroide β -sitosterol (ver apéndice I) han sido evaluadas contra *Candida albicans*. Esta cepa fue insensible ante estos dos compuestos (Tang *et al.*, 2000). Recordando que *L. achyranthifolia* es utilizada en el estado de Hidalgo para combatir el flujo blanco (Espinoza, 1985), estos compuestos se descartan como principios activos contra este padecimiento en caso de ser originado por *Candida albicans*, lo que conduce a retornar la atención hacia los constituyentes de los aceites esenciales. Ya que el aceite esencial de la planta *Thymus revolutus*, donde el carvacrol aparece como el componente principal con el 43.13%, inhibe el crecimiento de este microorganismo (Karaman *et al*, 2001). En el presente trabajo se detectó 30.64% de carvacrol en *L. achyranthifolia*; la presencia de este compuesto podría explicar su propiedad curativa para el flujo blanco.

Con estos antecedentes se puede decir que *Lantana achyranthifolia* tiene 36.16% de compuestos bactericidas (1,8-cineol, alcanfor y carvacrol) y 1.98% con actividad bacteriostática (linalol y terpinen-4-ol), esta combinación, aunado a los procesos de sinergia entre los compuestos permite que estos alteren los diferentes procesos enzimáticos de reproducción bacteriana, proporcionándole a los aceites esenciales de *L. achyranthifolia* su propiedad antimicrobiana, ya sea afectando la integridad de la capa de fosfolípidos de la membrana celular bacteriana, aumentando la permeabilidad y pérdida de constituyentes celulares, separando sistemas enzimáticos (de producción de energía y síntesis de componentes estructurales) y/o destrucción e inactivación del material genético (Kim *et al.*, 1985; Juven *et al.*, 1994).

Como punto final se recalca el argumento mencionado: Las propiedades antibacterianas de *Lantana achyranthifolia* podrían ser producto de la combinación de las condiciones

ambientales de Zapotitlan de las Salinas y diferentes interacciones ecológicas que involucra microorganismos. Esta combinación ejerce influencia en la formación y proporción de determinados compuestos químicos. Tal proporción y presencia de compuestos le confieren a la planta propiedades curativas aprovechadas en las prácticas etnomédicas.

Todo lo anterior permite enunciar que el principal aporte de este trabajo ha sido dar a conocer a algunos compuestos que podrían estar involucrados en el proceso de sanación de infecciones gastrointestinales.

CONCLUSIONES.

Todo lo anterior permite exponer las siguientes conclusiones.

- Los tres extractos y los aceites esenciales presentan actividad antibacteriana.
- Las cepas Gram positivas mostraron mayor sensibilidad que las cepas Gram negativas ante los extractos.
- *Shigella boydii* fue la única cepa Gram negativa susceptible a la actividad antibacteriana de los tres extractos y los aceites esenciales.
- Los aceites esenciales mostraron actividad antibacteriana contra todas las cepas utilizadas.
- Las cepas Gram negativas mostraron mayor sensibilidad ante los aceites esenciales.
- Los constituyentes principales de los aceites esenciales de *Lantana achyranthifolia* colectada en Zapotitlán de las Salinas Puebla fueron: Carvacrol, Isocariofileno, α -bisabolol, β -bisaboleno y 1,8-cineol.
- Los resultados de la actividad antibacteriana obtenidos con *Lantana achyranthifolia* y las propiedades identificadas previamente en algunos de los componentes de los aceites esenciales, proporciona una base fitoquímica para el uso etnobotánico de la planta para aliviar infecciones gastrointestinales.

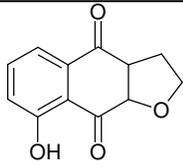
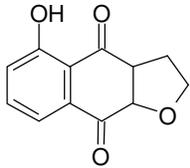
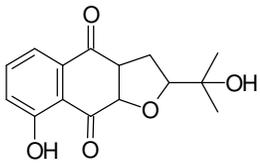
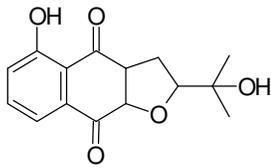
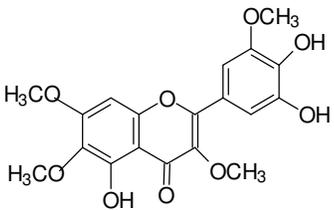
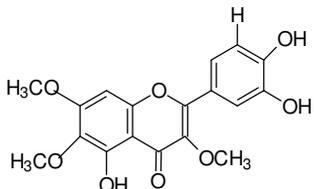
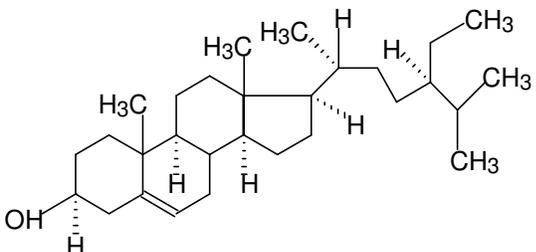
PERSPECTIVAS.

Este trabajo está enfocado a evaluar actividad antibacteriana, por lo que a continuación se hacen varias sugerencias de trabajos que de aquí se pueden desprender.

- Investigación y corroboración de los procesos fisiológicos vegetales mencionados.
- Investigación y corroboración de los procesos farmacológicos, considerando repercusiones genotóxicas.
- Comparación de los constituyentes principales a lo largo del ciclo de vida de la planta.
- Comparación de los constituyentes principales entre sus diferentes partes y órganos.
- Comparación de los constituyentes principales con otras áreas geográficas, ya sea a lo largo de Zapotitlán de las Salinas Puebla ó ampliando con otras regiones del país.
- Corroborar los vectores de transmisión y que tipo de utilidad obtiene el herbívoro.
- Estudiar la factibilidad de uso de la especie a una escala comercial.

APÉNDICES.

I.- Estructuras químicas de compuestos previamente identificados en *L. achyranthifolia*

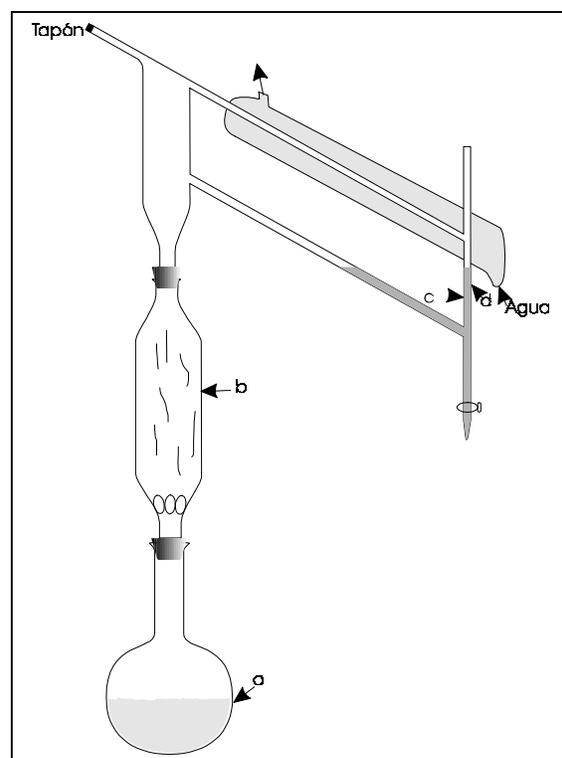
Naftoquinonas	
 (Dominguez, <i>et al</i> , 1985)	 (Abeygunawardena <i>et al</i> , 1991)
Análogos	
 (Abeygunawardena <i>et al</i> , 1991)	 (Abeygunawardena <i>et al</i> , 1991)
Flavonoides	
 Crisosplenetina (Dominguez, <i>et al</i> , 1985)	 Penduletina (Dominguez, <i>et al</i> , 1985)
Esteroles.	
<p>β-sitosterol</p>  (Dominguez, <i>et al</i> , 1985)	

II.- Destilación por arrastre de vapor.

Los aceites esenciales se obtienen por la técnica de destilación por arrastre de vapor a partir de material vegetal lo más fresco posible. Este método explota la característica que poseen los aceites esenciales de soportar bajas presiones de vapor y por lo tanto pueden ser arrastrados por sustancias que poseen presiones de vapor más altas. El aparato a utilizar es el mostrado en la figura 6.

Figura 6.- Destilación por arrastre de vapor.

Empleando este aparato se pueden destilar por arrastre de vapor continuo de 100 a 500g de planta fresca, con buena recuperación de aceites esenciales. Sin embargo, para obtener la cantidad adecuada se monta la unidad las veces que sea necesario. En caso de que el rendimiento sea muy bajo se puede colocar en "d" un poco de éter etílico para obtener los aceites esenciales y el destilado. Las graduaciones en "c" permiten medir el rendimiento, el cual se puede corroborar con micropipeta, se refrigera a 0°C por 24 hrs para separar el éter de la mezcla. Del extracto acuoso contenido en "a" se puede recuperar en caso de presentarlos alcaloides, taninos, saponinas, etc (Domínguez, 1973).

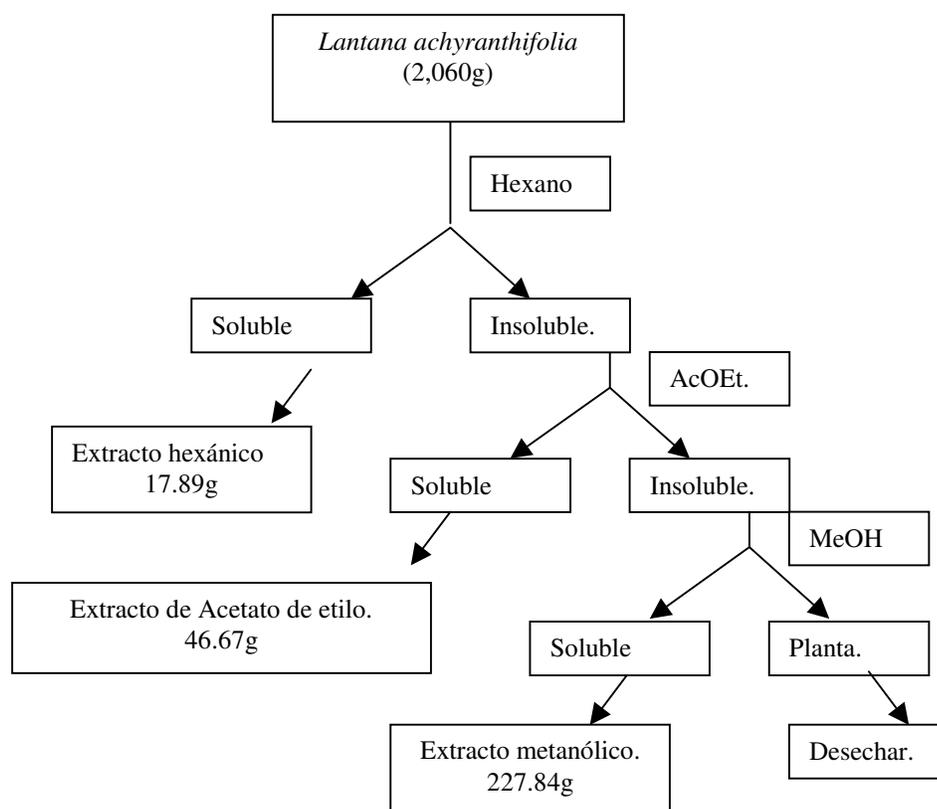


III.- Extracción por percolación.

Esta técnica de extracción por percolación se realizó aprovechando las propiedades de los compuestos de ser arrastrados por su afinidad con los solventes (Jeffery *et al.*, 1989).

El material desecado y triturado (parte aérea) se colocó en una columna de cristal para percolado al cual se le agregaron en orden los siguientes disolventes: hexanos, acetato de etilo y metanol. El orden está determinado de acuerdo a su polaridad (de menor a mayor). Cuando el solvente eluido salía de la columna incoloro, se le cambiaba de solvente hasta llegar al metanol. Cuando se terminó la extracción el material insoluble se desechó.

Figura 7.- Diagrama del proceso de percolación.:



Una vez obtenido cada uno de los extractos (parte soluble) se concentró a sequedad bajo presión reducida, usando un Rotavapor Buchi (R-124). Realizado este proceso se calculó el rendimiento total de cada extracto (ver tabla 2).

IV.- Difusión en agar de Kirby-Bauer.

(Van den Berghe y Vlietinck, 1991)

Este método se utilizó para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos herbales y los aceites esenciales, la metodología es la siguiente:

MEDIO. Se utilizó 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 significativos. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4mm de espesor producen una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

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

El estándar 0.5 de McFarland se prepara añadiendo 0.5ml de cloruro de bario a 99.5ml de H₂SO₄ 0.36 N. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudios se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o en su defecto con un espectrofotómetro a 660nm.

Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina al 0.9 % hasta igualarlas. Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana y antes de retirarlos se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una

placa de agar de Müeller– Hinton (Bioxon 110-1), previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente; es aconsejable mantener la tapa entre abierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar, Finalmente, se siembra mediante estrías en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

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

APLICACIÓN DE SUSTANCIAS. Para este caso, se utilizaron sensidiscos de 5mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5 (los pozos se utilizaron con el extracto hexánico; los sensidiscos para evaluar los extractos de polaridad intermedia, alta y los aceites esenciales): en todos los casos se hicieron las diluciones necesarias para que los pozos y los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto (2mg/ml para disco y 2mg/10µl para pozo).

Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los sensidiscos impregnados con las sustancias a evaluar se colocaron en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril, los sensidiscos deben colocarse por los menos a 22mm uno de otro y a 14mm del borde de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS. Los sensidiscos se impregnaron con los extractos a valorar hasta llegar a la concentración deseada de sustancias (2mg/10µl) por disco; el hexano, acetato de etilo y el metanol se utilizaron para solubilizar los extractos, para posteriormente impregnar los discos dejando evaporar el solvente durante 24 horas.

CONTROLES NEGATIVOS. Se utilizaron sensidiscos con los diferentes solventes (metanol, acetato de etilo y hexano) dejándolos evaporar durante 24hrs. Al igual que los experimentales.

CONTROL POSITIVO. Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos impregnados con 25µg de cloramfenicol (Bigaux).

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

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS. Las zonas de inhibición se midieron con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, la prueba se realizó por triplicado y se reportaron los valores promedio en mm.

V.- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

(Koneman, 1985).

Método modificado de macrodilución en agar.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) utilizando el método modificado de macrodilución en agar, realizándose por triplicado. Esta técnica fue empleada para determinar los parámetros microbiológicos de los extractos (hexánico, de AcOEt y metanólico).

a) Preparación de reactivos y diluciones

La solución antibacteriana de trabajo se prepara diluyendo en el agar de Mueller-Hinton (Bioxon 2609) a la mayor concentración final deseada. La prueba se realiza en cajas petri. Las concentraciones utilizadas fueron: 0.075, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 0.5 y 2.0mg/ml. En cada caja se colocaron 3ml de agar con la concentración de extracto correspondiente, cada bioensayo se realiza por triplicado manejándose un control positivo y un negativo.

b) La inoculación e incubación de los tubos.

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

c) Para la interpretación de los resultados

Transcurrido el tiempo de incubación se leen los resultados. La menor concentración de antibacteriano que produce una inhibición completa del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Una inhibición muy ligera o colonias definidas

se considera evidencia de que la sustancia evaluada ha sido incapaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

d) Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM)(Finegold y Jo Baron, 1989, Citado en Avila, 1996).

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un organismo se realiza la prueba de actividad bactericida, empleando el mismo sistema de dilución en caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento inmediatamente después de ser sembrado, la cual se inocular en una placa de agar de Müeller-Hinton (Bioxon 110-1) para determinar el número real de UFC (unidades formadoras de colonia) del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la inoculación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación del factor de dilución.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) MEDIANTE LA MICROTECNICA DE DILUCIÓN EN CALDO DEL COMPUESTO ACTIVO.

La microtécnica de dilución tiene el mismo principio que el método de dilución en caldo, excepto que la susceptibilidad de los organismos a los antibacterianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una caja plástica. Las placas de Elisa que se utilizan son de 96 concavidades con fondo curvo. Los parámetros microbiológicos de los aceites esenciales se obtuvieron mediante esta técnica. La razón de utilizar este método es que permite evaluar sustancias de las cuales se dispone de cantidades muy pequeñas (menores a mg).

Preparación de reactivos y diluciones.

La microplaca se preparó colocando 50µl de caldo Müeller-Hinton (Bioxon 260) En cada pozo con las concentraciones del extracto o fracciones a probar en las concavidades apropiadas. Las concentraciones utilizadas fueron: 0.075, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 0.5 y 2.0mg/ml. Se dejó 24 horas para que se evapore el solvente en el que se disolvió el extracto,

cada bioensayo se realizó por triplicado manejándose un control positivo cloramfenicol (25µg/ml) y un negativo utilizando el solvente empleado en la extracción.

La inoculación e incubación de los tubos.

Se preparó una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10ml de caldo Müeller-Hinton (Bioxon 260) y se incubó a 35°C durante 18 a 24 horas (produciendo una concentración bacteriana de aproximadamente 10^8 organismos) y se diluyó en solución salina (0.8% de NaCl) para obtener una concentración aproximada 10^5 UFC/ml (unidades formadoras de colonias/ml). En cada una de las 96 concavidades se colocaron 50µl de esta suspensión diluida.

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

Después del tiempo de incubación se añadió a cada concavidad 50µl de una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada TTC (Tetrazolium Violet 2,5-Diphenyl-3' [-naphtyl] tetrazolium chloride [1719-71-7]) al 0.08%. La placa se incubó otros 30 minutos. En las concavidades donde se desarrollaron los organismos, el colorante se redujo a formazan, de color violeta, produciéndose un botón morado en el fondo de la concavidad. Donde no hubo desarrollo, la solución permaneció clara.

Para la interpretación de los resultados.

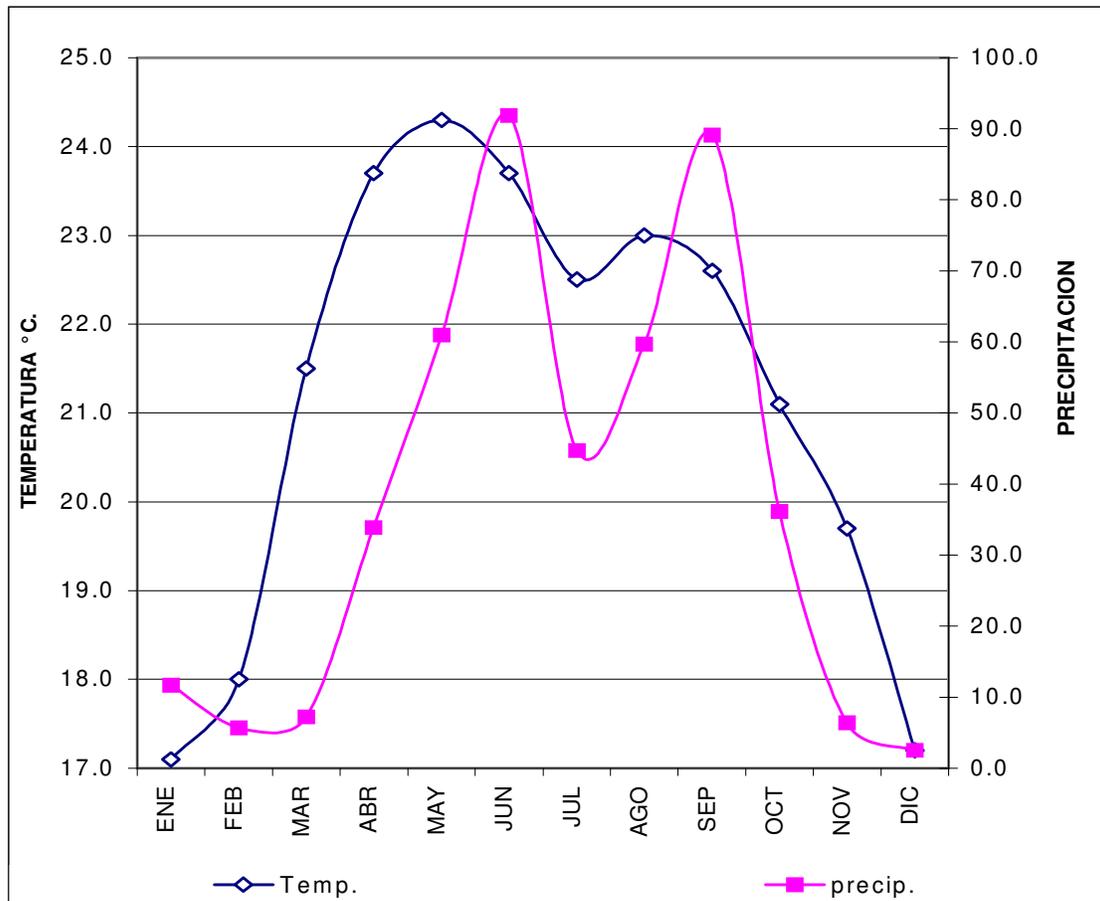
La menor concentración de antibacteriano que produjo una inhibición completa del desarrollo visible representa la **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**. Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se considero evidencia de que la droga fue incapaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

VI.- Régimen pluvial de Zapotitlán de las Salinas Puebla.

		ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC	ANUAL
Zapotitlán (Est. 21-105)	Temp.	17.1	18.0	21.5	23.7	24.3	23.7	22.5	23.0	22.6	21.1	19.7	17.2	21.2
	Precip.	11.7	5.7	7.2	33.9	61.0	91.9	44.7	59.7	89.1	36.1	6.4	2.5	450

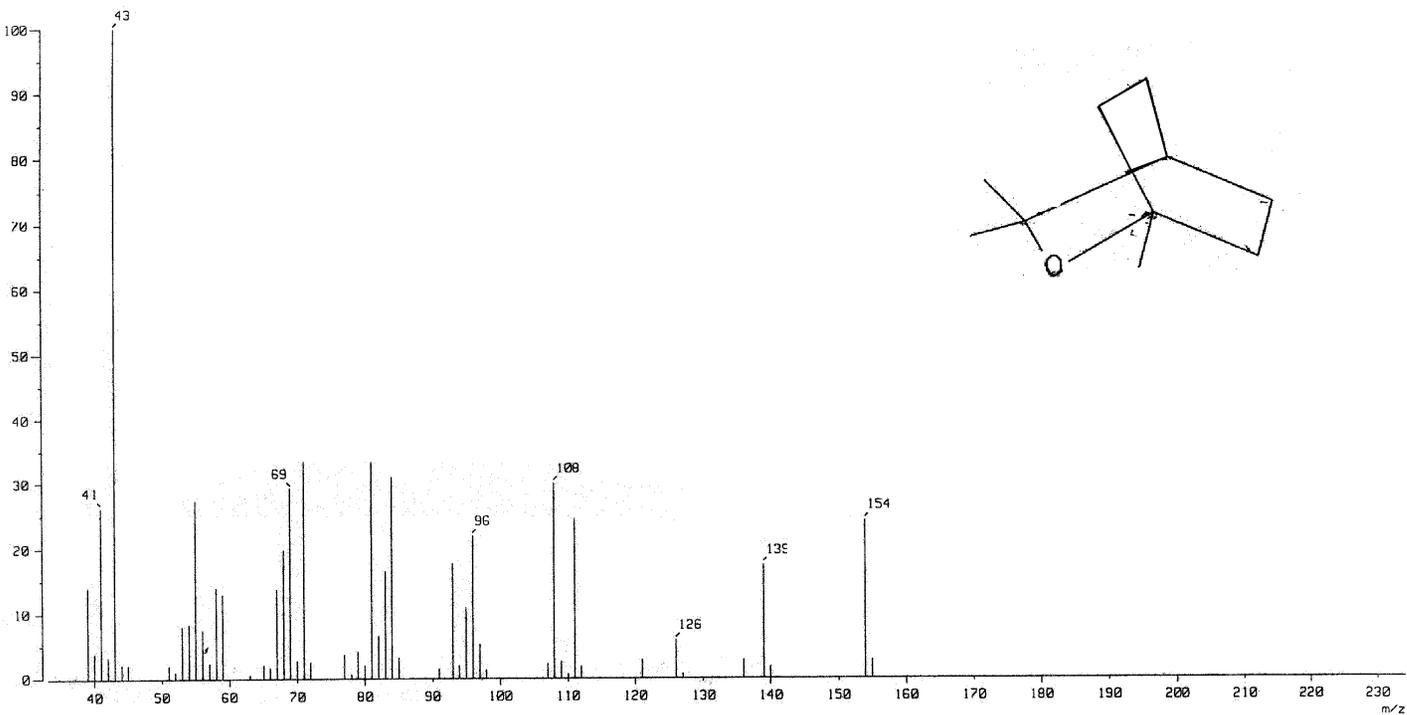
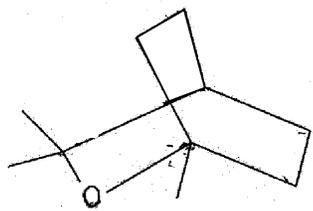
Datos Según Garcia E. (1981).

Figura 8.- Temperatura y precipitación de Zapotitlán de las Salinas Puebla.



* Temp = Temperatura; Precip = Precipitación.

VII.- Espectros de los compuestos detectados en los aceites esenciales.

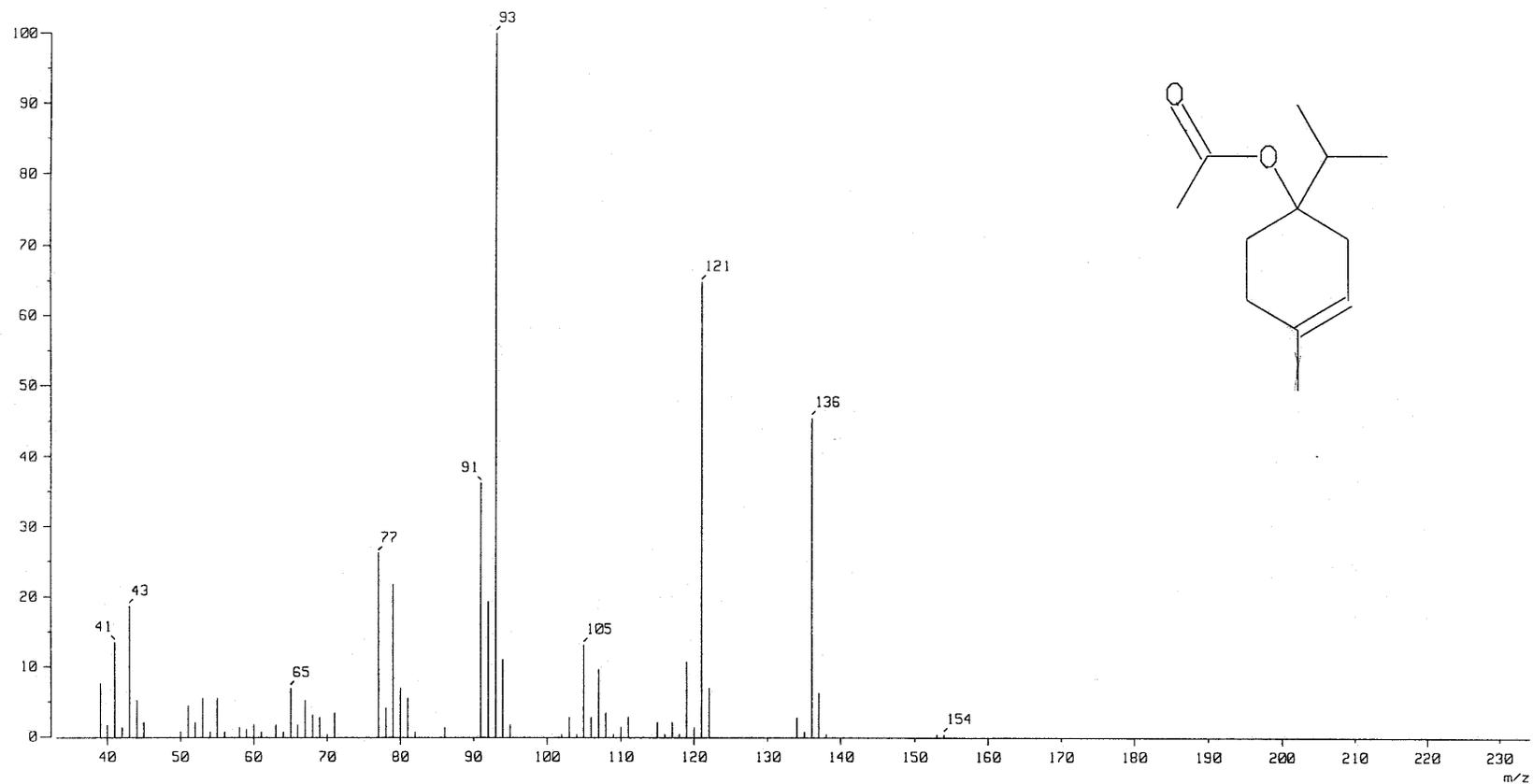


1.- 1,8 cineol

Nombre IUPAC = 1,3,3-trimetil,2-oxibiciclo 2.2.2 octano

Formula = C₁₀H₁₈O

Proporción obtenida = 5.03%

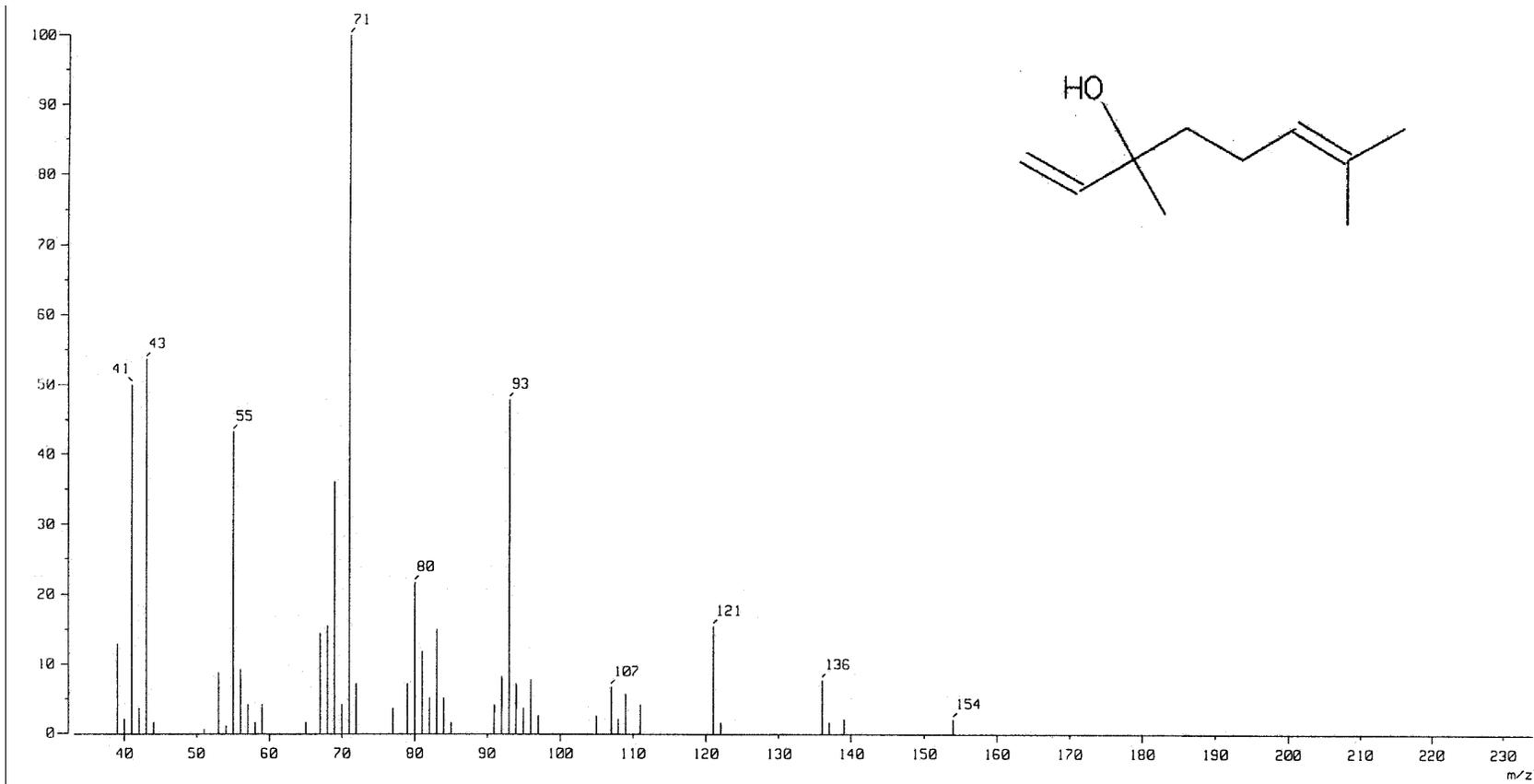


2.- Acetato de terpineno

Nombre IUPAC = 4-metil-1-(1-metiletil), acetato, 3-ciclohexen-1-ol

Formula = $C_{12}H_{20}O$

Proporción obtenida = 0.74%

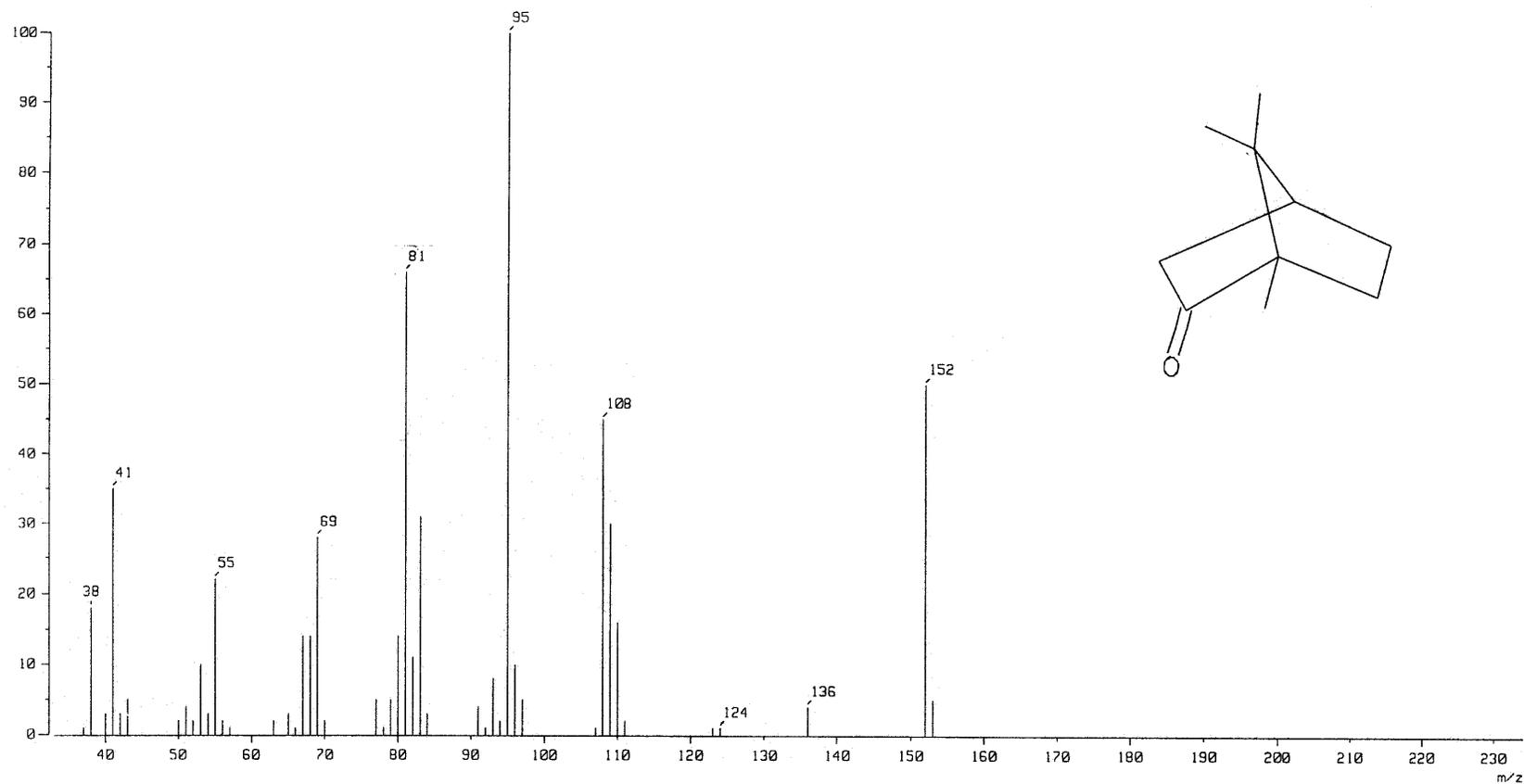


3.- Linalol

Nombre IUPAC = 1,7-dimetil,1,6-octadien-3-ol

Formula = $C_{10}H_{18}O$

Proporción obtenida = 1.26%

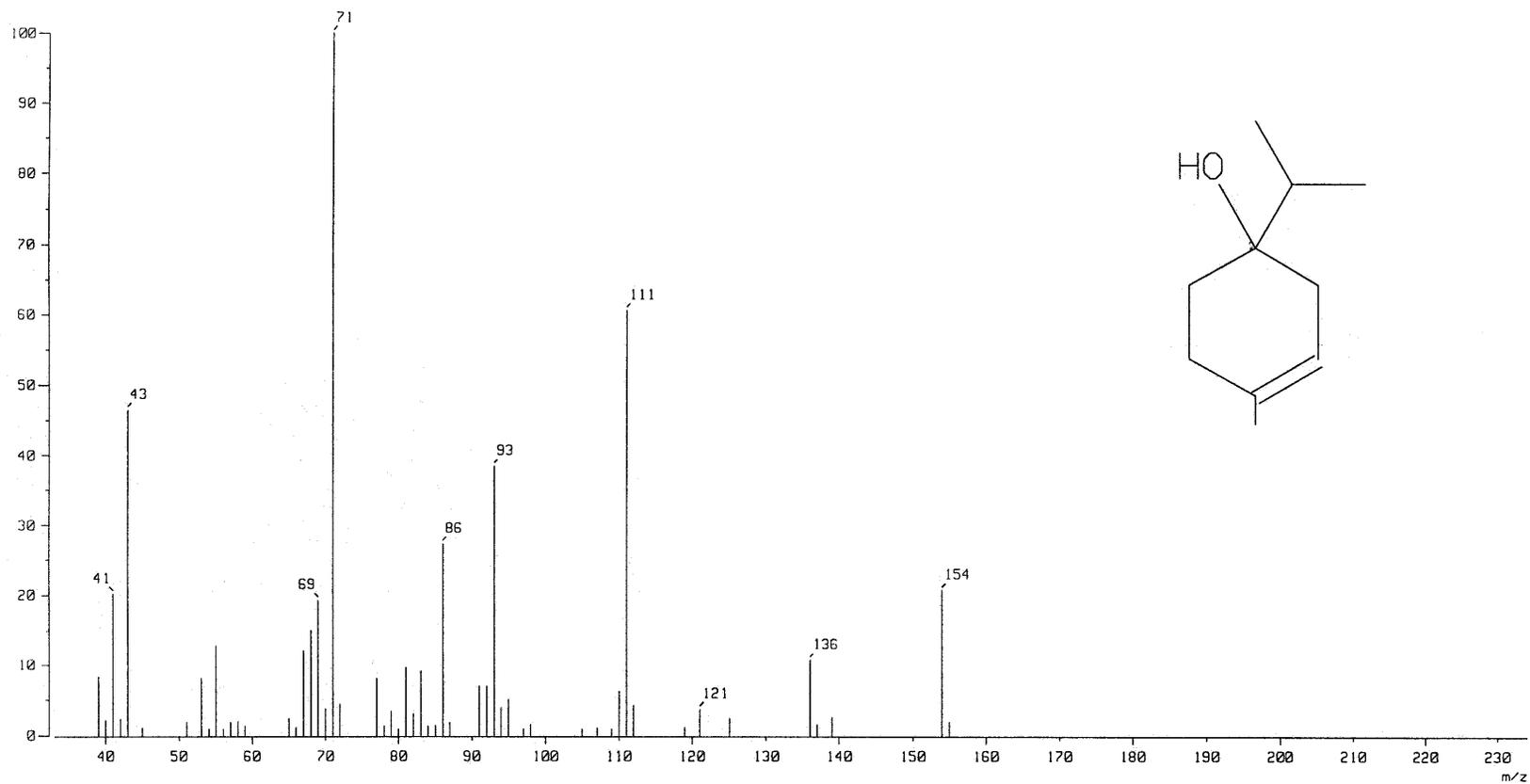


4.- Alcanfor

Nombre IUPAC = 1,7,7-trimetil, biciclo 2.2.1. heptan-2—ona

Formula = $C_{10}H_{16}O$

Proporción obtenida = 0.49%

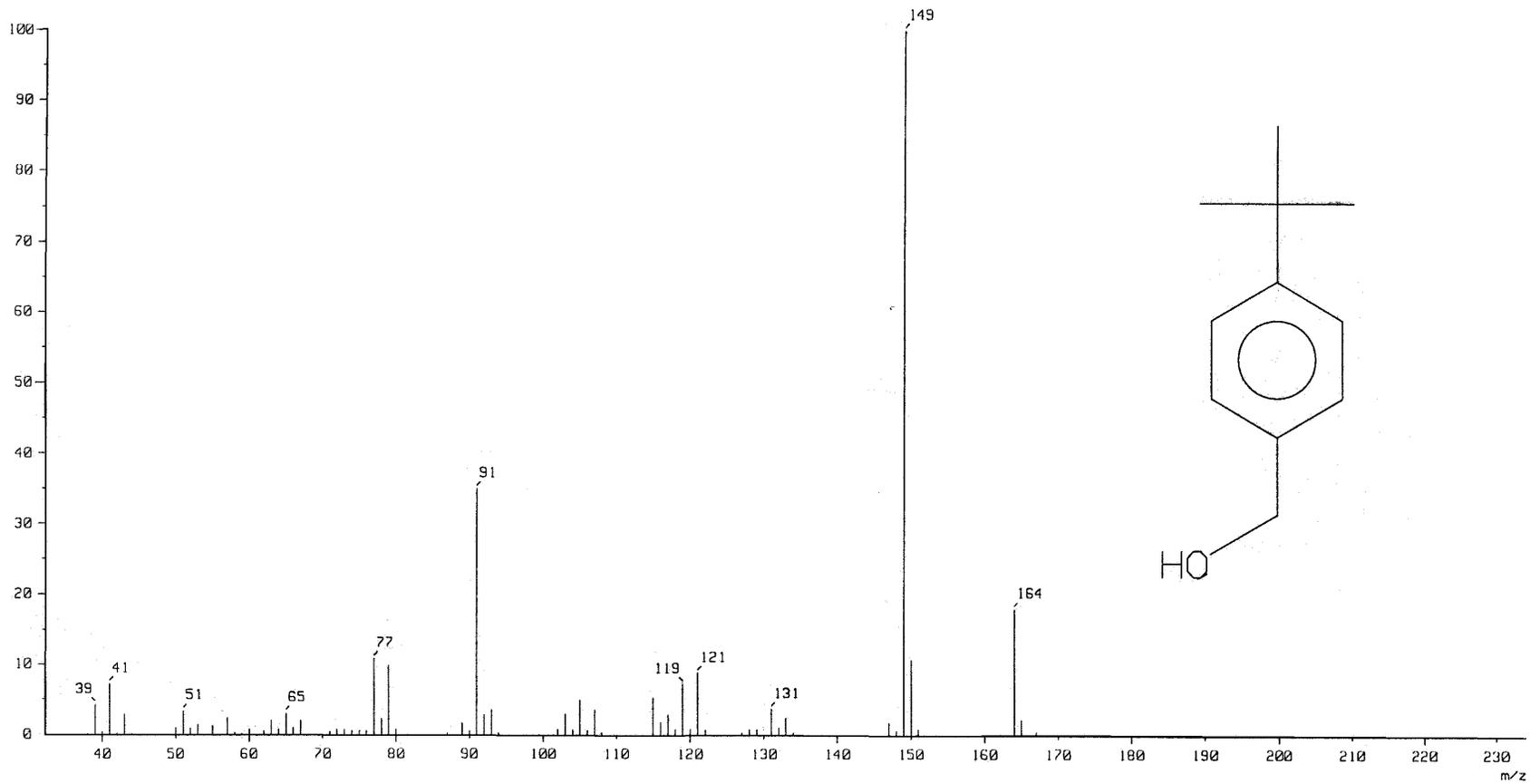


5.- Terpinen-4-ol

Nombre IUPAC = 4-metil-1-(1-metiletil), 3-ciclohexen-1-ol

Formula = $C_{10}H_{18}O$

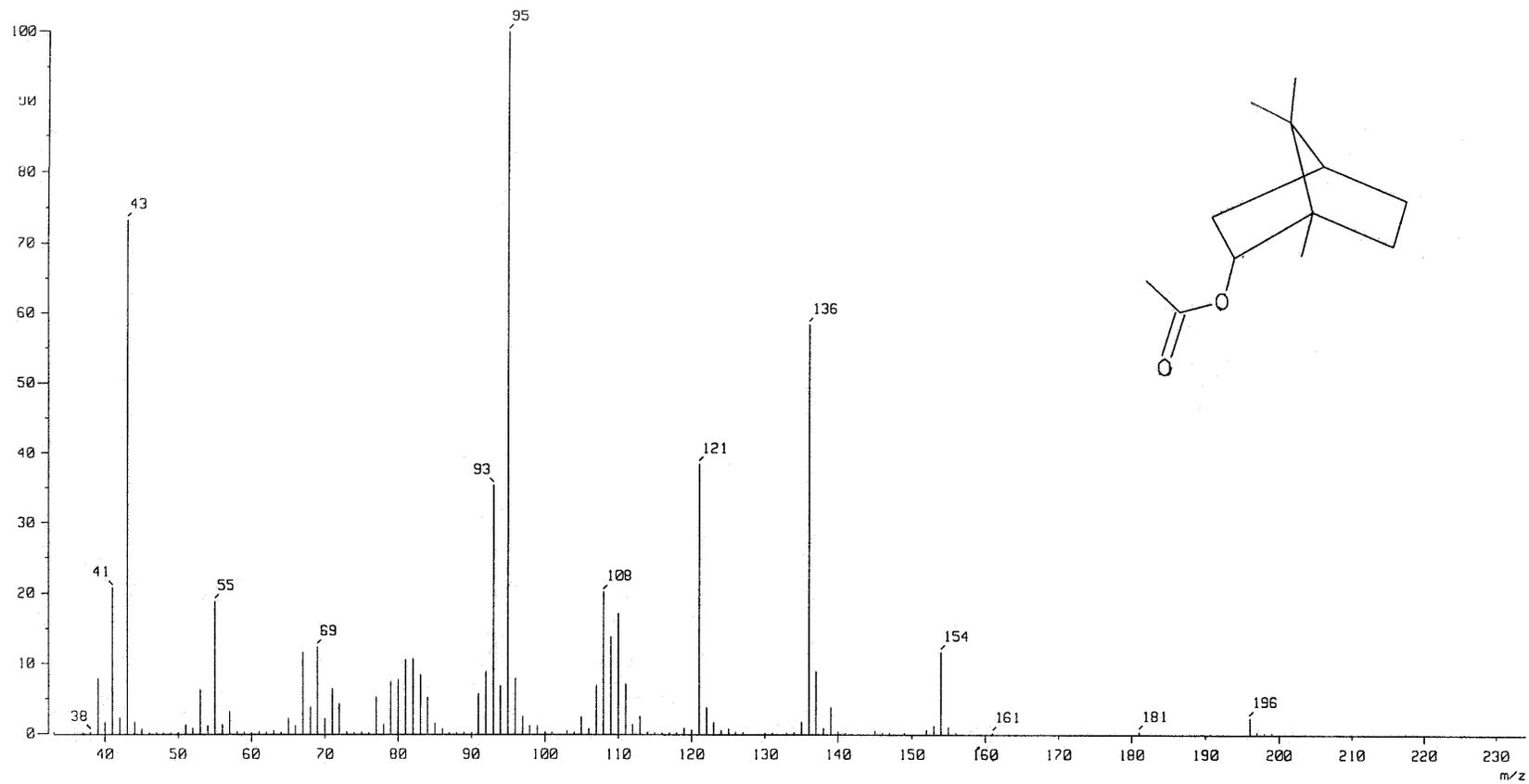
Proporción obtenida = 0.72%



6.- Nombre IUPAC= 4-(1,1-dimeteilil) Bencenometanol

Formula = $C_{11}H_{16}O$

Proporci3n obtenida = 0.78%

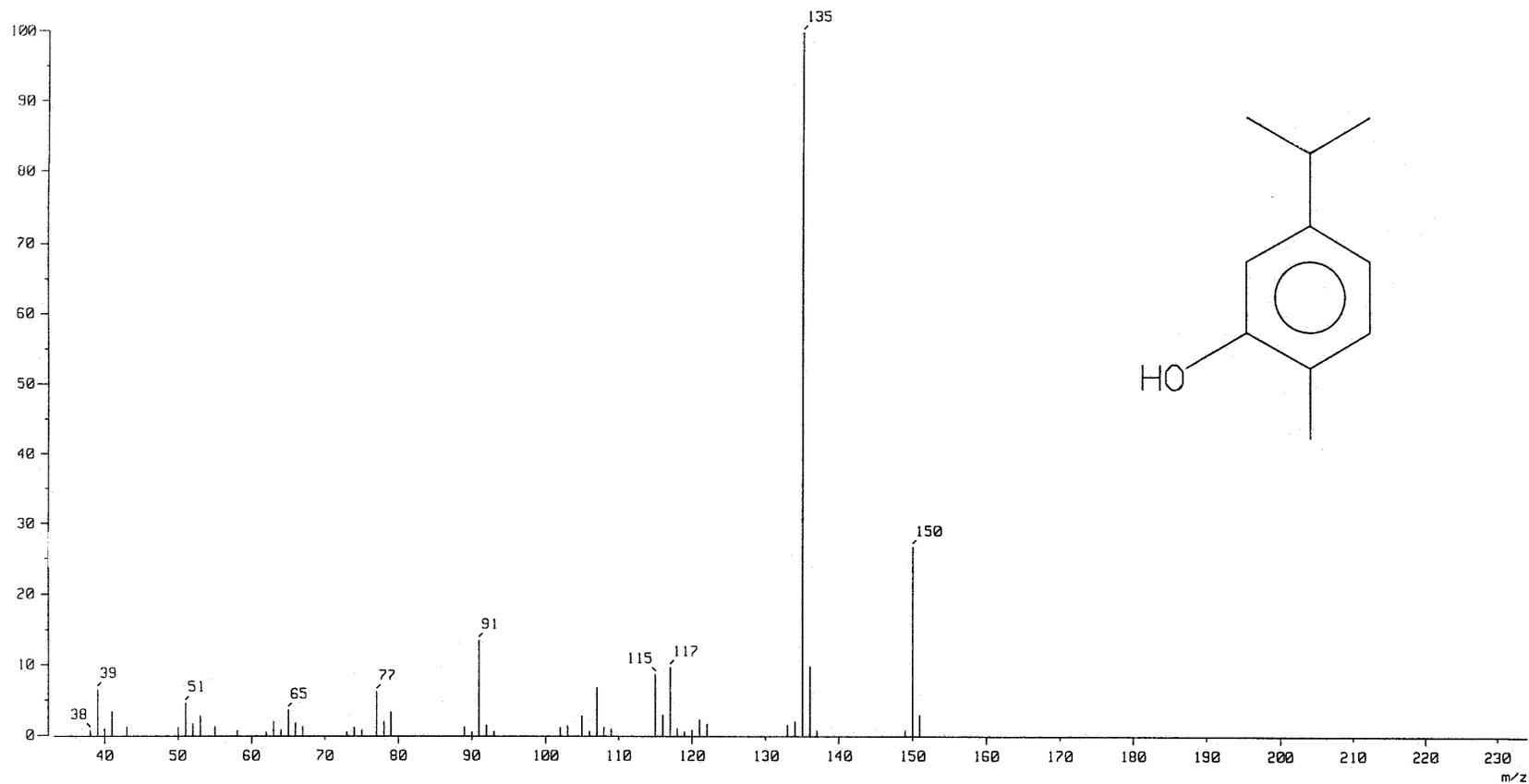


7.- Acetato de borneol

Nombre IUPAC = 1,7,7-trimetil, acetato, biciclo 2.2.1 heptan-2-ol

Formula = $C_{12}H_{20}O_2$

Proporción obtenida = 0.56%

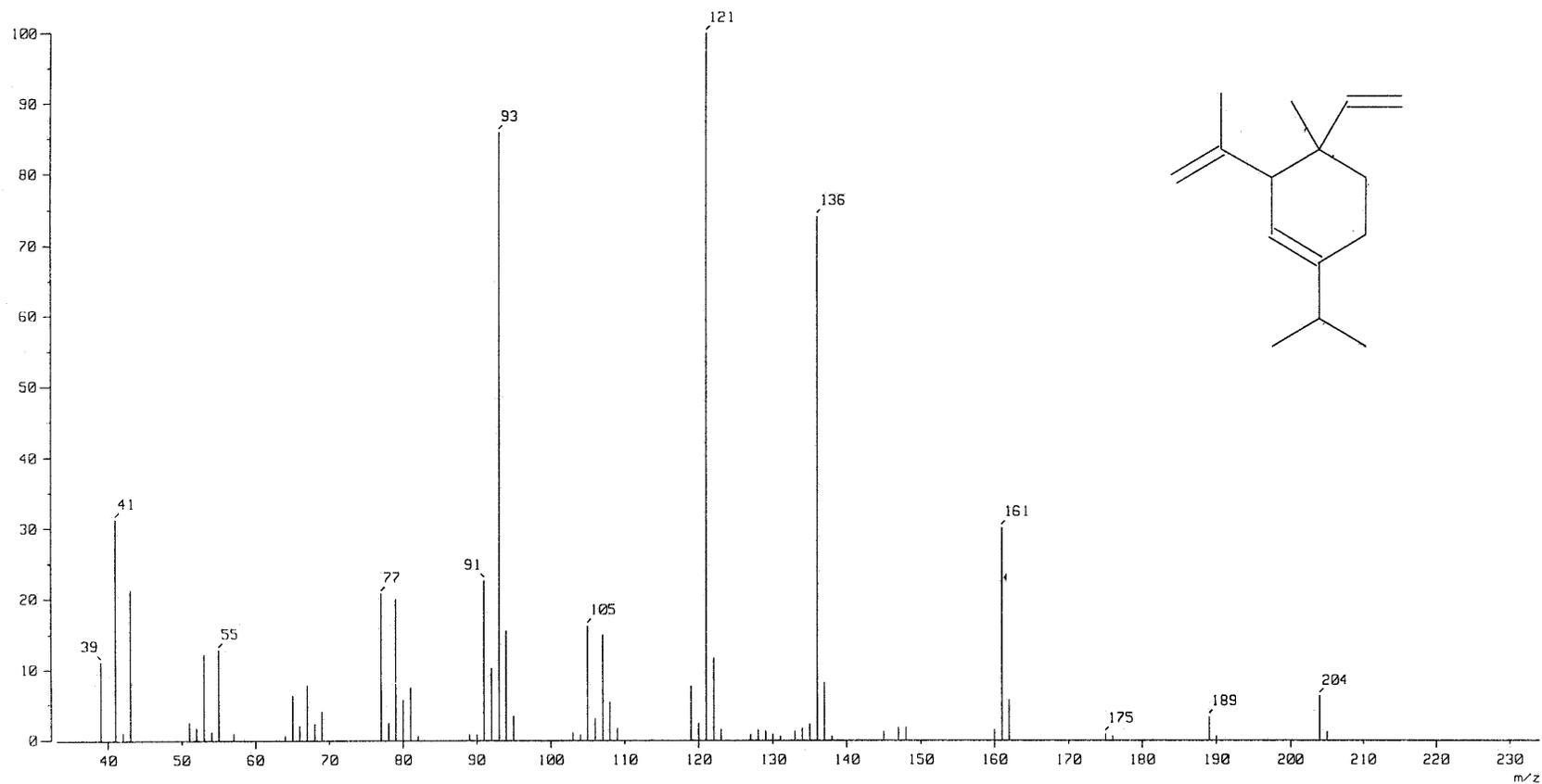


8.- Carvacrol

Nombre IUPAC = 2-metil-5-(1-metiletil) fenol

Formula = $C_{10}H_{14}O$

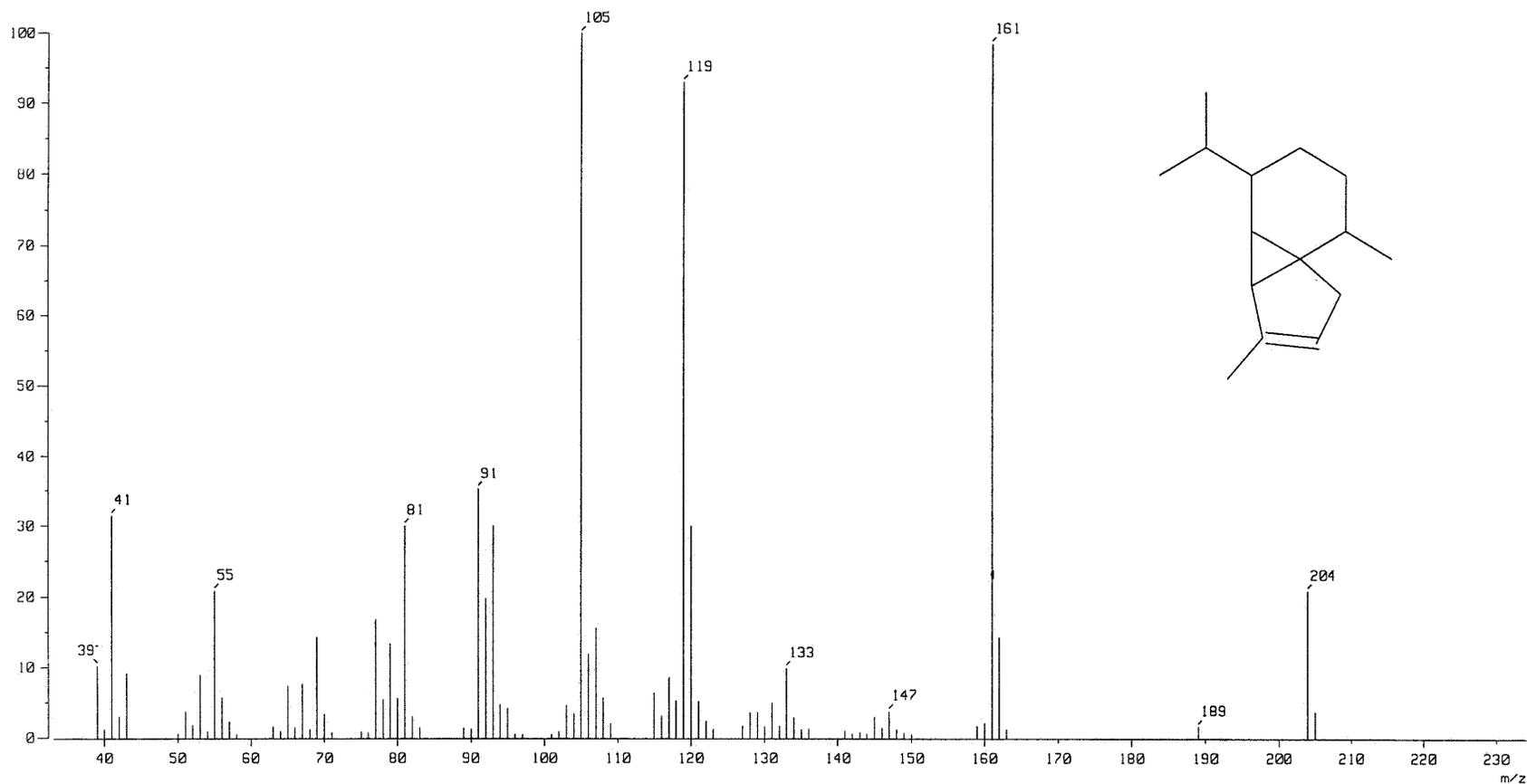
Proporción obtenida = 30.64%



9.- Nombre IUPAC = 4-etenil-4-metil-3-(1-metiletenil)-1-(1-metiletil) Ciclohexeno

Formula = $C_{15}H_{24}$

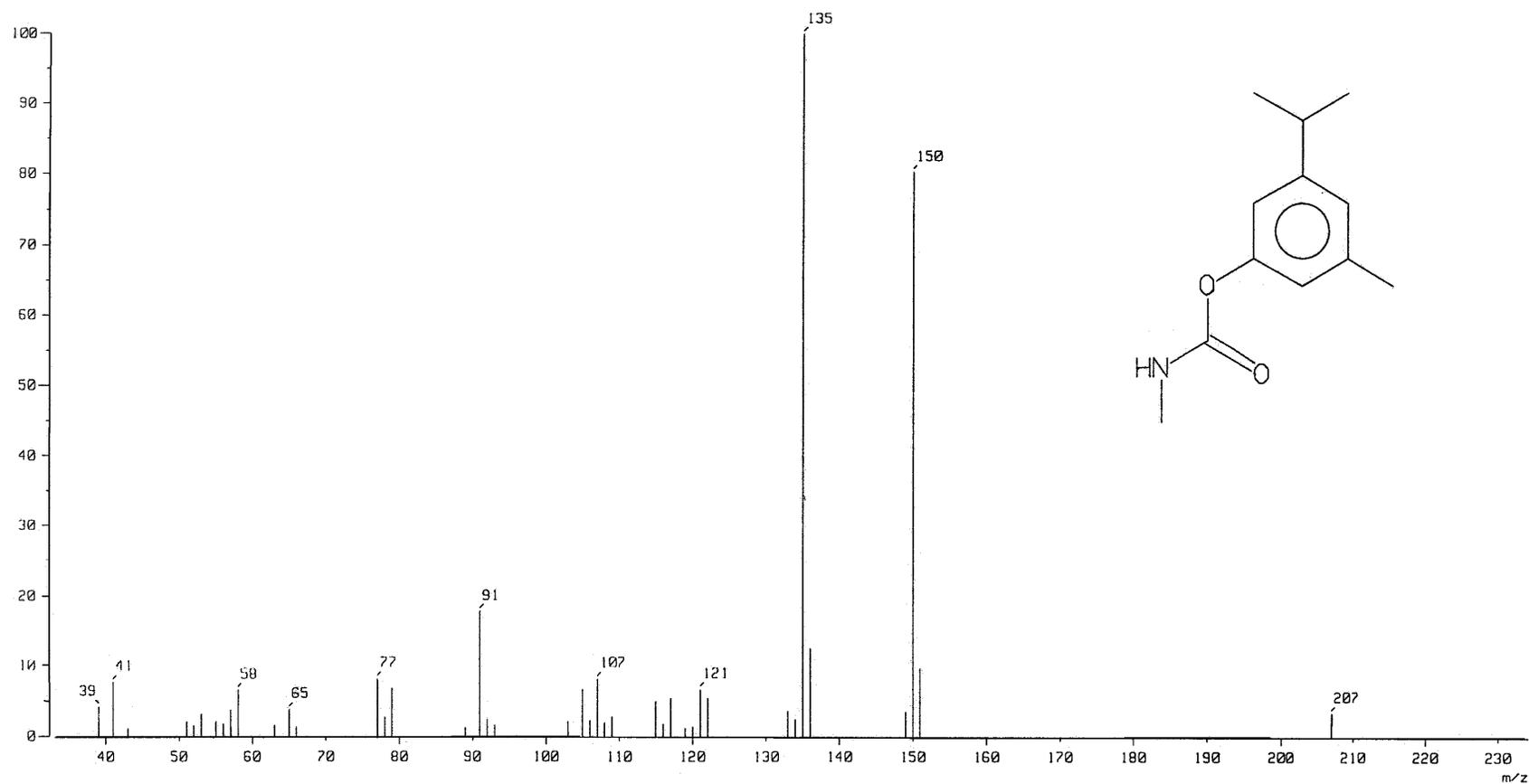
Proporción obtenida = 1.06%



10.- Nombre IUPAC= 4isopropil-3,7-dimetil-3^a,3b,4,5,6,7-hexahidro-1H-ciclopenta(1,3)ciclopropano(1,2)benceno

Formula = C₁₅H₂₄

Proporción obtenida = 0.46%

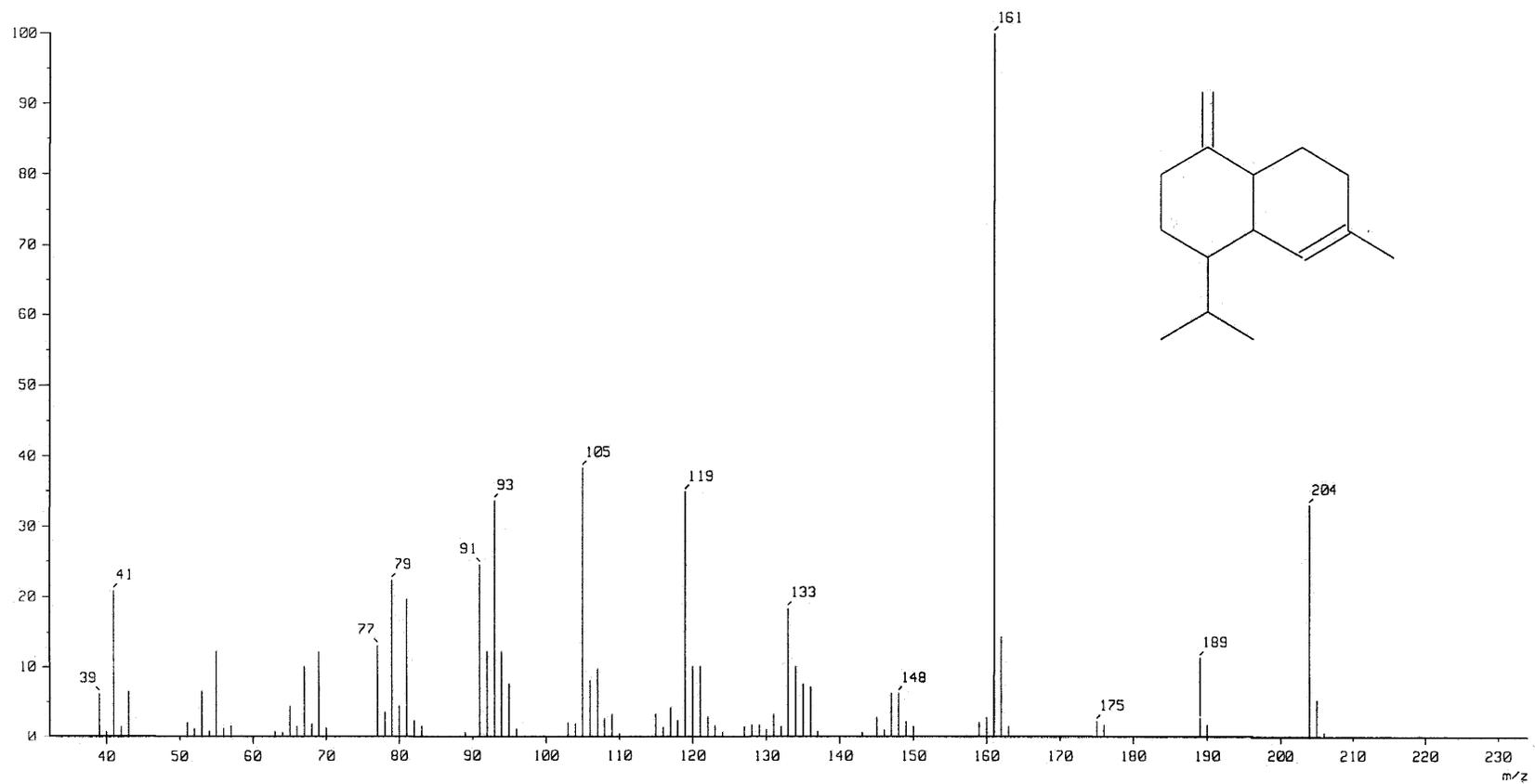


11.- Minacida

Nombre IUPAC = 1-metil-5-(1-metiletil), metilcarbamato, fenol

Formula = $C_{12}H_{17}O_2N$

Proporción obtenida = 1.01%

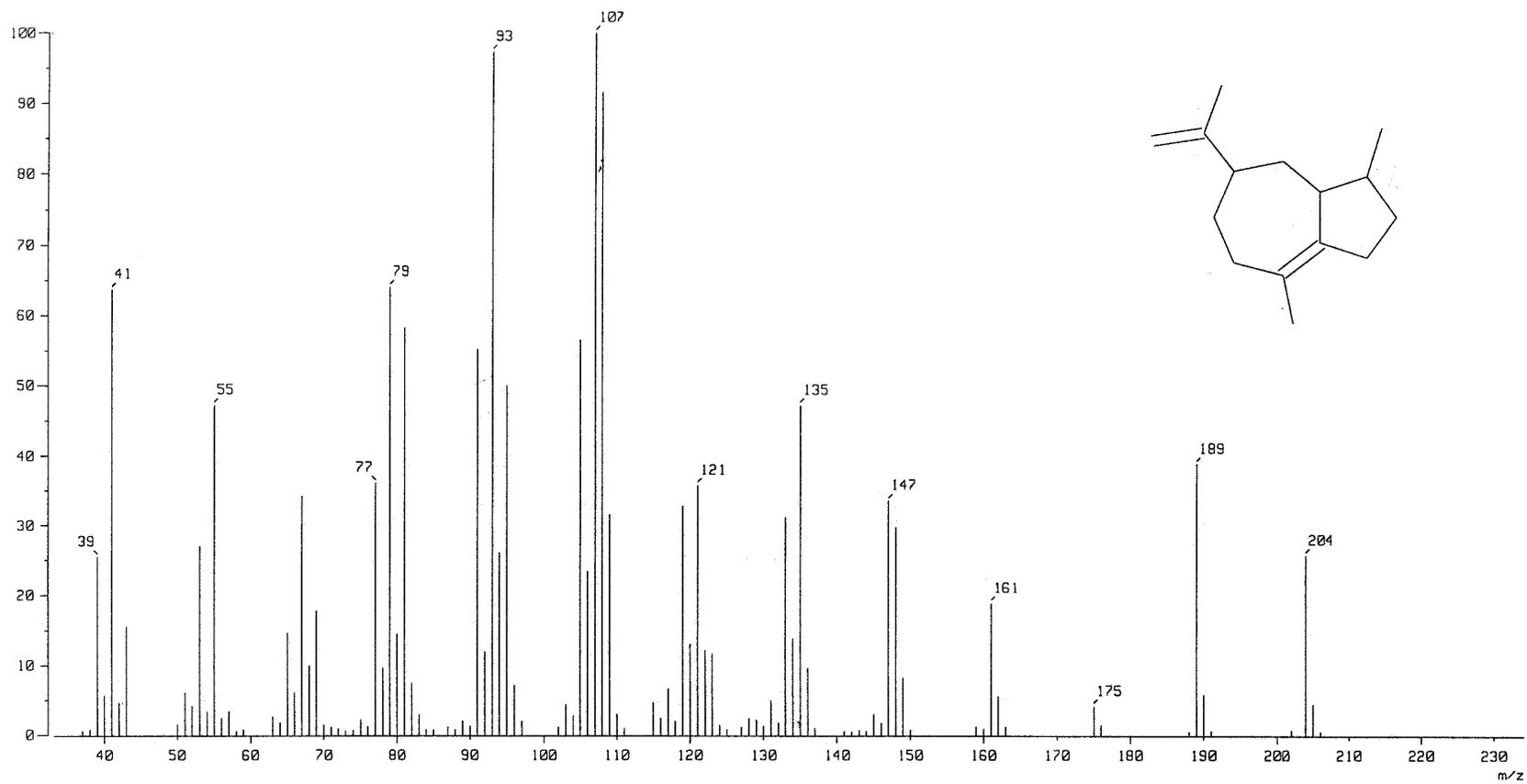


12 Y 19.- Candina 4(5), 10(14) dieno

Nombre IUPAC = 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahidro-7-metil-4- metilene-1-(1-metiletil) naftaleno

Formula = C₁₅H₂₄

Proporción obtenida = 3.38%

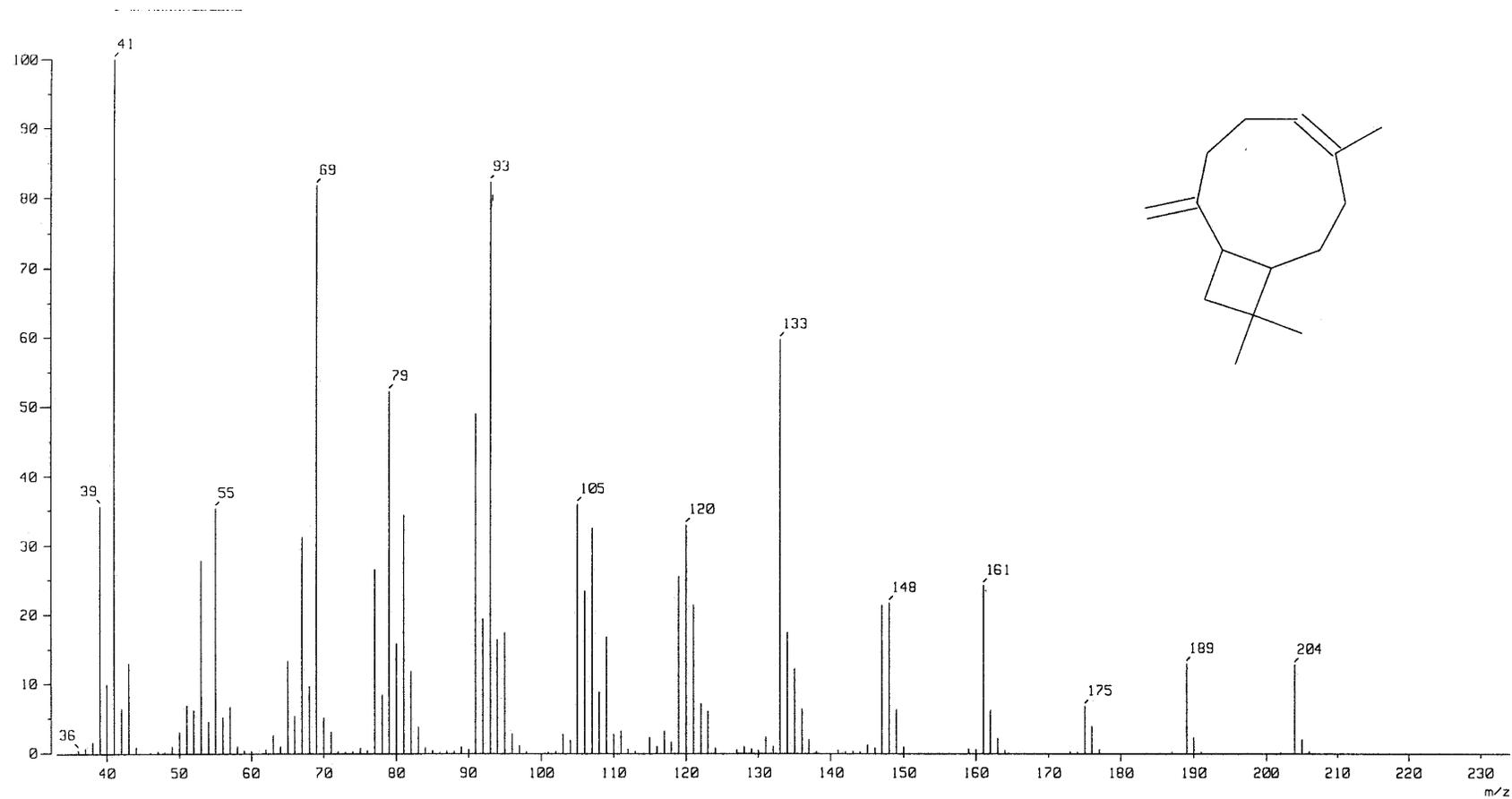


13.- Guaia 1(10), 11(12) dieno

Nombre IUPAC = 1,2,3,5,6,7,8,8a-octahidro-1, 4-dimetil-7-(1-metiletetil) azuleno

Formula = C₁₅H₂₄

Proporción obtenida = 2.76%

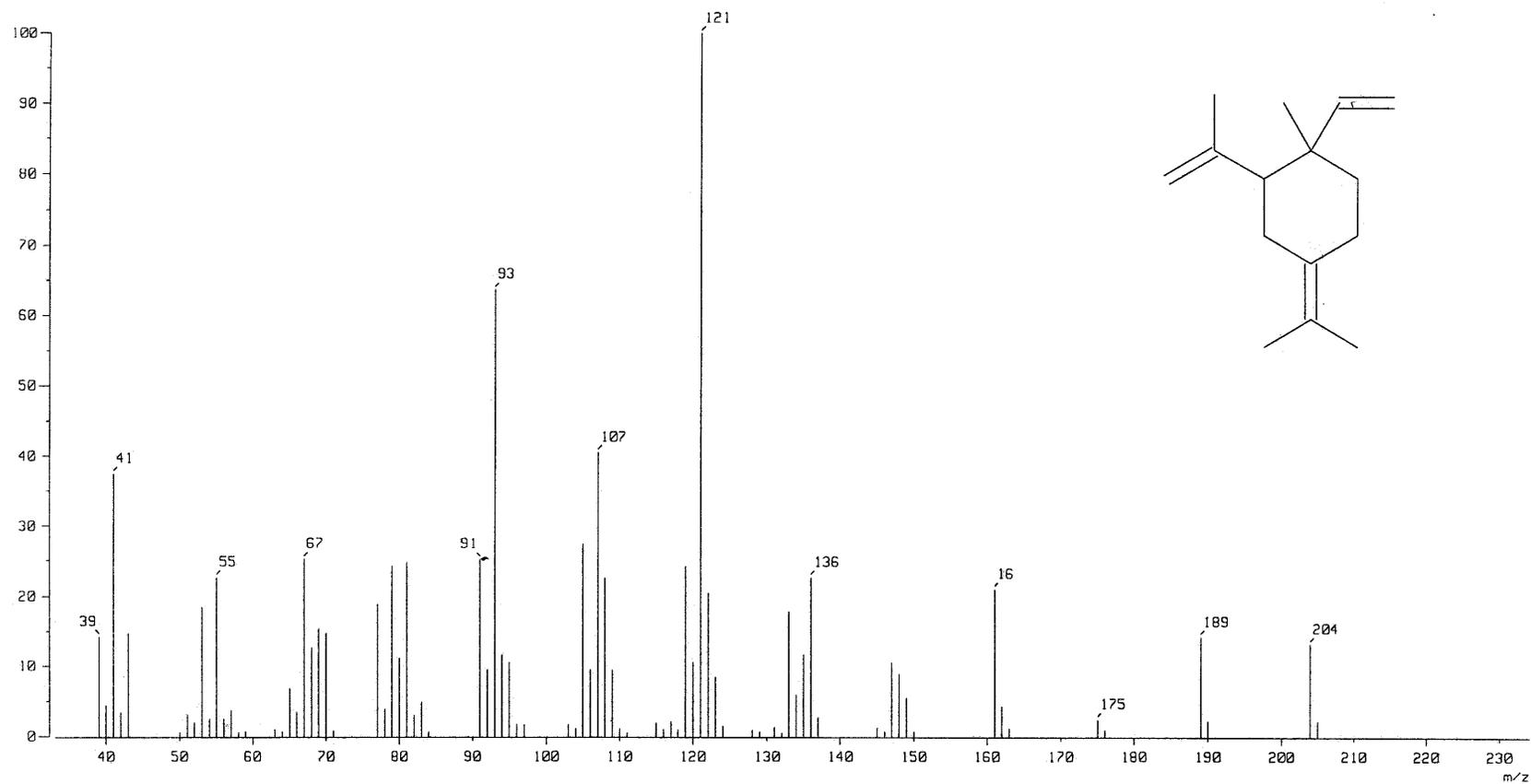


14 Y 16.- Isocarofileno

Nombre IUPAC = 4,11,11-trimetil-8-metileno, biciclo 7.2.0-undec-4-eno

Formula = $C_{15}H_{24}$

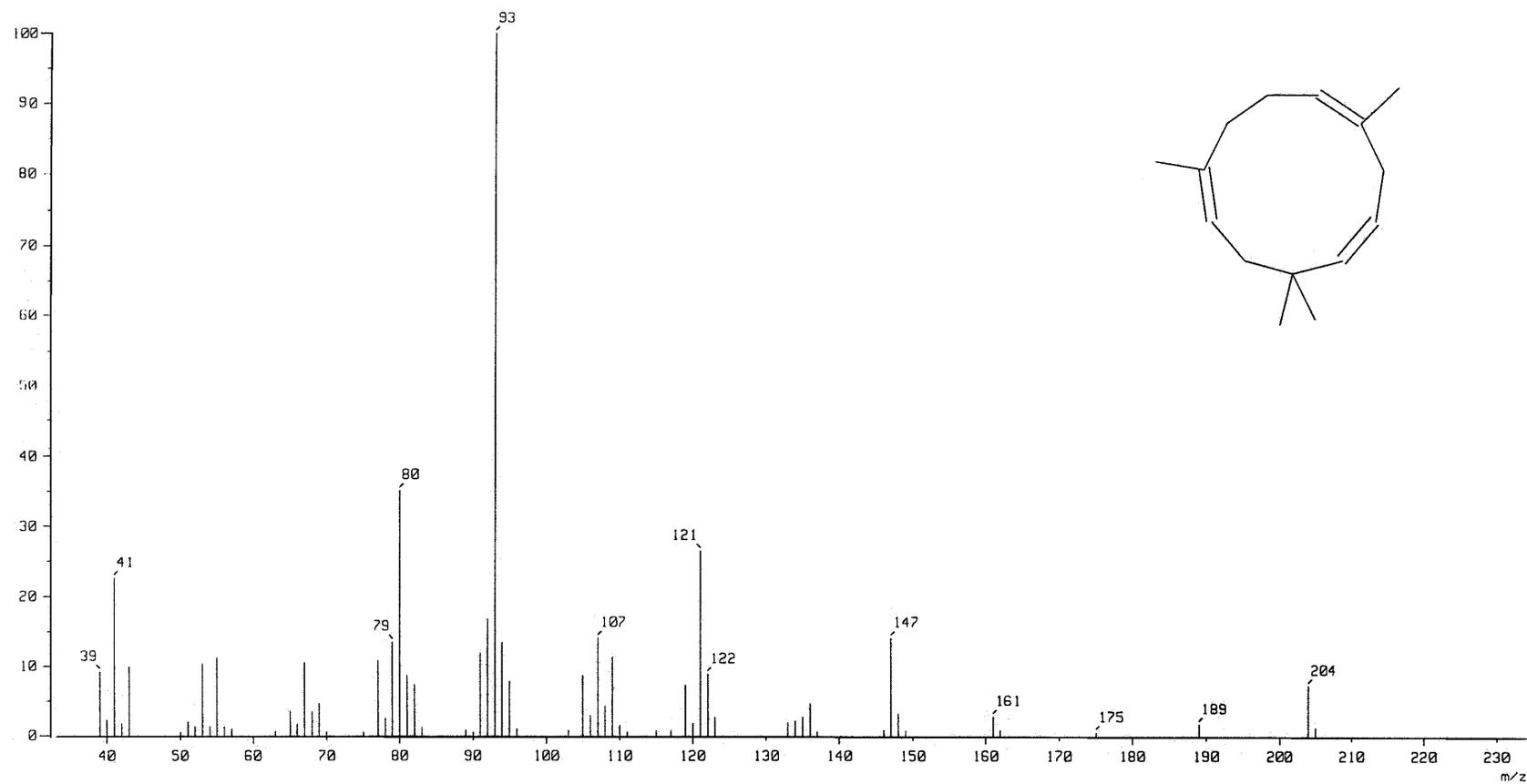
Proporción obtenida = 11.82%



15.- Nombre IUPAC = 1-etenil-1-metil-2-(1-metiletenil)-4-(1-metiletil) Ciclohexano

Formula = $C_{15}H_{24}$

Proporción obtenida = 4.51%

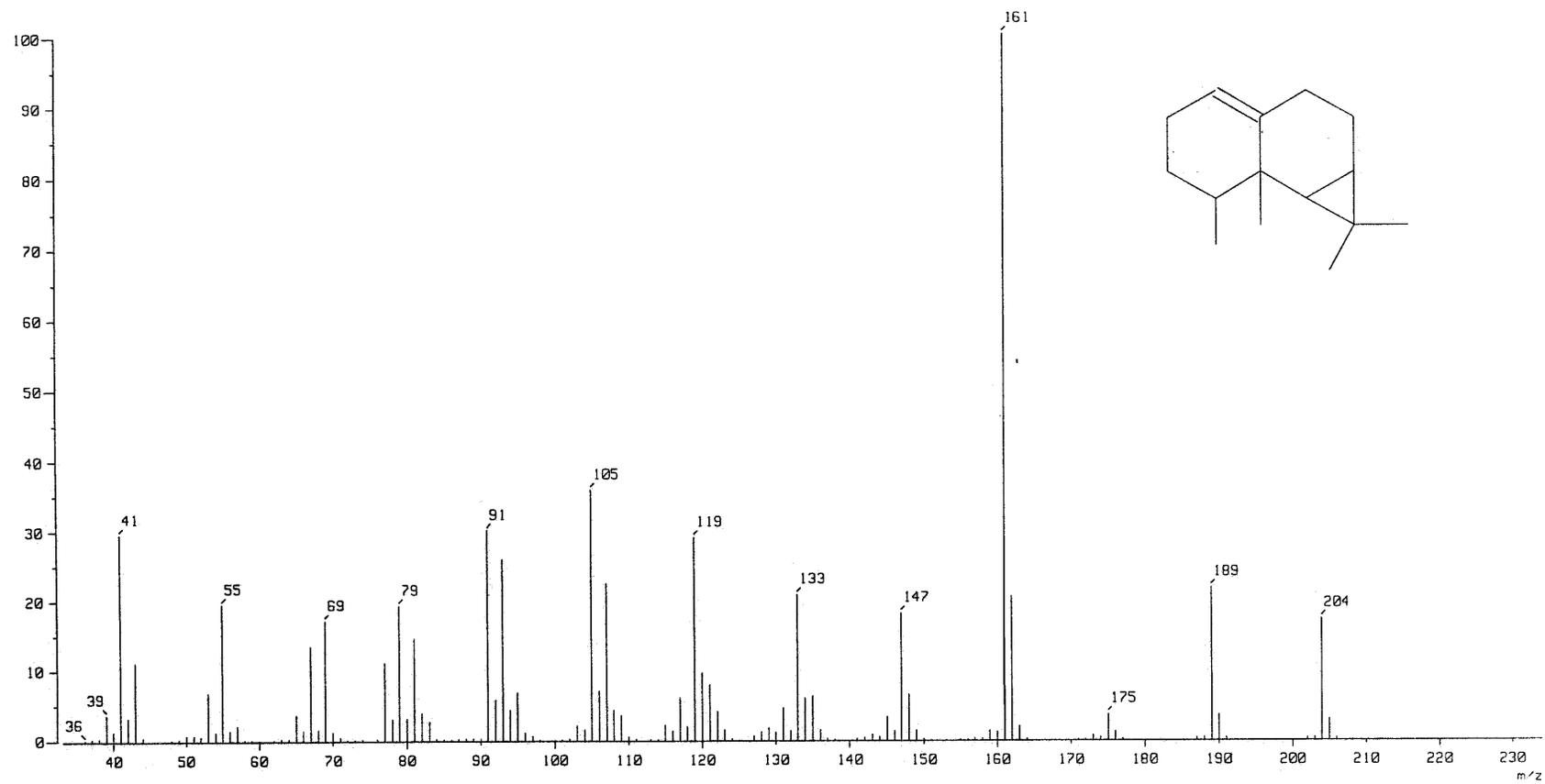


17.- Humuleno

Nombre IUPAC = 2,6,6,9-tetrametil-(E,E,E) 1,4,8-cicloundecatrieno

Formula = $C_{15}H_{24}$

Proporción obtenida = 3.78%

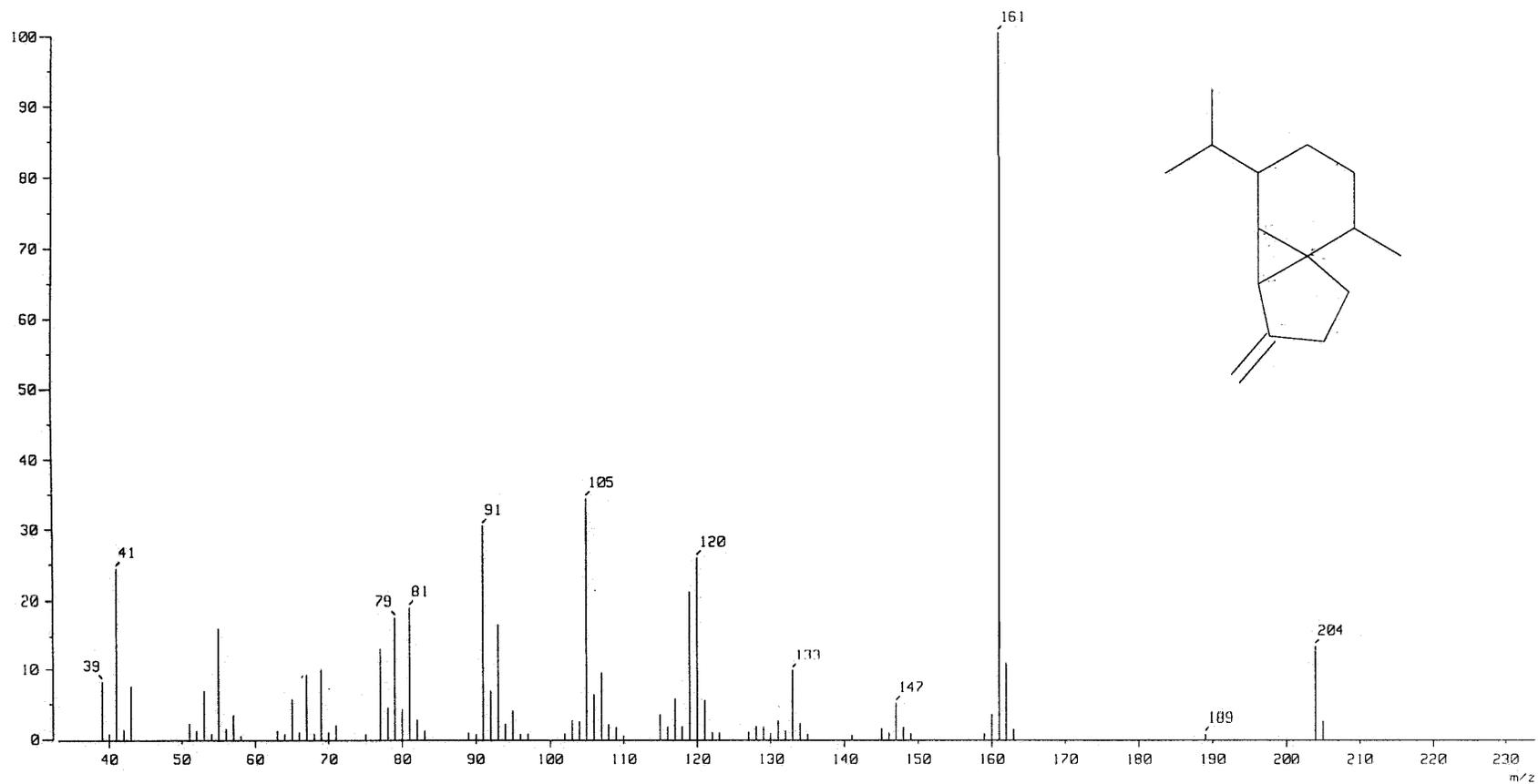


18.- Aristol 1(10) eno

Nombre IUPAC = 1a,2,3,5,6,7,7a,7b-octahidro-1,1,7,7a-tetrametil, 1H-ciclopro(a)naftaleno

Formula = $C_{15}H_{24}$

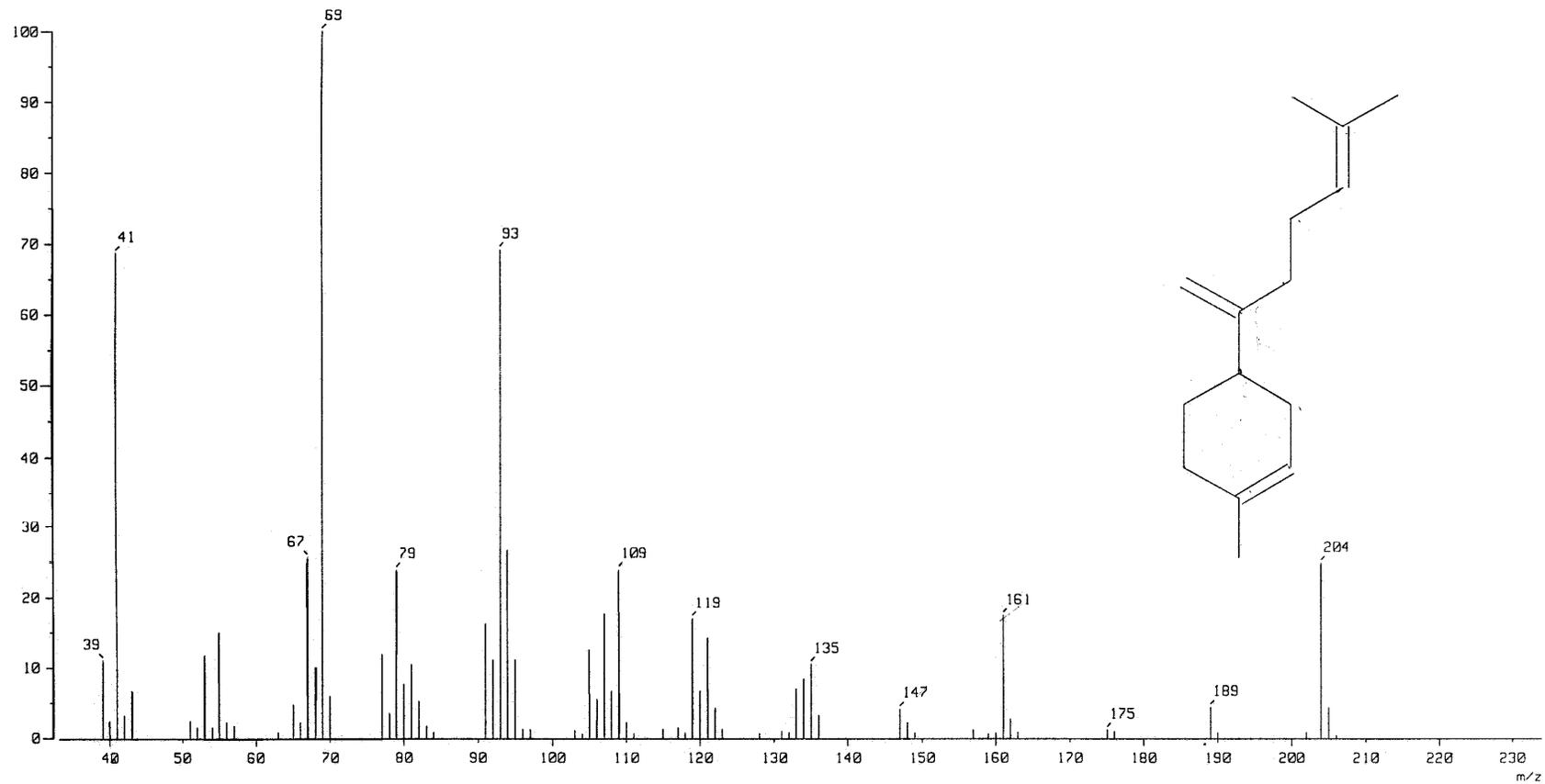
Proporción obtenida = 0.65%



20.- Nombre IUPAC= 1H-ciclopenta 1,3 ciclopropano octahidro-7-metil -3-metilen, 1,2 benceno.

Formula = C₁₅H₂₄

Proporción obtenida = 4.07%

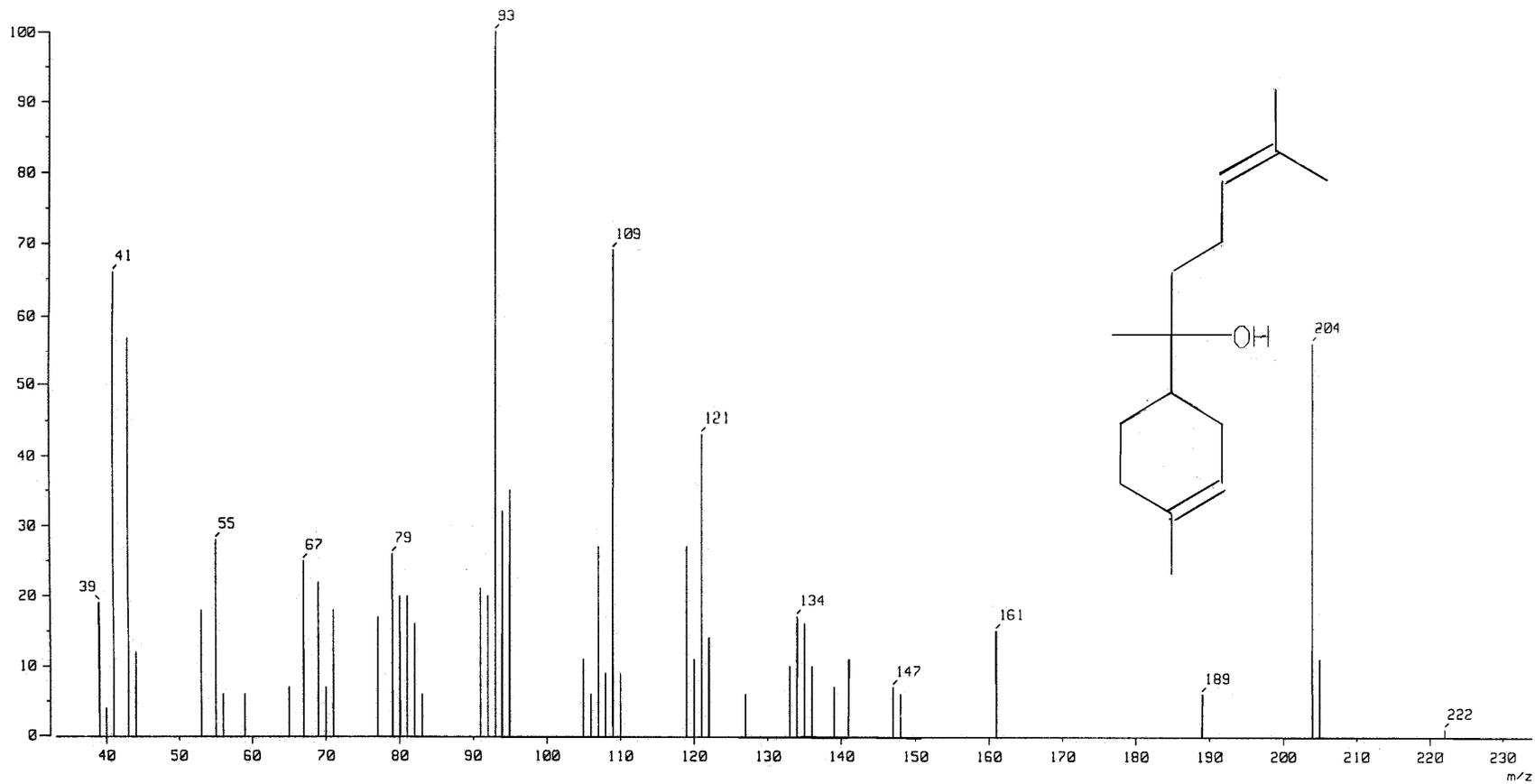


21.- β -bisaboleno

Nombre IUPAC = 1-metil-4-(5-metil-1-metilen-4-hexenil) ciclohexeno

Formula = $C_{15}H_{24}$

Proporci3n obtenida = 5.68%

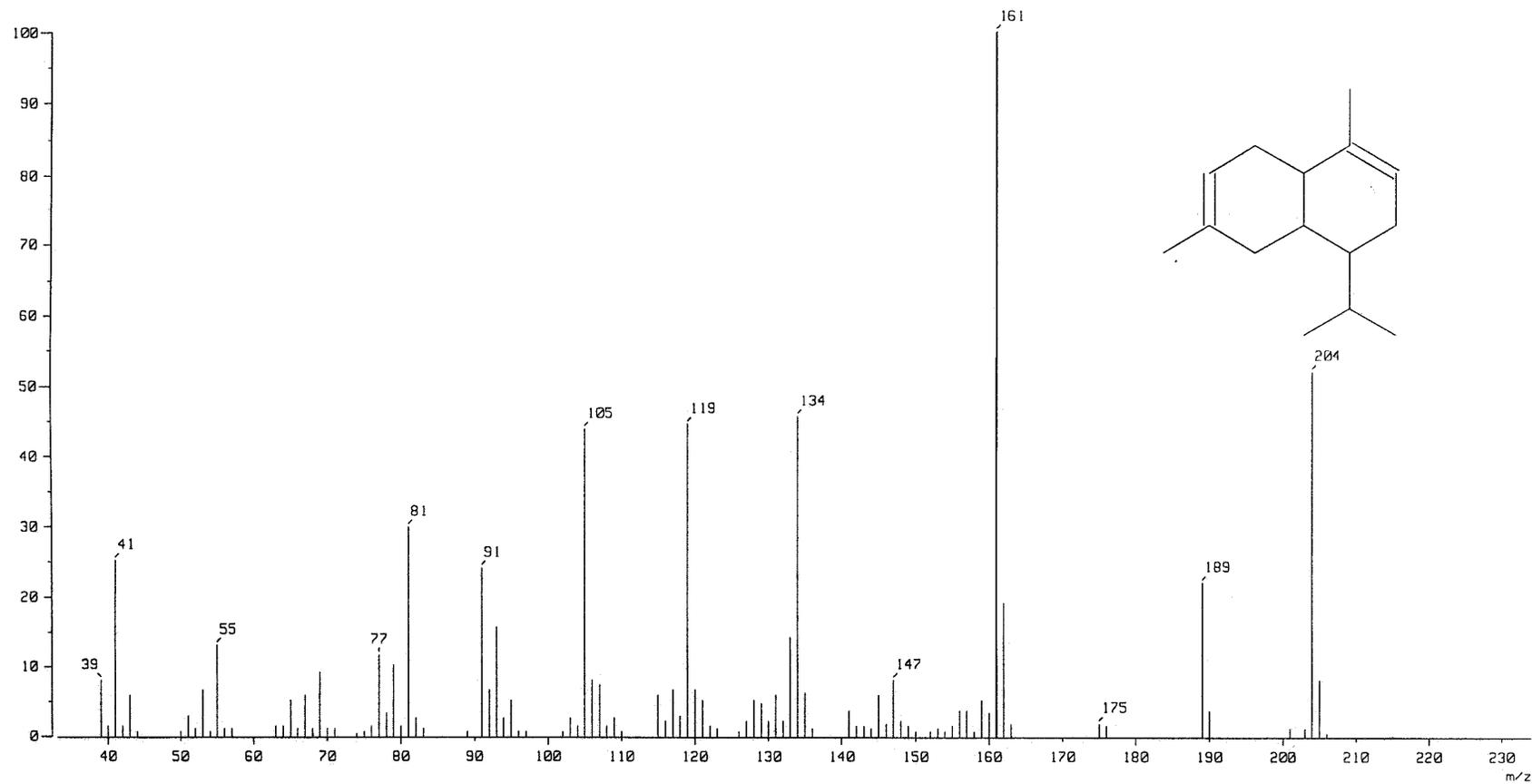


22 Y 27.- α -bisabolol

Nombre IUPAC = 6-metil-2-(4-metil-ciclohex-3-enil)-hept-5-en-2-ol

Formula = $C_{15}H_{26}O$

Proporci3n obtenida = 11.23%

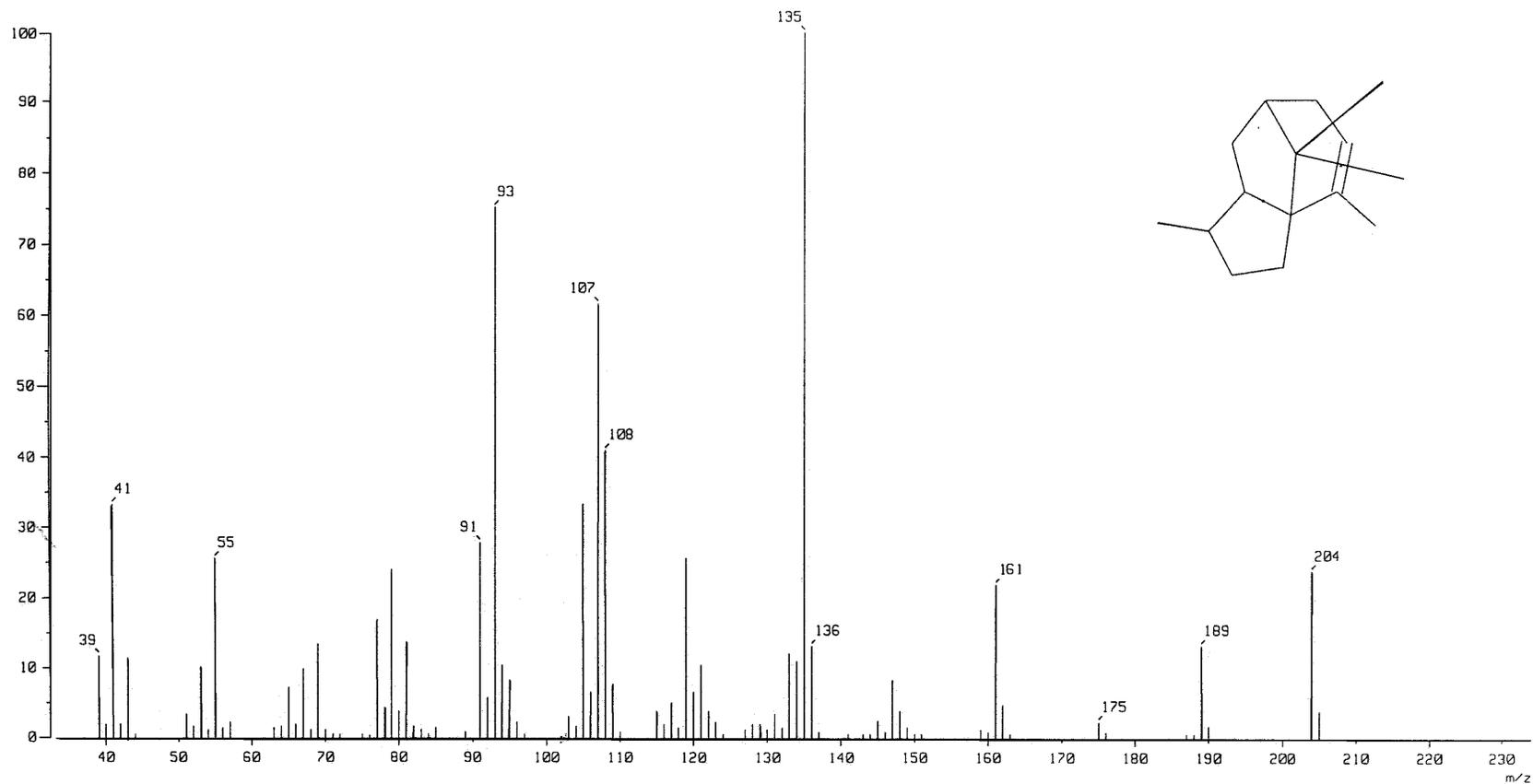


23.- β -cadineno

Nombre IUPAC = 1,2,4a,5,8,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil) naftaleno

Formula = $C_{15}H_{24}$

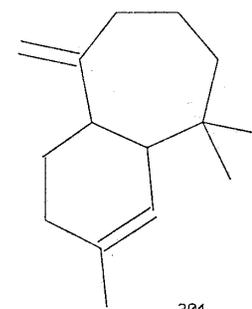
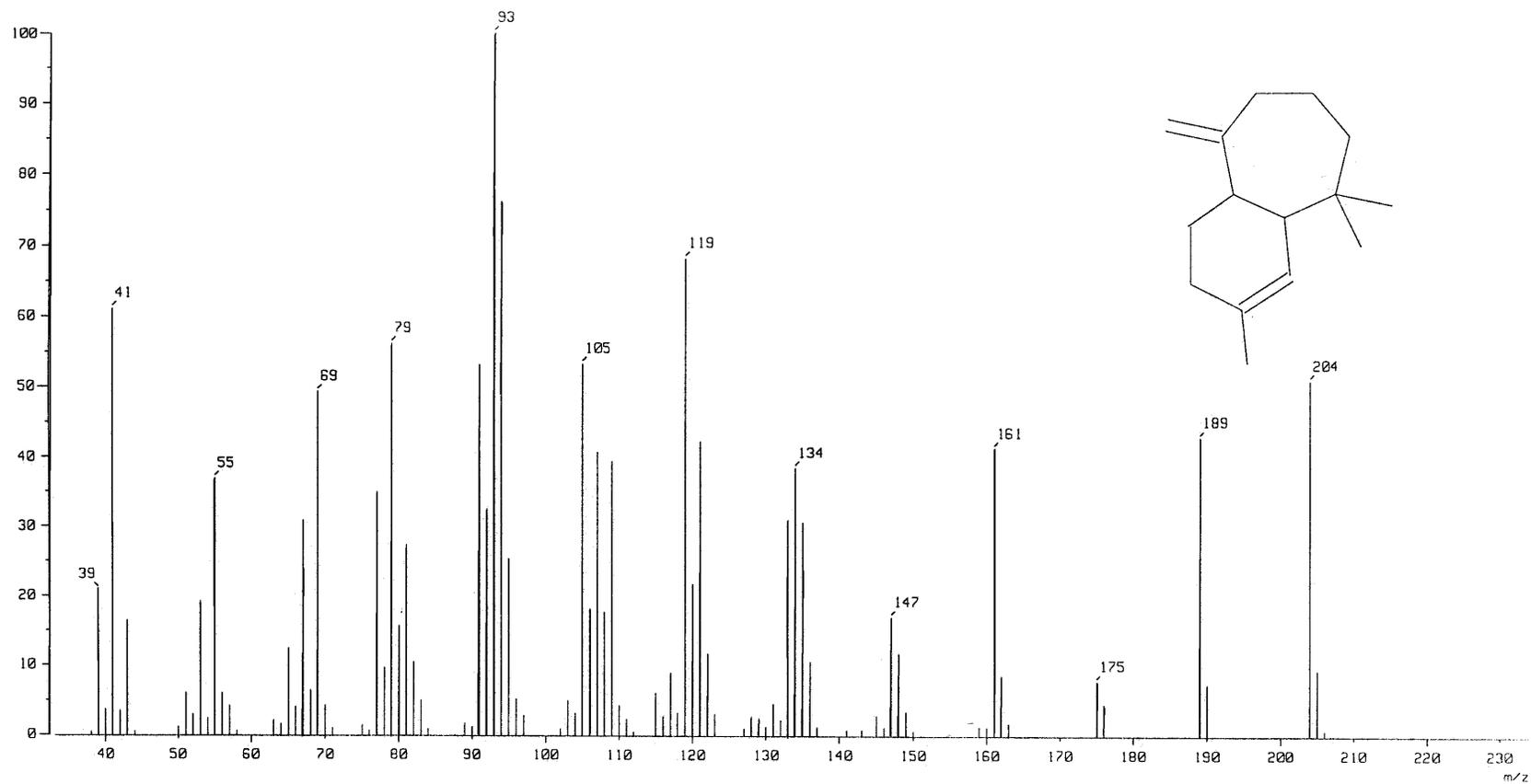
Proporción obtenida = 2.77%



24.- Nombre IUPAC = hexahidro-1,4,9,9-tetrametil,1H-3a,7-metanoazuleno.

Formula = $C_{15}H_{24}$

Proporción obtenida = 4.55%

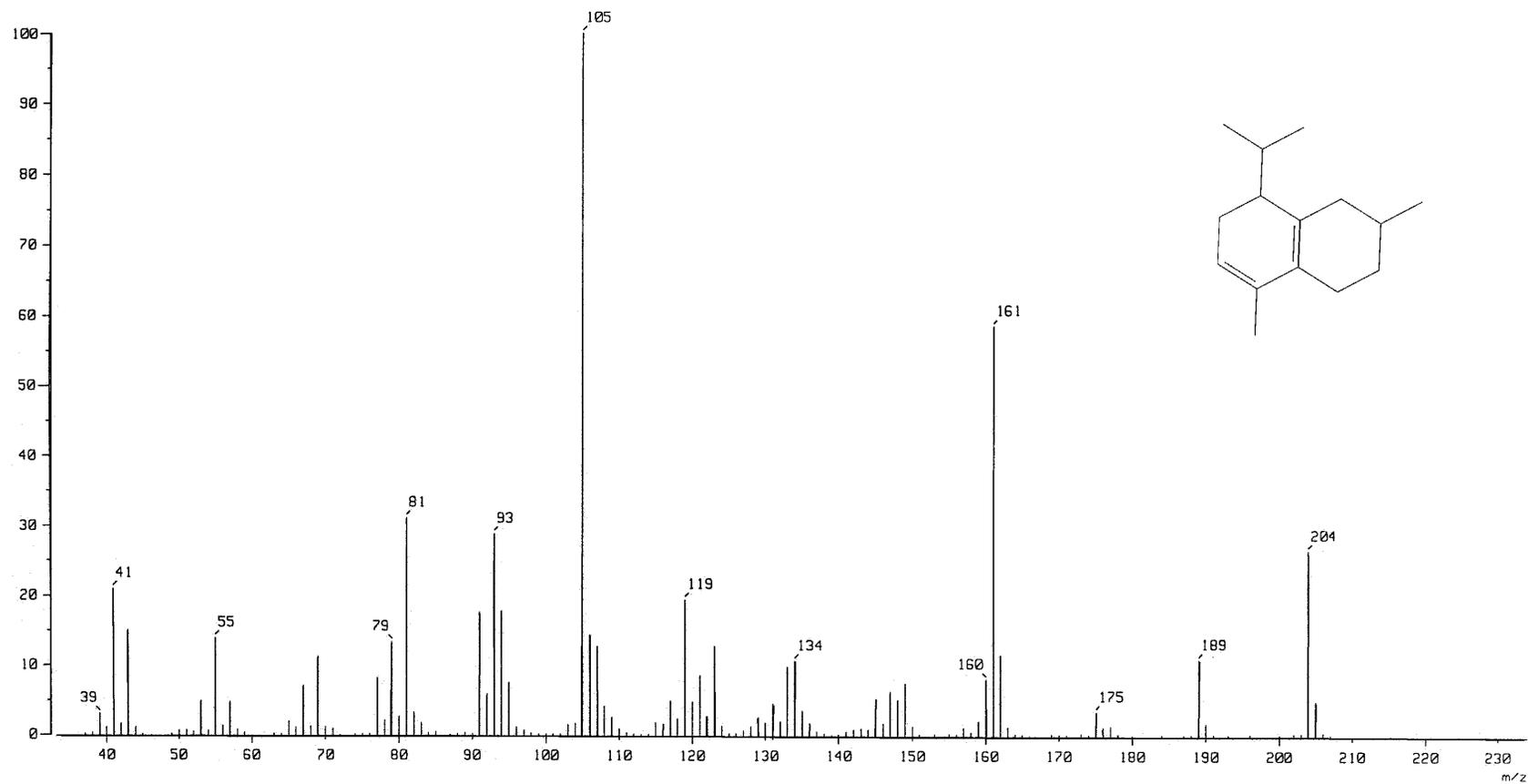


25.- Himachaleno

Nombre IUPAC = 2,4a,5,6,7,8,9,9a-octahidro-3,5,5- trimetil-9, 1H-benzociclohepteno

Formula = C₁₅H₂₂

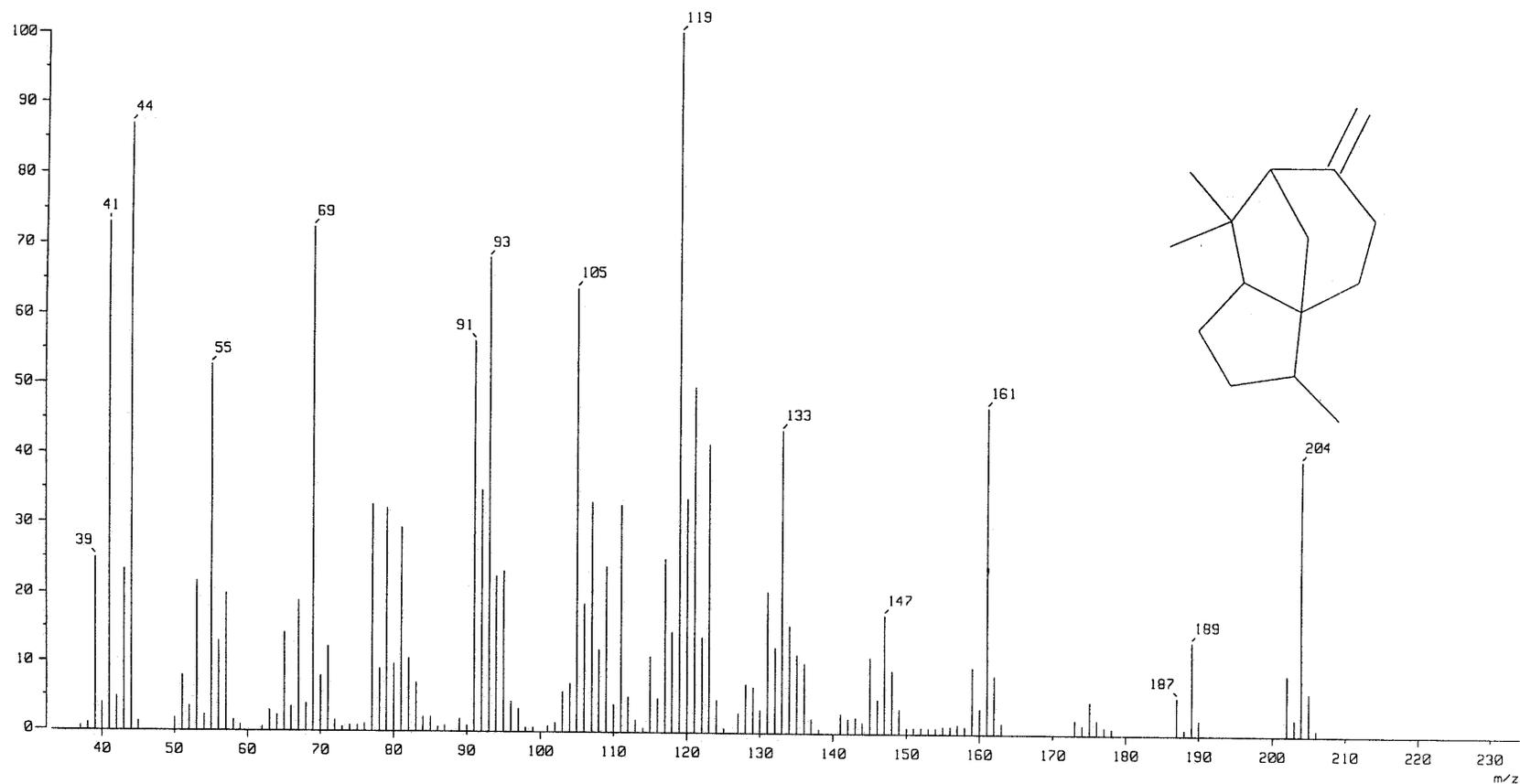
Proporción obtenida = 1.17%



26.- Nombre IUPAC= 1,2,4a,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil), Naftaleno.

Formula = $C_{15}H_{24}$

Proporción obtenida = 0.46%



28.- Cedreno

Nombre IUPAC = octahidro-3,8,8-trimetil-6-metileno, 1H-3a,7-metanoazuleno

Formula = C₁₅H₂₄

Proporción obtenida = 0.43%

REFERENCIAS.

- Abeygunawardena, C., Kumar, V., Marshall, D. S., Thomson, R. H., Wickramaratne, D.B. M. 1991. Furanonaphtoquinones from two *Lantana* species. *Phytochemistry* 30(3): 941-945.
- Agelopoulos, N. G., Chamberlain, K., Pickett, J. A. 2000. Factors affecting volatile emissions of intact potato plants, *Solanum tuberosum*. *Journal of Chemical Ecology*. 26(2):497-511.
- Aguilar, A. J., Camacho, R. 1985. Uso popular de las plantas medicinales y su distribución por aparato y sistemas. Archivos de investigación médica. México. Suplemento, Vol. 6. pp:13-14.
- Aguilar, A. J., Camacho, R., Chino, S., Jáquez, P., López, M. E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS. México.
- Argueta, V. A., Cano, A L. M., Rodarte, M.E. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana II. Instituto nacional Indigenista. México.
- Atlas, R. M., Bartha, R. 1998. Microbial ecology. Fundamentals y aplicaciones. Addison Wesley Longman, Inc. U.S.A. pp:116-119.
- Avila, A. J. G. 1996. Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional Purepecha. Tesis Maestría (Maestría en Microbiología). FES-Cuatitlán UNAM. México.
- Barre, J. T., Bowden, B. F., Coll, J. C., De Jesus, J., De la Fuente, V. E., Janairo, G. C., Ragasa, C. Y. 1997. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. *Phytochemistry* 45(2): 321-324.
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., Croteau, R. 1998. Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceeding National Academic Science USA*. 95:4126-4133.
- Boller, T. 1995. Chemoreception of microbial signal in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 46:189-214.
- Burt, S. A., Reinders, R. D. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 36:162-167

- Chapin, III F. S., Lambers, H., Pons, T. L. 1998. Plant Physiological ecology. Springer-Verlag New York Inc. U.S.A.
- Cobos, M. I., Rodriguez, J. L., Oliva, M. L., Demo, M., Faillaci, S. M., Zygadlo, J. A. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Baccharis notoserghila*. *Planta medica*. 67(1):84-6.
- Coley, P. D., Baron, J. A. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecological Systematic*. 27:305-35.
- Deena, M. J., Thoppil, J. E. 2000 Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana*. *Fitoterapia*, 71(4): 453-455.
- Deepak, M., Handa, S. S. 2000. Antiinflammatory activity and chemical composition of extracts of Verbena *Phytotherapy Research*, 14 (6): 463-465.
- Díaz, J.L. (Ed.) 1976. Usos de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas II. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales A.C. México.
- Domínguez, X. A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa S.A. de C.V. México D.F.
- Domínguez, X.A., Franco, R., Cano G., Garcia, F. M. C., Dominguez, X.A., De la Peña, S. L. 1983. Isolation of a new furano-1,4Naphthoquinone Diodantunezone from *Lantana achyranthifolia*. *Planta Medica* 49:63.
- Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Atti, D. A. C., Paroul, N., Wasum, R., Atti, S. L. 2003. Essential oil composition of south Brazilian populations of *Cunila galioides* and its relation with the geographic distribution. *Biochemical Systematics and Ecology* 31:467-475.
- Espinoza, S. A. J. 1985. Plantas medicinales de la Huasteca Hidalguense. Tesis. Lic. (Biólogo) UNAM, Facultad de Ciencias. México.
- Fahlén, A., Welander, M., Wennersten, R. 1997. Effects of lighth-Temperature regimes on plant growth and essential oil yield of selected aromatic plants. *Journal of Science Food Agriculture*. 73:11-119.
- Garcia, E. 1981. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen. CETENAL. México.
- Ghisalberti, E. L. 2000. *Lantana camara* L. (Verbenaceae). *Fitoterapia* 71: 467-486.

- Gomes, C. M. R., Roma, P. F. J., Felzenswalb, I. 1997. Evaluation of the mutagenic potential of monoterpenoid compounds. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Supplement 1. 379(1):S110-S111.
- Gutiérrez, A. I. 1989. Determinación del efecto antimicrobiano, in vitro, de las plantas de la subclase dicotiledónea, utilizadas popularmente contra la disentería (causada por *Shigella dysenteriae*, y *Shigella flexneri*). Tesis Lic. (Biólogo)UNAM ENEP Iztacala. México D.F.
- Harborne, 1988. Introduction to ecological biochemistry. 3ª Ed. London Academic. USA.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 46:3590-3595.
- Hernández, D. C. T., Canales, M. M., Avila, A. J. G., Duran, D. A., Caballero, N. J., Romo, D. A., Lira, S. R. 2003. Ethnobotany and antimicrobial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*. 88(2-3): 181-188.
- Hernández, M. M., Heraso, C., Villarreal, M. L., Vargas-Arispuro, I., Aranda, E. 1999. Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 67 (1): 37-44.
- INEGI. 1999. Anuario estadístico del Estado de Puebla. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México.
- Jakovlev, V., Isaac, O., Thiemer, K., Kunde, R. 1979. Pharmacological investigations with compounds of Chamomile. II. New investigations on the antiphlogistic effects of (-)- α -bisabolol and bisabolol oxides. *Planta Medica*. 35:125-140.
- Jeffery, G. H., Bassett, J., Mendham, J., Denney, R. C. 1989. Vogel's textbook of quantitative chemical analysis. Longman Scientific & Technical. Great Britain. pp:161-175.
- Juven, B. J., Kanner, J., Schved, F., Weisslowicz, H. 1994. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of Applied Bacteriology*. 76:626-631.

- Karaman, S., Digrak, M., Ravid, u., Ilcim, A. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oils of *Thymus revolutus* Celak from Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*. 76: 183-186.
- Kim, J., Marshall, M. R., Wei, C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 43:2839-2845.
- Koneman, W. E. 1985. Diagnostico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. México.
- Lee, L. S., Brooks, L.O., Homer, L.E., Rossetto, M., Henry, R.J., Baverstock, P.R. 2002. Geographic variation in the essential oils and morphology of natural populations of *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 30:343–360.
- Li, T. K., Liu, L. F. 2001. Tumor cell death induced by topoisomerase-targeting drugs. *Annual Review of Pharmacological Toxicology*. 41:53-77.
- Martín, G. J. 1990. Ethnobotany. A methods manual. Chapman & Hall. Gran Bretaña.
- Mazzanti, G., Battinelli, L., Salvatore, G. 1998. Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae) *Flavour and Fragrance Journal*. 13(5):289-294.
- Murphy, C. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4): 564-582.
- Nash, D., Nee, M. L. 1984. Flora de Veracruz. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bioticos. Xal. Ver. México.
- Ndiegea, I. O., Budenberga, W. J., Otieno, D. O., Hassanalia, A. 1996. 1,8-Cineole: an attractant for the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. *Phytochemistry* 42(2): 369-371.
- Ortiz, D. M. B. 1986. Aztec sources of some Mexican folk medicine en Folk medicine, the art and the science. American Chemical Society. Stainer R. P. Editor. U.S.A.
- Pascual, M. E., Slowing, K., Carretero, E., Sanchez, M. D., Villar, A. 2001. *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 76 (3): 201-214.

- Perry, P.J., Pavlidis, V. H., Hadfield, J. A. 1997. Synthesis of cytotoxic furonaphthoquinones: Regiospecific synthesis of diodantunezone and 2-ethylfunonaphthoquinones. *Tetrahedron*. 53(9): 3195-3204.
- Pichersky, E., Raguso, R. A., Lewinsohn, E., Croteau R. 1994. Floral scent production in *Clarkia* (Onagraceae). *Plant Physiology*.106:1533-1540
- Pratesa, H. T., Santos, J. P., Waquila, J. M., Fabrisa, J. D., Oliveira, A. B., Fosterc, J. E. 2003. Insecticidal activity of monoterpenes against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Stored Products Research*. 34(4):243-249.
- Ramos, A., Piloto, J., Visozo, A., García, A., Lastra, H., De León, H. P. 2000. Mutagenicity and antioxidant assessment of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl. *Phytotherapy Research*, 15(4): 360-363.
- Rani, S., Ahamed, N., Rajaram, S., Saluja, R., Thenmozhi, S., Murugesan, T. 1999. Anti-diarrhoeal evaluation of *Clerodendrum phlomidis* Linn. leaf extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 68(1-3):315-319.
- Rocha, A. I. F. 2002. Evaluación antibacteriana de algunas plantas medicinales usadas en la región de Zapotitlán de las Salinas Pue. Tesis Lic.(Biólogo). FESI-UNAM. México.
- Rzedowsky, J. 1988. Vegetación de México. Editorial Limusa. México.
- Sabillon, D., Cremades, L. V. 2001. Diurnal and seasonal variation of monoterpene emission rates for two typical Mediterranean species (*Pinus pinea* and *Quercus ilex*) from field measurements- relationship with temperature and PAR. *Atmospheric Environment* 35:4419-4431.
- Saleh, M., Kamel, A., Li, X., Swaray, J. 1999. Antibacterial triterpenoids isolated from *Lantana camara*. *Pharmaceutical Biology*, 37 (1): 63-66.
- Schapoal, E. E. S., Winter de Vargas, M. R., Chaves, C.G., Bridi, R., Zuanazzi, J. A., Henriques, A. T. 1998. Antiinflammatory and antinociceptive activities of extracts and isolated compounds from *Stachytarpheta cayennensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 60 (1): 53-59.
- Segura, H. M. G. 1996. La Familia Verbenaceae en el Estado de Nayarit. Tesis Lic. (Biólogo) UNAM, Facultad de Ciencias. México.

- Simmond, M. S. J., Grayer, R. J. 1999. Drug discovery and development. In: Walton N. J., D. E. Brown. Chemicals from plants perspectives on plant secondary products. Imperial College Pres. World Cientific Publishing Co. Singapore.
- Stepp, J. R., Moerman, D. E. 2001. The importance of weeds in ethnopharmacology. *Journal of ethnopharmacology*. 75:19-23.
- Texas A&M University. 2002. Texas Vascular plant checklist: Verbenaceae. http://www.csdl.tamu.edu/flora/ftc/dft/ftc_vrb.htm.
- Tang, H. Q., Hu, J., Yang, L., Tan, R. X. 2000. Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species. *Planta Medica*. 66:391-393.
- Tascon, M. R. 1997. Contribución al estudio de la flora medicinal de San Nicolás Totolapan, delegación Magdalena Contreras. Tesis Lic. (Biólogo). ENEPI, UNAM. México.
- Tenorio, L. 1997. Estudio florístico de la Cuenca de río Hondo, Puebla-Oaxaca, México. Tesis Lic. (Biólogo). ENEPI, UNAM. México.
- Torrado, S., Agis, A., Jimenez, M. E., Cadorniga, R. 1995. Effect of dissolution profile and (-)-alpha-bisabolol on the gastrotoxicity of acetylsalicylic acid. *Die Pharmazie*. 50(2):141-143.
- Torres, Z. M.M. 1991. Estudio florístico de la Sierra de Sultepec, Estado de México. Tesis Lic. (Biólogo), ENEPI, UNAM. México.
- Trease, G.E., Evans, W.C. 1991. Tratado de Farmacognosia, 13° ed, Ed. Interamericana. Mc Graw-Hill. México.
- Ünlü, M., Daferera, D., Dönmez, E., Polissiou, M., Tepe. B., Sokmen, A. 2002. Compositions and the in vitro antimicrobial activities of the essential oils of *Achillea setacea* and *Achillea teretifolia* (Compositae). *Journal of Ethnopharmacology* 83: 117-121.
- Van der Berghe, D. A., Vlietink, A. J. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. In: Hostettmann, K.(Ed) Methods in plant biochemistry. Vol. 6 Assay for bioactivity.
- Villegas, L. F., Marcalo, A., Martin, J., Fernandez, I. D., Maldonado, H., Vaisberg, A. J., Hammond, G. B. 2001. (+)-epi-Alpha-bisabolol is the wound-healing principle

of *Peperomia galioides*: investigation of the in vivo wound-healing activity of related terpenoids. *Journal of Natural Products*, 64(10):1357-9.

Vitousek, P. M., Turner, D. R. 1994. Litter decomposition on the Mauna loa environmental matrix, Hawwai, I: Patterns, mechanisms and models. *Ecology* 75(2):418-429.