



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA



“Actividad antibacteriana de *Viguiera dentata* (Cav.) Sprenguel. “Chimalacate.”

TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

ISELA CLAUDIA GIJON IBARRA

DIRECTORA Y ASESORA:

M. en C. Margarita Canales Martínez

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección de la M. en C. Margarita Canales Martínez a quien agradezco la conducción de esta investigación.

A los profesores del laboratorio de Fitoquímica: Dr. Guillermo Avila Acevedo, M. en C. Claudia Tzásna Hernández, M. en C. Ana María García Bores, José Luis Muñoz López, Andrés y Gabriel Martínez Cortés y al Psicólogo Rodolfo, a quienes les doy las gracias por guiarme, compartir sus conocimientos, experiencias y sobre todo por la confianza que me brindaron en el transcurso de la realización de este trabajo.

Agradezco al profesor César Flores Mateos por ayudarme en la parte de elucidación y estructuración del compuesto y al profesor Ángel Durán por los apoyarme en la parte estadística.

A mis sinodales:

Dr. Rafael Lira Saade

Dr. Guillermo Avila Acevedo

M. en C. Claudia Tzásna Hernández Delgado

Biol. Ma. Edith López Villafranco

por los comentarios y sugerencias en la revisión de la tesis

A mis compañeros del laboratorio de Fitoquímica: Roberto Gracilazo Tovar, Dora Fanny Roldán, Rocío Serrano, Rocío Rosas.

Quiero agradecer de una manera muy especial a las maestras: Claudia Tzásna Hernández Delgado, Margarita Canales Martínez y Ana María García Bores, quienes en el transcurso de la parte experimental, se portaron más que profesoras como unas amigas, pues compartieron conmigo experiencias,

errores, conocimientos, pero sobre todo me brindaron su confianza y me alentaron en la realización de este trabajo.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron a mi formación personal y profesional.

A Ricardo Álvarez Espino que me apoya incondicionalmente y me da aliento cada vez que tengo etapas difíciles en la vida y no me deja nunca caer, por ser el rayo de luz de cada día.

A Enrique Juárez de León por compartir y ayudarme a realizar uno de mis sueños.

A Nancy Nolasco Alonso a la cual considero una gran persona y una buena amiga.

A Javier Díaz Mejía que es una persona que me inspira a la superación además de ser mí mejor amigo.

A mi amiga I. Anel Rivas Lorenzo que estuvo conmigo durante la carrera y a los chuperamigos (a todos).

A mis hermanos: Miguel, Marisol, Brenda y Ricardo.

A mi Papá

Pero sobre todo:

A mi Mamá que me ha apoyado desde siempre y espero que se sienta orgullosa de mí.

Este trabajo fue financiado por CONACYT proyecto No. 40038G35.450.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	i
.....
Índice de tablas	III
.....
Índice de figuras	V
.....
Abreviaturas	VI
.....
Resumen	1
.....
Introducción	2
.....
Justificación	7
.....
Objetivos Generales	8
.....
Objetivos Particulares	8
.....
Antecedentes	9
.....
La Familia Asteraceae y los Metabolitos secundarios de origen vegetal con actividad antibacteriana	9
.....
Los terpenos	12
.....
Aceites esenciales	15
.....
Mecanismos de acción de los terpenos	16
.....
Antecedentes del género <i>Viguiera</i>	19
.....
Descripción de la planta <i>Viguiera dentata</i>	22
.....

Área de estudio	27
Metodología	30
Resultados y análisis	35
Discusión	62
Conclusión	77
Recomendaciones	78
Referencias	79
Apéndice 1 Preparaciones comunes de las plantas Medicinales.	92
Apéndice 2 Obtención de los aceites esenciales (arrastre de vapor)	95
Apéndice 3 Cuantificación de sólidos.	96
Apéndice 4 Obtención de los extractos herbales por percolación	96
Apéndice 5 Método de difusión en Agar de Kirby- Baüer.	97
Apéndice 6 Aislamiento de los principios activos	100
Apéndice 7 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM).	103

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metabolitos secundarios del genero <i>Viguiera</i>	20
Tabla 2. Simbología de las cepas utilizadas para evaluar la actividad antibacteriana de <i>V. dentata</i>	32
Tabla 3. Generalidades de la planta	34
Tabla 4. Datos etnobotánicos de la planta <i>V. dentata</i> en la zona de San Rafael Coxcatlán, Puebla.	34
Tabla 5. Datos etnobotánicos de la planta <i>V. dentata</i> del Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana III.	34
Tabla 6. Rendimientos obtenidos de los aceites esenciales, del extracto acuoso y de los extractos de diferente polaridad de las partes aéreas de <i>V. dentata</i>	35
Tabla 7. Actividad antibacteriana de <i>V. dentata</i>	36
Tabla 8. Análisis de varianza de 2 factores	37
Tabla 9. Prueba de Tukey	37
Tabla 10. Rendimientos obtenidos de los diferentes extractos de <i>V. dentata</i>	38
Tabla 11. Actividad antibacteriana de los extractos de las diferentes partes (hoja, tallo y flor) de <i>V. dentata</i>	39
Tabla 12. Análisis de varianza	40
Tabla 13. Prueba de Tukey	41
Tabla 14. Actividad antibacteriana de la particiones del extracto hexánico de tallo	43

Tabla 15. Análisis de varianza bifactorial de la partición del extracto hexánico de tallo	44
Tabla 16. Fracciones obtenidas por cromatografía de columna de la partición hexánica de la planta <i>V. dentata</i>	45
Tabla 17. Evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna de la partición hexánica de la planta <i>V. dentata</i>	46
Tabla 18. Parámetros de la fracción activa pura	47
Tabla 19. Grupos funcionales asignables a las bandas de absorción del espectro de infrarrojo del compuesto responsable de la actividad antibacteriana.	48
Tabla 20. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN ¹ H del compuesto activo puro de <i>V. dentata</i>	52
Tabla 21. Asignación de los desplazamientos químicos obtenidos del RMN ¹³ C del compuesto aislado de <i>V. dentata</i>	56
Tabla 22. Comparación del ¹³ C-NMR del compuesto aislado de <i>V. dentata</i>	57
Tabla 23. Comparación de las señales obtenidas del espectro de masas del compuesto aislado de <i>V. dentata</i> con los picos principales del espectro de masas del ácido Kaurenico.	58
Tabla 24. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima del compuesto activo puro.	61
Tabla 25. Rendimiento del ácido kaurenico en algunas especies del género <i>Viguiera</i>	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Origen biosintético de los principales grupos de compuestos secundarios destacando a los terpenoides hasta sesquiterpenos.	14
Figura 2. <i>Viguiera dentata</i> (Cav.) Sprenguel. "Chimalacate".	12
Figura 3. Distribución geográfica del género <i>Viguiera</i>	27
Figura 4. Localización geográfica de San Rafael Coxcatlán, Puebla.	30
Figura 5. Actividad antibacteriana de <i>V. dentata</i>	39
Figura 6. Actividad antibacteriana de los diferentes extractos de <i>V. dentata</i>	42
Figura 7. Espectro de absorción de UV del compuesto aislado de <i>V. dentata</i>	47
Figura 8. Espectro de infrarrojo del compuesto aislado de <i>V. dentata</i>	48
Figura 9. Espectro de RMN ¹ H del compuesto aislado de <i>V. dentata</i>	49
Figura 10. Espectro de resonancia magnética nuclear de Carbono 13 del compuesto aislado de <i>V. dentata</i>	52
Figura 11. Espectro de masas del compuesto con actividad antibacteriana aislado de <i>V. dentata</i>	51
Figura 12. Estructura propuesta del compuesto aislado de <i>Viguiera dentata</i> (Cav.) Sprenguel responsable de la actividad antibacteriana.	57
Diagrama 1. Particiones del extracto hexánico de tallo	43

ABREVIATURAS

AcOET	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AK	Ácido kaurenoico
B.s	<i>Bacillus subtilis</i>
CCF	Cromatografías en Capa Fina
CBM	Concentración Bactericida Mínima
°C	Grados Celsius
E.ae.	<i>Enterobacter aerogenes</i>
E.ag.	<i>Enterobacter agglomerans</i>
E.c.	<i>Escherichia coli</i>
g	Gramos
IR	Infrarrojo
INDRE	Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MeOH	Metanol
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
µg	Microgramos
µg/ml	Microgramos por mililitros
mg	Miligramos
ml	Mililitros
nm	Nanómetro
%	Por ciento
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica

S.a.	<i>Staphylococcus aureus</i>
S.b.	<i>Shigella boydii</i>
S.e.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
S.l.	<i>Sarcina lutea</i>
S.t.	<i>Salmonella typhi</i>
SQLs	Lactonas sesquiterpénica
SW	Sur oeste
UV	Ultravioleta Visible
RNA	Ácido ribonucleico
V.ch.Tor.	<i>Vibrio cholerae</i> Tor CDC V 23
V.ch.C.C.	<i>Vibrio cholerae</i> aislada de un caso clínico
V.ch. agua	<i>Vibrio cholerae</i> INDRE 206 aislado de agua contaminada
V.ch.No. 01	<i>Vibrio cholerae</i> No.01
Y.e.	<i>Yersinia enterocolitica</i>

RESUMEN

El presente trabajo está basado en un estudio etnobotánico (Rosas, 2002) y fitoquímico preliminar (Rocha, 2003) en los cuales se mencionó el uso de la planta *Viguiera dentata* (chimalacate) en San Rafael Coxcatlán para aliviar las erupciones producidas por el uso del pañal y la reportan con actividad antibacteriana. Lo anterior plantea la necesidad de realizar estudios que permitan comprobar dicha información y ver a esta planta no como una especie que se tenga que controlar (puesto que es una maleza) sino como un recurso con potencial que se puede explotar. Por lo tanto se evaluó la actividad antibacteriana de *Viguiera dentata* (Cav.) Sprenguel y se aisló el compuesto responsable de dicha actividad. La planta se colectó durante los meses de noviembre y diciembre en la zona de San Rafael Coxcatlán que pertenece al Valle de Tehuacán-Cuicatlán, se determinó la actividad antibacteriana (método de Kirby Baüer) de los aceites esenciales, del extracto acuoso y de los extractos obtenidos con solventes de diferentes polaridades (hexánico, acetato de etilo y metanólico) extraídos de la parte aérea de la planta (tallos, hojas y flores), se ensayaron frente a 14 cepas de bacterias (Gram positivas y Gram negativas). El extracto hexánico de tallo presentó mayor actividad antibacteriana. Se aisló el compuesto responsable de la actividad antibacteriana, mediante técnicas cromatográficas; la elucidación de la estructura química se realizó mediante el análisis de los espectros de: UV, IR, RMN¹H, RMN¹³C y espectrometría de masas. Concluyendo que uno de los metabolitos responsables de la actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas es el diterpeno ácido ent-Kaur-16-en-19-oico (ácido kaurenoico).

INTRODUCCIÓN

El hombre ha encontrado empíricamente en la flora, los medicamentos contra las enfermedades de nuestra especie (Kumate, 1993).

México es un país de gran diversidad florística, su población a través del tiempo y de un largo proceso de aprendizaje, ha sabido apropiarse de los recursos naturales para su beneficio y por la utilidad que les proporciona, así se encuentran plantas que se usan para diversos fines, tanto de orden alimenticio como forrajero o medicinal, además forman parte importante de los recursos terapéuticos que emplea la medicina tradicional popular mexicana y han representado desde siempre una alternativa a otro tipo de recursos para la salud (Aguilar y Camacho, 1985).

Las plantas curativas son usadas prácticamente en todo el territorio nacional (60 %), de esas plantas un 40% son utilizadas para combatir afecciones de la piel y traumatismo y un 60% para padecimientos infecciosos de los aparatos digestivos y respiratorios, dentro de estas el primer lugar lo ocupan las enfermedades gastrointestinales, seguida de signos y síntomas, aparato reproductor femenino, traumatismo, síndrome de filiación cultural, aparato urinario, sistema músculo-esquelético, aparato circulatorio y sistema nervioso (Aguilar *et al.*, 1994). Con la diversidad biológica como base de origen de las moléculas con acción terapéutica es natural la gran variedad de plantas medicinales encontradas en la nación (Kumate, 1993).

En México se tiene la información de que algunas comunidades de nuestro país, emplean infusiones para el tratamiento de algunos padecimientos digestivos como diarrea, dolor de estómago, cólicos e inflamación intestinal (Aguilar y Camacho, 1985); además, se sabe que gran cantidad de plantas presentan actividades farmacológicas, y que nuestro pueblo las ha utilizado desde épocas precortesianas en formas de jarabes, infusiones, ungüentos, cataplasma entre otras (Sepúlveda, 1988 en Rubio, 1996). También se prescriben la preparación de extractos herbales, considerando la medicina

tradicional como alternativa para el descubrimiento de nuevas drogas con propiedades antimicrobianas (Hamburger y Hostettman, 1991).

Las plantas medicinales pueden contener principios activos, los cuales administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades del hombre y de los animales en general (Argueta *et al.*, 1994). La Fitoquímica o química botánica, se ha desarrollado como una disciplina independiente que relaciona la química orgánica de los productos naturales y la bioquímica de la planta. Es la encargada del estudio de esas sustancias activas, de la estructura química de esos compuestos, de su distribución en la planta, de la preparación del remedio vegetal y de su posterior almacenamiento, su biosíntesis, metabolismo, y su función biológica (Harbone, 1993).

Los principios activos de las plantas pueden ser sustancias simples (como alcaloides) o bien mezclas complejas (resinas, aceites esenciales, etc.) Los compuestos más comunes son los azúcares y heterósidos (azúcar más un compuesto sin azúcar), que pueden ser glucósidos, galactósidos, etc. Otros componentes activos de las plantas son lípidos, gomas, mucílagos, principios amargos, taninos, aceites esenciales, resinas, bálsamos, oleorresinas, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas (Trease-Evans, 1991).

Los productos del metabolismo vegetal se dividen en dos tipos: productos del metabolismo primario (sacáridos principalmente) que son sustancias formadas en todas las plantas verdes por fotosíntesis y el segundo tipo por metabolitos secundarios; es decir resultantes de procesos originados principalmente por la asimilación del nitrógeno. Estos productos parecen a veces inútiles para la planta, pero para el hombre sus efectos terapéuticos son por el contrario destacables (Trease-Evans, *op cit*). Estos metabolitos secundarios son considerados como productos naturales (Gros *et al.*, 1985).

Muchos medicamentos de origen vegetal fueron usados por el hombre, aunque por ser variable el contenido del principio activo era difícil su dosificación, hasta que Lavoisier elaboró un método para analizar los

compuestos orgánicos en cuanto a su contenido de carbono, hidrógeno y algunos otros elementos como nitrógeno. En 1828 el químico Friedrich Wohler, demostró que la síntesis de compuestos orgánicos era posible de llevar a cabo por el ser humano, quien solo requería de habilidad y conocimiento. Los químicos fueron adquiriendo cada día más habilidad en el aislamiento, purificación y determinación estructural de productos naturales (Romo de Vivar, 1982).

El interés por las plantas medicinales, ha resurgido una vez más en el ámbito de la ciencia y de la economía. Es frecuente en la literatura científica la inclusión de especies vegetales como uno de los recursos importantes a considerar en la búsqueda de nuevos medicamentos. A partir de la segunda mitad del siglo, la Fitoquímica fue la disciplina que impulsó un avance sustancial en el conocimiento de las plantas medicinales del país. El empleo de la herbolaria medicinal dio sustento a los estudios etnobotánicos que aportaron el registro de un gran número de las especies medicinales actualmente en uso. Asimismo el esquema de trabajo interdisciplinario de fitoquímicos y de farmacólogos fundamentó sus diseños metodológicos de acuerdo a la información que proporcionaban los estudios de antropología médica y etnobotánica. Hoy en día, la mayoría de los fitoquímicos ya no sólo están interesados en el descubrimiento de nuevas estructuras, sino que buscan novedosos compuestos biológicamente activos. Sin embargo, un escaso número de estructuras aisladas e identificadas han sido evaluadas para determinar sus propiedades biológicas y sus potenciales como medicamentos (Meckes, 1993).

Los antibióticos son compuestos químicos derivados de organismos vivos o producido por ellos, que son capaces, a pequeñas concentraciones, de inhibir los procesos vitales de los microorganismos, pero el concepto de que sustancias derivadas de un microorganismo vivo pueden matar a otro (antibiosis) es casi tan antiguo como la misma ciencia microbiológica. Entre los mecanismos de acción de los antimicrobianos se encuentran:

1.- Inhibición de la síntesis de la pared celular

- 2.- Alteración de la permeabilidad en la membrana celular.
- 3.- Inhibición de la síntesis proteínas:
 En el proceso de transcripción o
 En el proceso de traducción.
- 4.- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.
- 5.- Bloqueo de rutas metabólicas esenciales o antagonismo competitivo (Murray *et al.*, 1993).

Se pensaba que al conocer los mecanismos de toxicidad de los fármacos y tratar de mejorar su eficacia terapéutica sería fácil controlar las infecciones bacterianas; pero el uso indiscriminado y muy extendido de los antibióticos, provocaron que los grupos bacterianos que se habían controlado, desarrollaran resistencia ante los antibióticos.

La resistencia bacteriana a los antibióticos puede ocurrir por mecanismos genéticos o no genéticos:

Dentro de los mecanismos genéticos se tiene:

a) Mutación: una alteración espontánea aleatoria y permanente a las secuencias de las bases del DNA del microorganismo y b) transferencia de información genética de un organismo a otro, bien sea por recombinación cromosómica (transformación, trasducción o conjugación) o por transferencia extracromosómica (plásmidos, episomas), llamados factores R que tiene dos componentes: un factor de transferencia de resistencia (RTF), que transporta los genes que codifican la duplicación y otro que permiten la transmisión sexual del plásmido, ejemplos:

1.- El aumento en la destrucción del antimicrobiano, producido por un plásmido. Los plásmidos R (actúan como si fueran virus sin envoltura externa) presentan gran variedad en cuanto a su contenido en genes, que confieren resistencia a diversos antibióticos. La resistencia múltiple puede ser transferida por conjugación entre cepas resistentes y cepas sensibles.

2.- Aumento en la destrucción de la droga. El nivel aumentado de una enzima puede incrementar la resistencia, (puede implicar la formación aumentada del metabolito competitivo o un número de copias de la enzima inhibida resultante de la ampliación genética en los plásmidos).

Entre los mecanismos no genéticos:

I.-La disminución de permeabilidad, en mutantes resistentes a los análogos de aminoácidos, implican la pérdida o la alteración de un sistema de transporte de membranas que transportan también el correspondiente aminoácidos normal. Las barreras de permeabilidad normales son responsables de muchas resistencias naturales contribuyendo así la membrana externa a la generalmente menor sensibilidad de los gérmenes gram negativos.

II.- la disminución en la actividad de la droga que se observa en mutantes resistente a sustancias análogas a las purinas o pirimidinas, que pueden convertirse en nucleótidos antes de que hayan podido interferir las reacciones fundamentales.

III.- La formación de un receptor alterado.

IV.- desarrollo de un paso metabólico alternativo, evitando la reacción inhibida.

V.- Presencia de una enzima alterada que todavía es capaz de realizar su función metabólica y que no es afectada ya por la droga.

VI.- Una estructura alterada de proteína ribosómica (Myrnk *et al.*, 1991; Murray, *et al.*, 1993).

El descubrimiento de hongos productores de antibióticos desencadenó la búsqueda exhaustiva en los últimos cincuenta años con resultados más que sorprendentes. La penicilina de Inglaterra, la estreptomycinina de Filipinas, las cefalosporinas y rifamicinas de Italia, la vancomicina de Indonesia, la

kanamicina de Japón. La pesquisa continúa, uno de los últimos hallazgos, las ciclosporinas (Kumate, 1993).

La búsqueda de compuestos de origen natural decayó por mucho tiempo (1930-1970) por el auge en la obtención de productos sintéticos. La aparición de enfermedades causadas por organismos que tienen resistencia a fármacos, representó severos problemas al área de la salud y dio pauta para incrementar las investigaciones desde el punto de vista químico y farmacológico de las plantas enfocadas a la búsqueda de nuevos principios activos para el desarrollo de compuestos menos tóxicos, más selectivos y más eficaces (Cragg *et al.*, 1997).

JUSTIFICACIÓN

La flora mexicana al ser una de las más ricas del mundo y los estudios fitoquímicos relativamente escasos (Romo de Vivar, 1985), el potencial que ofrecen las plantas usadas en la medicina tradicional, como fuente de nuevos y/o conocidos principios activos es valioso porque aún no se han explorado adecuadamente (Mata, 1993). Y como se han formado numerosas cepas resistentes a los antibióticos, en la actualidad ha surgido gran interés en la búsqueda de sustancias de origen vegetal con la capacidad de controlar y aliviar diferentes tipos de infecciones. Además las plantas desde épocas antiguas son utilizadas para el tratamiento de diversos padecimientos, como la diarrea. En México, al igual que en muchos países en desarrollo las enfermedades de origen bacteriano representan un problema de salud importante, la planta *Viguiera dentata* (Cav.) Sprengel (Chimalacate) es considerada como maleza y en un estudio preliminar (Rocha, 2003) la reportan con actividad antibacteriana, lo anterior plantea la necesidad de realizar investigaciones que permitan caracterizar y comprobar dicha información, así el conocimiento del potencial de los recursos vegetales contribuye de manera significativa en la definición de estrategias para su aprovechamiento y podrían desarrollarse a través de la investigación alternativas para la elaboración de formas farmacéuticas económicas y accesibles a la población.

OBJETIVOS GENERALES

Determinar la actividad antibacteriana de *Viguiera dentata* (Cav.) Sprengel (Chimalacate), purificar el (o los) principio (s) activo (s) y elucidar su (s) estructura (s) química (s).

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la actividad antibacteriana de aceites esenciales, extractos de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo, metanol y extracto acuoso).

Comparar la actividad antibacteriana de los extractos de las diferentes partes de la planta (tallos, hojas y flores) utilizando diferentes polaridades (hexanos, acetato de etilo y metanol).

Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Bactericida Mínima (CBM) del compuesto puro responsable de la actividad antibacteriana.

ANTECEDENTES

LA FAMILIA ASTERACEAE Y LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE ORIGEN VEGETAL CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

De algunas especies de plantas se han aislado compuestos antimicrobianos (Murphy-Cowan, 1999), bacteriostáticos y antifúngicos: líquenes, Briofitas (musgos y hepáticas), monocotiledóneas, dicotiledóneas (Trease-Evans, 1991).

Por otra parte, de otros trabajos, se tiene el conocimiento de que extractos de diferente polaridad (sobre todo de polaridades intermedias o no polares) presentan y se han aislado algunos principios activos con actividad antibacteriana (Gutiérrez, 1989, Méndez, 1995; Avila, 1996 y 2002; Rubio, 1996; Hernández, 1999; Canales, 2000).

Cabe mencionar que se han aislado varios principios activos de plantas superiores desde inicio de siglo, hasta la fecha. Pero en este caso únicamente nos referiremos a la importancia que representa la familia Asteraceae a los metabolitos que producen y a la actividad biológica que presenta algunas de estas plantas debido a que la planta a estudiar pertenece a esta familia.

La familia ocupa un lugar preponderante en la flora de México, tanto a nivel de géneros (387) como de especies (2861) y contribuye grandemente a la enorme riqueza florística de nuestro país (Villaseñor, 1993). Frecuentemente representan 10-15% de las especies de cualquier región florística o biogeográfica (Turner y Nesom en Ramamoorthy *et al.*, 1998). En México, tanto las zonas montañosas como en las áridas y semiáridas representan sus principales áreas de diversificación (Rzedowski, 1972)

La perturbación continua o intensa por el hombre siempre tiene efectos devastadores sobre la flora natural, los organismos que prosperan en los hábitats hechos por el hombre son las malezas y las plantas domesticadas. Las malezas con frecuencia invaden hábitats pioneros, pero son reemplazadas por

colonizadores silvestres cuando el hábitat no es más perturbado (De Wet, 1975).

Las Asteraceae tienen un incalculable interés económico indirecto para el hombre, pues son las que contribuyen a la diversidad, y por consiguiente, a la estabilidad y mantenimiento de la productividad de los tipos más secos de comunidades (pradera, matorrales y semidesiertos) de todo el mundo, especialmente de las áreas tropicales y subtropicales. En contraste y no obstante a su gran diversidad, la importancia económica directa de la familia es pequeña. Pertenecen a ella plantas alimenticias, ornamentales, suculentas, venenosas, mala hierba, ceremoniales, de estética, para obtener colorantes y medicinales (Heywood, 1985; Stepp y Moerman, 2001).

La diversidad observada en la familia puede atribuirse a diversos factores, entre los que se pueden mencionar su plasticidad génica que les permite adaptarse a muy diversas condiciones ecológicas, muchas veces como malezas, muy probablemente, por sus eficientes mecanismos de dispersión y posiblemente también a su plasticidad química, que se refleja en su éxito contra los depredadores o competidores (Cronquist, 1981; Cabrera-Rodríguez y Villaseñor, 1987).

Los metabolitos secundarios en las plantas son importantes para las funciones ecológicas como la alelopatía, donde inhiben la germinación y el crecimiento de otras plantas; como atrayentes para insectos y otros animales polinizadores y para la dispersión de la semilla; para la defensa química contra microbios, insectos y herbívoros (Harbone, 1993), parece ser que las malezas podrían tener considerable concentración de metabolitos secundarios bioactivos. De las 12 familias de malezas que existen, también son las más importantes familias medicinales, entre ellas están las Asteraceae (Holm, 1978 en Stepp y Moerman, 2001)

Algunas Asteraceae tienen propiedades biológicas antiinflamatorias, antitumoral, antiúlceras, cardiotónica, neurotóxica, antimigraña, analgésica, antihelmíntica, antiséptica, para aliviar infecciones y desórdenes

gastrointestinales aunque algunas pueden causar dermatitis, alergias, hipotensión, otras tienen propiedades oxitóxicas, citotóxicas y algunas efectos estimulantes al sistema nervioso central y puede causar convulsiones y la muerte (Martínez, 1982; Henrich, *et al.*, 1998).

La familia Asteraceae está dividida en varias tribus, o subtribus, las cuales tienen características diferentes en su fitoquímica (Henrich, *et al.*, op cit), Los productos naturales que producen son diversos pero incluyen lactonas sesquiterpénicas (SQLs), poliacetilenos, alcaloides, aceites esenciales, terpenos, flavonoides y cumarinas, por lo tanto su actividad biológica depende lógicamente del compuesto activo que contenga (Romo de Vivar, 1985 (b); Henrich *et al.*, 1998).

Muchos de estos compuesto presentan actividad antibacteriana lactonas sesquiterpénicas, alcaloides, aceites esenciales, terpenos, flavonoides, taninos, cumarinas, fenoles, quinonas, polipéptidos y terpenos (Murphy, 1999), pero solo algunos se les ha determinado su mecanismo de acción, como por ejemplo: flavonoides: inhiben la síntesis de DNA o RNA (Mori, 1987), taninos: presentan astringencia (Scalbert, 1991), acción sobre membranas y competencia por metales (Konishy, 1987), terpenos: solubiliza y causan lisis en la membrana (Kubo, 1993).

LOS TERPENOS

El hombre encontró que en las fracciones más volátiles de muchos aceites esenciales había un gran número de hidrocarburos de fórmula $C_{10}H_{16}$ a los que se denominó terpenos (del alemán *terpentin* = trementina). Más tarde se aislaron compuestos oxigenados que se incluyeron dentro de esta clasificación general por lo que la terminación "eno" (correspondiente a hidrocarburo) resultó inadecuado y se les llamó terpenoides (Gros *et al.*, 1985).

Se han aislado compuestos de 20 y 30 átomos de carbono (di y triterpenos, respectivamente) principalmente de gomas y resinas de plantas y árboles, pero que a diferencia de los monoterpenoides de los aceites esenciales, no son arrastrables por vapor.

Se ha encontrado que en la biosíntesis de los llamados isoprenoides, el ácido mevalónico (ácido 3,5-dihidroxi-3-metilpentanoico), se convierte en el reactivo pirofosfato de isopentenilo o su isómero. Al reaccionar éstos, se forma el pirofosfato de geranilo con el esqueleto de un monoterpeno. La unión de éste con otro pirofosfato de isopentenilo forma el pirofosfato de farnesilo (sesquiterpeno). La unión de éste con su isómero alílico origina un triterpeno. La unión similar del pirofosfato de farnesilo con otra de pirofosfato de isopentenilo origina un diterpeno (Domínguez, 1988).

Los diterpenoides son definidos por sus orígenes biosintéticos a partir de un precursor geranylgeraniol C_{20} . Son derivados de cuatro unidades isoprenos (isopentil pirofosfato) con uniones cabeza-cola es decir, esqueletos carbonados de 20 átomos de carbono, se sintetizan a partir de unidades de acetato (acetil CoA) y como tal comparten su origen con los ácidos grasos, que se condensan y transforman para originar ácido mevalónico, este es activado, formándose isopentil pirofosfato, a partir de este compuesto y de una enzima (prenil transferasa) se origina toda la diversidad de terpenos (Figura 1). Difieren de los ácidos grasos en que tienen grandes ramas y son cíclicos.

En un principio los diterpenoides se clasificaron con base en los esqueletos carbonados obtenidos fundamentalmente por deshidrogenación de los productos naturales aislados (reteno, pimantreno y 7, 8-trimetilfenantreno) pero esto se ha reclasificado, tomando en cuenta en este caso el número de ciclos que presenta el esqueleto carbonado, en las siguientes clases: alicíclicos, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos, macrocíclicos, misceláneos.

Estas clases se han subdividido atendiendo al tipo de esqueleto carbonado.

Bicíclicos hay diterpenoides con esqueleto del tipo labdano y otros tipo de clerodano, entre los tricíclicos se encuentran los esqueletos del pimirano, del abietano y del cassano. Tetracíclico se aislaron compuestos con esqueletos del tipo del kaurano, del beyrano y del asiserano. Dentro de los tetracíclicos se incluyen dos grupos de sustancias biológicamente activas, uno de ellos está formado por las giberelinas, que son ácidos carboxílicos lactónicos diterpénicos con esqueletos del giberelano, que son hormonas responsables de la estimulación de numerosos procesos normales del crecimiento vegetal y están presentes en numerosas plantas superiores. El otro grupo está constituido por guayanotoxinas, que son diterpenoides tóxicos presentes en las hojas de varias especies vegetales, muchas veces como glicósidos.

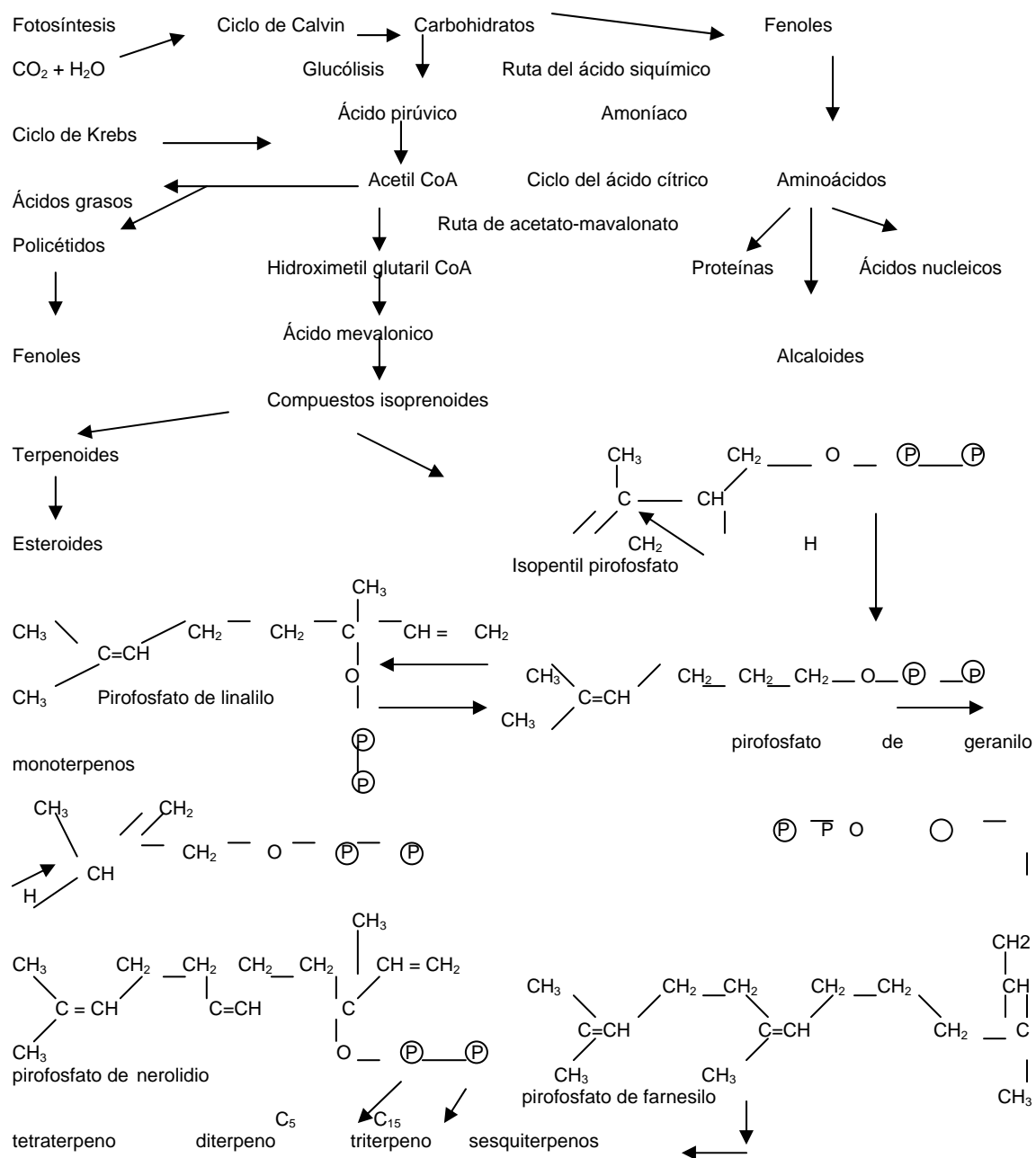


Fig. 1. Origen biosintético de los principales grupos de compuestos secundarios destacando a los terpenoides (Azcon-Bieto, 1993; modificado con Soriano, 1994).

La variedad de estructuras carbonadas encontradas y la presencia de distintos sustituyentes en diferentes posiciones de la molécula han dado origen a numerosos compuestos de este tipo aislados de fuentes naturales (Gros *et al.*, 1985)

ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales son productos generalmente olorosos, obtenidos por arrastre con vapor de agua de partes vegetales o mediante extracción con fluidos supercríticos: en las flores, hojas y aunque menos en raíces, leños, cortezas, frutos o semillas. Cuantitativamente, los contenidos son muy bajos, normalmente inferiores al 1%; porcentajes elevados, como el de los botones florales de clavo (15%) son excepcionales.

Composición química. Está caracterizada por orígenes biosintéticos distintos: la serie terpénica y la serie de los compuestos arénicos derivados del fenilpropano.

Serie terpénica. Monoterpenos y sesquiterpenos (terpenos más volátiles).

Serie aromática. Derivan del fenilpropano, a veces pueden ir acompañados de moléculas de C₆-C₁₁. Biogenéticamente, estos árenos son productos del metabolismo del ácido shikímico.

Compuestos de orígenes diversos. Compuestos acíclicos no terpénicos: alcoholes, aldehídos o cetonas de peso molecular bastante bajo. Según la forma de extracción, la esencia puede contener también productos más pesados: cumarinas, homólogos superiores de los fenilpropanos.

En las propiedades biológicas de los aceites esenciales destacan las siguientes relaciones:

- a) **poder antiséptico.** Incluye ciertas cepas resistentes al antibiótico. Algunos son activos frente a hongos inferiores responsables de micosis incluso, frente a levaduras.
- b) **propiedades irritantes (expectorantes, diuréticos).**
- c) **propiedades espasmolíticas, sedantes, tropismo neurovegetativo y ejerce una acción neurosedante** (Bruneton, 1991).

Mecanismo de acción de los terpenos (Compuestos bactericidas de origen vegetal)

El mecanismo de acción de los terpenos no ha sido totalmente entendido, pero se especula que involucra el rompimiento de la membrana por sus compuestos lipofílicos.

Algunos monoterpenos y compuestos fenólicos de bajo peso molecular presentes en los aceites esenciales de las plantas poseen una actividad antimicrobiana inespecífica puesto que tienen la capacidad de disolver las membranas celulares, con esto, se produce un efecto similar al de la lisis bacteriana provocada mediante enzimas líticas (lisozimas) o por tratamiento con disolventes orgánicos (Harvey, 1982) este efecto es observado especialmente en bacterias gram negativas (Kubo, 1993). Helander *et al.*, (1998) demostraron que las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium* al ser sometidas a dosis bajas de carvacrol y de timol aumentaban la concentración de ATP y de glucosa 6-fosfato extracelular, debido a esto, se evidenció el efecto lítico de estos compuestos sobre la membrana celular bacteriana.

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

Mendoza (1997) encontró que incrementando la hidrofiliación del diterpenoide kaureno por adición de un grupo metilo drásticamente reduce su actividad

antimicrobial. Los dobles enlaces conjugados y el CH que reacciona con el exterior de un anillo puede mejorar la actividad antibacteriana, además el grupo hidroxilo aumenta también la actividad antibacteriana (Chang *et al.*, 2001). La sustitución sobre un carbono-15 aumenta significativamente la actividad antibacteriana en los compuestos derivados del ácido kaurenoico (Davino *et al.*, 1989).

El mecanismo de acción del ácido kaurenoico (AK) no ha sido bien determinado, pero Wilkens *et al.*, (2002) sugieren que la membrana externa puede servir como barrera preventiva contra AK y la vía de entrada es la membrana citoplasmática aunque la acción sobre la síntesis de peptidoglucano no puede ser descartada. Así mismo un ácido débil puede transportar protones a través de la membrana, otro posible mecanismo de acción del AK es la interacción del transporte de electrones y subsecuentemente la fosforilación oxidativa en la membrana citoplasmática. También puede deberse por la ruptura de la membrana citoplasmática por interacción física. Estructuralmente la presencia del ácido carboxílico en posición 19 parece ser importante sobre la actividad antibacteriana debido a que derivados sintéticos y naturales con este grupo bloquean la interaccionan con enlaces hidrógenos reduciendo o inhibiendo la actividad. Además el efecto lítico del diterpeno depende del medio de cultivo así como de la forma que presenta la bacteria observándose mayor efecto en formas esféricas como en vesiculares.

Una vía adicional de entrada para determinar los mecanismos de acción del compuesto antibacterial es el aislamiento de las mutantes espontáneas resistentes sugiriendo un sitio blanco del AK o una estructura esencial o funcional.

Algunos ejemplos de terpenos aislados con actividad biológica son: el terpenoide capsaicina, tiene un amplio rango de actividades biológicas en el humano, es bactericida para *Helicobacter pylori*. El terpenoide petalostemumol, aislado del trébol de la pradera es activo contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, y mucho menos activo contra bacterias gram negativas, así como también contra *Candida albicans* (Murphy-Cowan, 1999).

El compuesto diversifolin presenta actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* (Rungeler *et al.*, 1998), el espatulenol contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Cobos *et al.*, 2001) como *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis* (Ulubelen *et al.*, 1994), el compuesto manool tiene actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Ulubelen *et al.*, 1994), el ácido oleanólico presenta actividad contra *Bacillus subtilis* y contra *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina (Woldemichael *et al.*, 2003).

Velikova *et al.*, (2000) mencionan que el ácido kaurenico tiene actividad antibacterial moderada, Zgoda-Pols *et al.*, (2002) menciona la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina y *Mycobacterium smegmatis*. Wilkens *et al.*, (2002) realizaron una caracterización de la actividad antibacterial del ácido kaurenico en el que menciona la actividad selectiva contra bacterias gram positivas, es bacteriolítico para *Bacillus cereus*, esa actividad en particular es afectada por la composición y el pH del medio de cultivo, por otra parte, las mutantes LPS de *Salmonella typhi* son resistentes a este compuesto, pero los esferoplastos de *Escherichia coli* son más sensibles.

ANTECEDENTES DEL GÉNERO *VIGUIERA*

Las Asteraceae es una de las familias con mayor número de especies en el reino vegetal y se ha dividido en trece tribus con características morfológicas comunes.

Con frecuencia, las diferencias morfológicas entre especies son muy pequeñas y crean por lo tanto confusión. Los metabolitos secundarios ayudan para la clasificación de plantas (quimiotaxonomía), ya que algunos de éstos son característicos de tribus, de géneros y en ocasiones, son típicos de especies particulares (Romo de Vivar y Delgado, 1985 (a)).

El género *Viguiera* es muy primitivo ya que uno de los escasos fósiles de identidad establecida pertenece a este género, por lo que es considerada como el punto de origen de la familia Asteraceae; por lo que cualquier contribución al estudio químico y taxonómico de *Viguiera* y géneros derivados de él, tiene interés en cuanto al aspecto evolutivo de esta familia (Romo de Vivar, 1985 (a), Romo de Vivar, 1985 (b)).

Género *Viguiera*

El género fue establecido por Kunth, en 1820 y revisado botánicamente, por Blake, fijándolo en tres subgéneros, siete secciones, diez series, dos subseries, 141 especies y dos especies de dudosa afinidad (Blake 1918 citado por Romo de Vivar, 1985 (a), Romo de Vivar, 1985 (b)).

El género *Viguiera* se representa como una especie oportunista que crece y se desarrolla después de las primeras lluvias (Guillet *et al.*, 1997).

En cuanto al estudio químico del género se han encontrado lactonas sesquiterpénicas, germacrólidos, heliangólidos y furanohelingólidos. Diterpenos con esqueleto de ent-kaurano, ent-beyerano, ent-atisano, traquilobano y ent-primarano (Vaccharini *et al.*, 1999). La Tabla 1 resume los metabolitos secundarios encontrados en el género *Viguiera*:

Tabla 1. Metabolitos secundarios del género *Viguiera*.

Especie	Compuestos aislados
<i>V. angustifolia</i> (H.B.K.) Blake	Budleína A
<i>V. annua</i>	Trans-1,3,5,11-tridecatetraen-7,9-diyne, 1,cis-3,trans-5,trans-11-tridecatetraen-7.9-diyne.
<i>V. arenaria</i>	Ácido ent-Primara-8(14),15-dien-19-oic
<i>V. aspillioides</i>	Ácido (-)-ent-kaur-16-en-19-oic, ácido (-)-trachyloba-19-oic, (-)-kauran-16 α -ol, (-)-kaur-16-en-19-ol.
<i>V. bishopii</i> H. Robles	α -pinene, ácido ent-kaurenoico ent-manol, ácido stached-19-oic, ácido 9, 11-dehydro-ent-kaurenico, 17 α -hydroxy-ent-kaurano, ácido trachylobanico, bicyclogermcrene, modhephene, biformene, spathulenol, elimicin, γ -asarone, spathulenol, elimicina, ácido beyerano-15-en19-oico, modefeno, 9(11)-deshidroanálogo, ácido traquilbanico, δ -asarona
<i>V. buddleiaeformis</i> (D.C.) B & H	Budleína A y B, viguiepinina
<i>V. decurrens</i>	Ácido Ent-kaureno-16-en-19-oic, ácido 15 α -angeloyloxy-ent-kaureno-16-en-19-oic, β -D-glucopyranosyloleanolate, β -sitosteryl-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosidurooate, chromene, 8-hidroxy-6-acetyl-2,2dimethylchromene, friedelan-3 β -ol, ácido oleanolico, 3- <i>O</i> -(methyl- β -D-glucuronopyranosidurooate)-28- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyloleanolate, 6-methylglucuronopyranosidurooate.
<i>V. dentata</i> (Cav.) Spreng	manool (I y II), <i>ent</i> -kauranol (III), ácido grandiflorico, ácido angeloyl-grandiflorico, ácido 15-Oxo- <i>ent</i> -kaurenico, ácido trachylobanico, diversifolin y espatulenol, el ácido <i>ent</i> -kaurenico 9, 11-dehydro- <i>ent</i> -kaureno, ácido linoleico, ácido ent-kaurenico.
<i>V. discolor</i>	Sucrose fructosyltransferase (SST), fructan fructosyl-transferase (FFT), 1.kestose
<i>V. eriophora</i> Greenm.	(Erioflorina y 17, 18 dehidroviguiepinina) (m),
<i>V. eriophora</i> ssp. <i>eriphora</i>	17,18-dehidroviguiepinina, erioflorina, acetylerioflorina, budleina A, calaxin, leptocarpin, acetil-erioflorina
<i>V. excelsa</i> (Wiild.) B. & N.	Clovandiol, budleina A
<i>V. grammatoglossa</i> D.C.	Ent beyerenos, ácidos kaurenoicos, germacrenos
<i>V. gregii</i>	Zexbrevina, zabrevina B y 1(2)-dehidro-zexbrevina B
<i>V. hemesleyana</i>	Lactona (17,18 dihidrobudleína A
<i>V. hypargyrea</i>	Ácido ent-beyer-15-en-19-oic, ácido ent-kaur-16-en-19 oic, clovandiol, 8 β -[epoxyangeloyloxi]-14-hydroxythifolin, 8-epoxy-[angeloyl]-14-acetoxy-eupatulide, 15 α -tigloyloxy-9 β -hidroxy-ent-kaur-16-en 19 -oic acid, methyl-15 α -angeloyloxy-9 β -hidroxy-ent-kaur-16-en-19-oate, eupatulde, hanphyllin, budleina B, 12-oxo-ent-kaur-9(11), 16-dien-19-oico ácido.
<i>V. hipoclona</i>	Budleina A
<i>V. incana</i>	Falcarinol, ácido ent-kaurenoico, acetato de falcarinol
<i>V. insignis</i> Miranda	ácidos ent-Kaur-9(11)-16-dien-19-oico, ácido ent-Kaur-16-dien-19 oico y los alcoholes diterpénicos estach-15-en-19-oico, estach-15-en-3-ol y los dioles isómeros, (+)-estach-15-en-3 α -, 19 diol y su isómero estach-15-en-3, 12-diol, estach-15-en-3 α -ol, estach-15-en-3 α ,12 β -diol. (b) ent-kaur-9(11)-16-dien-19-oate (2), acetil-leptocarpina, budleína A y B, flavan-3-ol
<i>V. lanceolata</i> Britton	falcarinol, falcarinone, ácido ent-kaurenoico, 17,18-dihidrobudleína A

<i>V. linearis</i> (Cav.) Sch. Bip. Ex Heas	Viguieninaclovandiol, budleína B
<i>V. maculata</i> Blake	15-oxo-zoapatlin
<i>V. microphylla</i> Vasey & Rose	1(10)-epoxi-germacrolida, 3 β -hydroxy-8 β -epoxyangeloyloxyconstunolide-1 β , 10 α -epoxido.
<i>V. multiflora</i> (Hutt.) Blake	Chalconas y auronas, estenolobina (e)
<i>V. oblongifolia</i> Garda.	1-keto-2,3-insturada-3,10-epoxy, 1 β , 6 β ,7 β ,10 α -cadina-4(1)dieno β -bisboleno analogo de atripliciolida, 17,18-dihidrobudleína A, silphiperfol-5-ene, 1 β ,6 β ,7 β ,19 α H-Cadina-4,1-dieno.
<i>V. pazensis</i> Rusby	ácido trachylobanico, falcarinol, falcarinone, ácido ent-kaurenoico, 13 α ,15 α , dihidroxivillanovano, viguiestenina
<i>V. pinnatilobata</i> Sch. Bip.	Viguiopinina y desacetilviguiestenina (h) 17,18-deshidro-viguiopinina
<i>V. procumbens</i> (Pers.) Blake	Ácido ent-kaurenoico, falcarione 7, falcarinol, ácido trachylobanico, α -farnesene, pentadec-1-ene, humulene, isobutyrate (viguiestenina), desacetylviguiestenina,8 α -[2-Methylbutyryloxy], isovaleriloxy-8-desacylviguiestenina.germacreno D,humileno17,18-deshidro-acetil-leptocarpina, isovateral análogo.
<i>V. quinqueradiata</i> (Cav.) gray	Lactona sesquiterpénica leptocarpina, 15- α -angeiloxi ent-Kaur-16-en-oico, 15- α -tiogloxi--16-en-19-oico y el ácido 15- α -hidroxi-ent-kaur-16-en-19-oico
<i>V. quinqueremis</i> Blake	1 α -Methoxy-3 α ,15-dihydroxy-3,10-epoxy-8 β -O-angeloyl-4,11(13)germacradien,6 α ,12-olide, 1 α -Methoxy-3 α ,15-dihydroxy-3,10-epoxy-8 β -O-methylbutanoyl-4-11(13)germacradien,6 α ,12-olide, 1 α ,10 β ,15-Trihydroxy-3-oxo-8 β -O-methylbutanoyl-4,11(13)germacradien,6 α ,12-olide, 3 α ,15-Dihydroxy-3,10-epoxy-8 β -O-methylbutanoyl-1,4,11(13)germacratien,6 α ,12-olide, 2 α -hidroxy-9 β -O-methylbutanoyl-1(10),4,11(13)germacratien,6 α ,12-olide, 2 α -Hydroxy-9 β -O-angeloyl-1(10),4,11(13)germacradien,6 α ,12-olide, 6-Angeloyl-2.3-dimethylbutanoyl-myoinositol, 1-keto-2,4-insaturada budleína. Budleína A
<i>V. robusta</i>	1-keto-2,3-insturada-3,10-epoxy, ácido ent-kaurenoico, budleína Atiglate, methacrylate
<i>V. shultzii</i> Blake	Budleína A
<i>V. stenoloba</i> Blake	lactonas sesquiterpénicas (viguiestenina y la desacetilviguiestenina) diterpeno tetracíclico (ent-kaurenicos estenolobina y 15 α angeloiloxi estenolobina) C(1)C(2) ent-kaur-9(11)-16-dien-19-oate, ent-9 α -hidroxy kaurenoico ácido ent-kaur-9(11)-16-dien-19-oic, ácido ent-kaur-9(11)-15-dien-19-oate, demethyl-stenolobina, iso-zoapatlin,zoapatlin, 15-oxo-zoapatlin, methyl-15 α -angeloyloxy-9 β -hidroxy-ent-kaur-16-en 19-oate.
<i>V. stenoloba</i> var. <i>chihuahuensis</i> Blake	ácido cis-ózico
<i>V. sphaerocephala</i> (D.C.)	Esferocefalina y la heliangólida erioflorina
<i>V. tucumanensis</i>	Clerodano-14-ene-3 α ,4 β -13 ξ -triol,

Tomado de Romo de Vivar y Delgado, 1985 (a), complementado con Romo de Vivar, 1985 (b); Alvarez *et al.*, 1985; Ambrosio *et al.*, 2002; Bohlmann, *et al.*, 1981; Bohlman *et al.*, 1984; Da Costa, Albuquerque, Vichnewski, 1996; Da Costa, Vichnewski y Herz, 1996; Delgado y Romo de Vivar, 1984; Delgado *et al.*, 1983; Gao *et al.*, 1985; Gershenzon *et al.*, 1983; Guillet *et al.*, 1997; Itaya *et al.*, Spring *et al.*, 2000; Spring *et al.*, 2001; Vaccarini *et al.*, 1999.

DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA

Viguiera dentata (Cav.) Sprengel. Asteraceae

Botánica

Ubicación taxonómica

Reino.- Plantae.

Subreino.-Magnoleofita (cormofita)

División.- Espermatofita.

Subdivisión.- Angeosperma.

Clase.- Dicotiledonia.

Subclase.- Asteridae.

Orden.- Asterales.

Familia.- Asteraceae

Subfamilia.- Asteroidae.

Tribu.- Heliantheae.

Genero.- *Viguiera*.

Especie.- *Viguiera dentata* (Cav.)

Sprengel.



Fig. 2. *Viguiera dentata* (Chimalacate)

Nombres comunes.

Tah (Yucatán), Toh (Yucatán)

Chamizo (Región de Guadalcázar, S.L.P.)

Romerillo de la costa.

Descripción. *V. dentata* es una planta herbácea perenne, erecta de 2.5 metros de alto hasta 30 centímetros; tallos glabros a pilosos o hispídos; hojas todas opuestas o bien alternas en la parte superior, sobre pecíolos de 0.5 a 5.5 centímetros de largo, limbos generalmente ovalados o romboides ovalados de 3.5 a 12 centímetros de largo de 1 a 8 centímetros de ancho, en el ápice, enteros o cerrados en el margen, cuneados o acuminados truncados en la base, finalmente estrigoso a piloso en el haz, esparcidamente trigoso a subcanescente en el envés, trinervados; con inflorescencias cabezuelas numerosas en panículas, cimosas bracteadas, sobre pedúnculos hasta de 15 centímetros de largo; involucre anchamente campanulado a subhemisférico, de 5 a 10 milímetros de alto, sus brácteas dispuestas en 2 a 3 series graduadas de tamaño subigual, endurecidas en la base y con la parte distal herbácea, linear o linear oblonga; páleas pubescentes dorsalmente de 6 a 7 milímetros de largo, flores liguladas 10 a 13 elípticas u oblongas amarillas de 7 a 15 milímetros de largo y los rayos de las flores de 10 a 12, flores del disco más de 50, su corola amarilla es de 3 a 4 milímetros de largo. Disco de la corola amarillo, fruto negro o moteado (Rzedowsky, 1985).

Se distingue por su escasa o nula pubescencia en el tallo y por las hojas verdes en ambas caras. *V. dentata* también se citó en el Valle de México como *Viguiera helianthoides* HBK.

Es maleza ruderal, o matorrales (Rzedowsky, *op cit*).

Planta originaria de México (Argueta *et al.*, 1994).

Etnobótica y antropología

Se usa como antiséptico en Sonora y antitusivo en Quintana Roo. No se detectaron antecedentes de estudios químicos o farmacológicos que corroboren su efecto (Argueta *et al.*, *op cit*).

En San Rafael Coxcatlán, *Viguiera dentata* es una de las plantas más empleadas debido a que es utilizada como forrajera además de que es aplicada para aliviar

la picadura de hormiga y como remedio para el chincual (granitos en los glúteos de los bebés) (Rosas, 2003).

Actividad Biológica

Un estudio fitoquímico en la zona de San Rafael Coxcatlán, Puebla, reporta a *Viguiera dentata* con un efecto antibacteriano en los extractos no polares principalmente, contra 7 bacterias que producen enfermedades intestinales e infecciosas de la piel (Rocha, 2002).

Química

Se reportan los compuestos: manool, ent-kauranol, ácido grandiflorico, ácido angeloyl-grandiflorico, ácido 15-Oxo-ent-kaurenico, ácido trachylobanico, diversifolin y espatulenol, el ácido ent-kaurenico 9,11-dehydro-ent-kaureno, ácido linoleico (Bolhaman en Gao *et al.*, 1985).

Ecología

Es una de las especies más ampliamente distribuidas de este género (Gao *et al.*, 1985).

Conocida del SW de los Estados Unidos a Honduras. Originaria de México, predomina en climas calidos desde 2250 – 2500 msnm hasta los 30 m. asociada a bosques tropicales subcaducifolios (Argueta *et al.*, 1994).

En México las asociaciones vegetales secundarias (principalmente) donde se encuentra *V. dentata* son:

Cardonal de *Pachycereus weberi*, Cardonal de *Stenocereus stellatus*, Tetechera de *Neobuxbaumia tetetzo*, Selva baja caducifolia, Izotal de *Beaucarnea gracilis*, Candelillar de *Euphorbia antisyphilitica*, Matorral esclerófilo perennifolio (mexical), Matorral de *Gochnatia hypoleuca* (Dávila, 1993 y Casas, 1999 en Valiente-Banuet, 2000).

Villaseñor et al., (1998) menciona al género *Viguiera* como maleza de México en cultivos de henequén y de maíz. También reporta la distribución de *Viguiera dentata* en México:

Viguiera dentata (Cav.) Spreng. var. *dentata* (DC.) S.F. Blake

Aguascalientes	Guerrero	Jalisco	Tamaulipas
Chiapas	Guanajuato	Hidalgo	Veracruz
Chihuahua	Puebla	Sinaloa	Zacatecas
Coahuila	Querétaro	Sonora	Estado de México.
Colima	San Luis Potosí	Morelos	
Durango	Nayarit	Oaxaca	
Nuevo león	Distrito federal	Michoacán	

Viguiera dentata (Cav.) Spreng. var. *helianthoides* (Kunth) S.F. Blake *Viguiera helianthoides* Kunth

Quintana roo Chiapas
 Chihuahua Sonora
 Yucatán
 Campeche.

No se encuentra reporte alguno para estos estados:

Baja California Norte
 Tabasco
 Tlaxcala

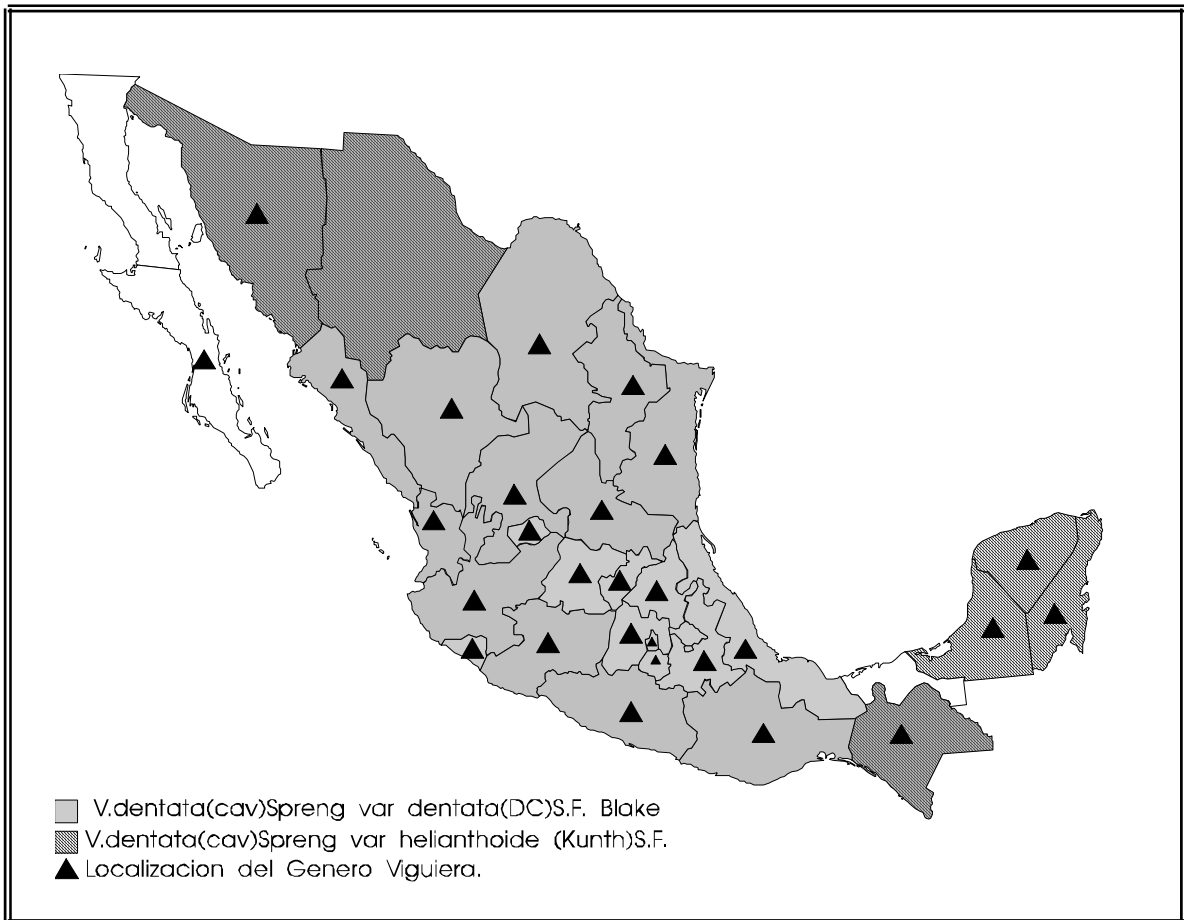


Fig. 3. Distribución del género *Viguiera*

AREA DE ESTUDIO.

La planta fue colectada en San Rafael Coxcatlán (Fig. 1). En un estudio realizado por Medina (2000), menciona que el municipio está localizado al sureste del valle a 18° 12" y 18° 14" de latitud norte, 97° 07" y 97° 09" longitud oeste, 870 a 1043 msnm dentro del valle de Tehuacán–Cuicatlán. Según reportes de la estación meteorológica de Coxcatlán el tipo de clima en la zona es el Bs1 (h') w" (w) (e) g correspondiente a climas secos o áridos, cálidos con lluvias en verano, con temperatura media anual sobre 22 °C, su régimen de lluvias es de verano y se calcula una precipitación total anual de 394.6 mm.

Dentro del valle, la comunidad Nahua de San Rafael Coxcatlán tiene gran importancia para la reconstrucción de la prehistoria ya que en algunas cuevas del área de Coxcatlán, los arqueólogos han encontrado la evidencia más antigua de la domesticación de plantas y origen de agricultura en el nuevo mundo (MacNeish, 1992).

En cuanto a vegetación acorde con Rzedowski (1978) el área presenta bosque tropical caducifolio y como especies dominantes: *Bursera morelensis*, *B. aptera*, *Pachycereus weberi*, *Opuntia puberula*, *Ceiba parviflora*, *Acacia cochliacantha*, Además, Fernández (1999) reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación para el área de estudio:

CARDONAL de *Pachycereus weberi* se caracteriza por la dominancia de cactáceas columnares (Cardones), coexistiendo diferentes tipos de arbustos en el cual se encuentra *Viguiera dentata*.

CHIOTILLAL de *Escontria chiotilla* en el nivel próximo al margen del cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal, con una alta densidad arbustiva.

CUAJIOTAL con especies dominantes como: *Bursera morelensis*, *Mimosa polyantha*, *Fouquieria formosa*, así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fructosa*, localizada a aproximadamente 1.5 a 3.5 m por encima del nivel basal.

FOUQUERIA tiene especies dominantes como: *Fouquieria formosa*, *Bursera aptera*, *Mimosa polyantha*, *Ceiba parvifolia*, *Manihotoides pauciflora*, *Senna wisliseni*, *Mimosa luisana* y *Sanvitalia fructicosa*. Localizada en el nivel más alto, de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal, la densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceo es muy baja, dominando en su totalidad por *Sanvitalia fructosa*.

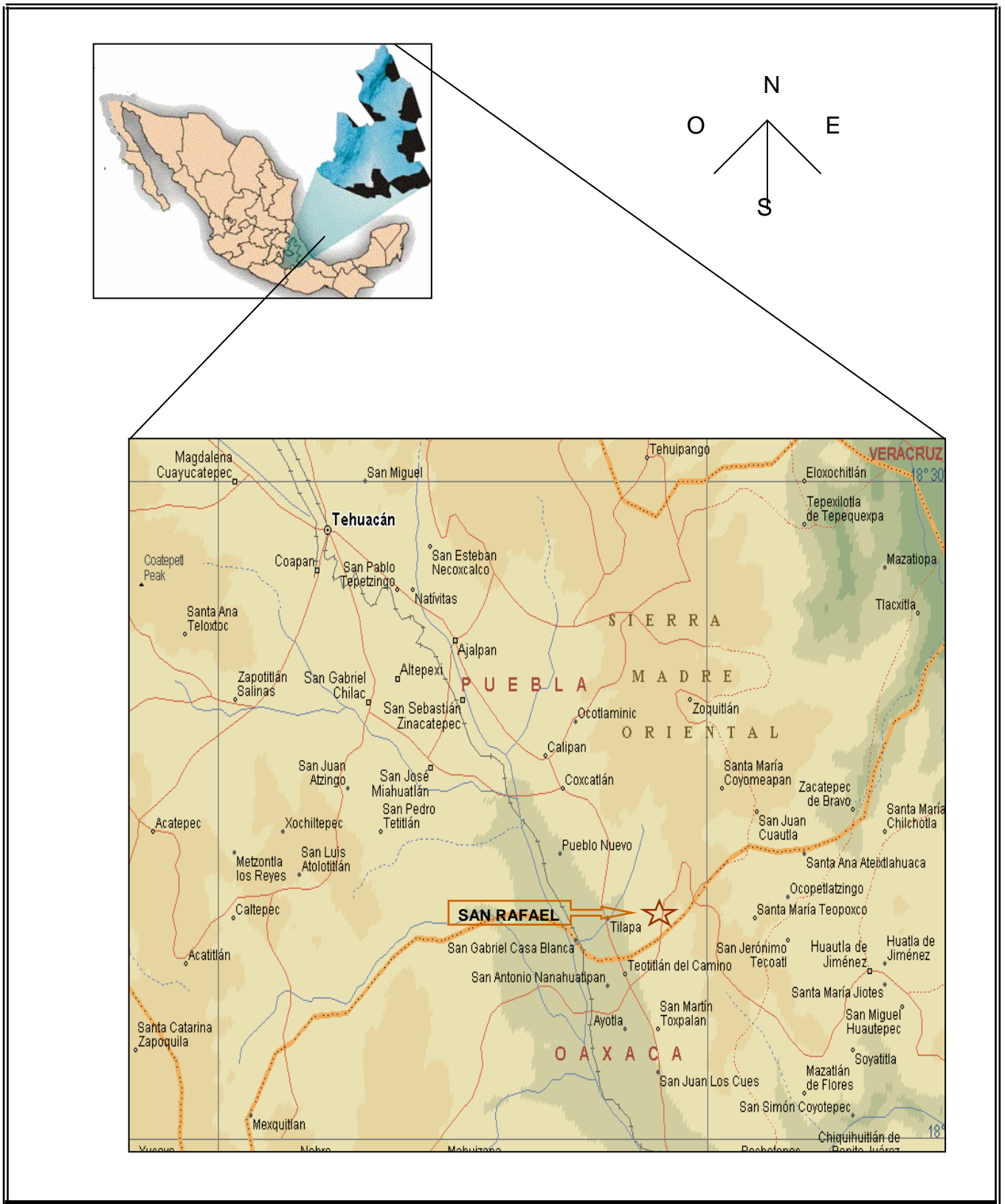


Fig. 4. Localización geográfica de San Rafael Coxcatlán, Puebla.

METODOLOGÍA

Se trabajó con la planta *Viguiera dentata* (Cav.) Sprengel, comúnmente llamada “chimalacate” en la zona de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Se realizó una revisión bibliográfica de la planta debido a que se tienen antecedentes sobre estudios etnobotánico-químico-biológicos en relación a su actividad antibacteriana (Canales, comunicación personal) y es necesario comprobar y complementar dicha información.

I.- OBTENCIÓN DE LA PLANTA.

La planta *V. dentata* se colectó durante los meses de octubre y diciembre del 2001, en la zona de San Rafael, Coxcatlán Puebla, se llevó un ejemplar al herbario IZTA y se identificó.

II. BIOENSAYOS PRELIMINARES.

Se realizaron bioensayos preliminares de la planta *V. dentata* cada uno por triplicado para comprobar la actividad antibacteriana, los cuales consistieron en:

A) OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES.

Con 500 g. de la planta fresca se obtuvieron los aceites mediante arrastre de vapor (Domínguez, 1973, Vogel, 1989) (apéndice 2).

B) PREPARACIÓN DE EXTRACTOS.

-Extracto acuoso.

Se pesaron 50 g. de planta seca, el extracto acuoso se obtuvo por infusión (apéndice 1) y se concentró a sequedad en una liofilizadora Labconco modelo Freeze dry system / Freezone 4.5.

-Extractos de diferente polaridad de toda la planta.

Los extractos herbales se obtuvieron mediante la técnica de percolación (apéndice 4), utilizando 92.16 g. de planta seca. A los cuales se les determinó el rendimiento y la actividad antibacteriana.

Después los bioensayos preliminares y de la comprobación de la actividad antibacteriana se realizó un bioensayo de cada una de las diferentes partes de la planta *V. dentata* (hoja, tallo y flor) cada uno por triplicado, los cuales consistieron en:

III.-SEGUNDO BIOENSAYO:

-Extractos de diferente polaridad de las diferentes partes de la planta (tallo, hoja y flor).

Los extractos herbales se obtuvieron mediante la técnica de percolación, utilizando 398.64 g. de flor, 257.30 g. de hoja y 1376.83 g. de tallo de la planta seca, se destiló el exceso de solvente a presión reducida y los diferentes extractos se concentraron a sequedad (apéndice 4). Se les determinó el rendimiento y la actividad antibacteriana.

CUANTIFICACIÓN DE SÓLIDOS.

Se realizó de acuerdo al Método propuesto por González-Peñalosa (1981) modificado (apéndice 3).

MICROORGANISMOS UTILIZADOS:

Vibrio cholerae No-01, *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislado de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislada caso clínico (estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo INABA), *Vibrio cholerae* Tor CDC V 23, *Escherichia coli* ATCC 25022, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Shigella boydii* ATCC 8700,

Enterobacter aerogenes, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Yersinia enterocolitica* donadas por el laboratorio de microbiología de la FES-Cuautitlán. *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* donadas por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES-Iztacala.

Cuadro 2. Simbología de las cepas bacterianas utilizadas para evaluar la actividad antibacteriana de *V. dentata*.

Bacteria	Simbología
<i>Bacillus subtilis</i>	B.s
<i>Sarcina lutea</i>	S.l
<i>Staphylococcus aureus</i>	S.a
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	S.e.
<i>Salmonella typhi</i>	S.t
<i>Enterobacter aerogenes</i>	E.ae.
<i>Enterobacter agglomerans</i> ATCC 27155	E.ag.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	E.c.
<i>Shigella boydii</i> ATCC 8700	S.b.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Y.e.
<i>Vibrio cholerae</i> Tor CDC V 23	V.ch.Tor.
<i>Vibrio cholerae</i> aislada de un caso clínico (grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba)	V.ch.C.C.
<i>Vibrio cholerae</i> INDRE 206 aislado de agua contaminada	V.ch. agua
<i>Vibrio cholerae</i> No.01	V.ch.No. 01

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

El método que se utilizó para evaluar la actividad antibacteriana en los ensayos preliminares fue el de difusión en agar (Kirby-Baüer) El método general se explica en el apéndice 5. Cada bioensayo se realizó por triplicado.

III) AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.

Se realizó una partición mediante el lavado del extracto hexánico de tallo con metanol por presentar la mayor actividad antibacteriana con respecto a las otras particiones, luego la purificación del compuesto activo por cromatografía biodirigida. Para la separación por cromatografía de placa fina se utilizaron cromatofolios de gel sílice (ALUGRAM SIL g/uv₂₅₄); para las cromatografías en columna se utilizó sílica gel malla 60-GF 254 (apéndice 6).

IV) ELUCIDACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS.

Se realizó mediante el análisis de los espectros de: Infrarrojo, Ultravioleta, resonancia magnética nuclear de protones RMN¹H, resonancia magnética nuclear de carbono 13 RMN¹³C y espectrometría de masas.

V) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM).

Se utilizó la microtécnica de dilución en caldo de Koneman modificado (1985) (Apéndice 7).

VI) MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

1.- EN EL BIOENSAYO PRELIMINAR.

Para saber si existían diferencias significativas entre extractos y bacterias, a los resultados se les realizó un análisis de varianza de dos factores (ANOVA bifactorial), siendo estos: a) extracto con 3 niveles (hexánico, acuoso y aceites esenciales) b) bacteria con dos niveles (gram positiva y gram negativa).

2.- EN LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE TALLO, HOJA Y FLOR.

a) Para determinar si existían diferencias significativas en los resultados de los bioensayos se realizó un análisis de varianza de tres factores, siendo estos: factor extracto con 2 niveles (hoja y tallo), factor solvente con tres niveles (hexano, acetato de etilo y metanol) y factor bacteria con dos niveles (Gram positiva y Gram negativa).

b) Para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de las diferentes combinaciones de solvente, extracto y bacteria se realizó una prueba de Tukey.

3.- EN LA EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS PARTICIONES.

Se realizó un análisis de varianza de dos factores, siendo éstos: factor extracto de tallo con dos niveles (partición hexánica y partición metanólica) y factor bacteria con dos niveles (Gram positiva y Gram negativa).

RESULTADOS Y ANÁLISIS

I.-OBTENCIÓN Y DATOS GENERALES DE LA PLANTA

La colecta de la planta *Viguiera dentata* (Cav.) Sprenguel, se realizó en el municipio de San Rafael Coxcatlán, Puebla en el mes de octubre para la realización de los bioensayos preliminares y en noviembre de 2001 para el estudio fitoquímico, la identificación taxonómica de la especie fue realizada por la Biol. Rocío Rosas, el ejemplar fue depositado en el herbario IZTA de la FES Iztacala. La información obtenida se resume en las tablas 3, 4 y 5.

Tabla 3.- Generalidades de la planta

Nombre científico	<i>Viguiera dentata</i> (Cav.) Sprenguel
Familia	Asteraceae
Nombre común en la localidad	Chimalacate
No. De registro	29 990

Tabla 4.- Datos etnobotánicos de la planta *V. dentata* en la zona de San Rafael Coxcatlán, Puebla (Rosas, 2003; Rocha, 2002).

Especie	<i>Viguiera dentata</i> (Cav) Sprenguel
Usos	Contra la picadura de hormiga ⁽¹⁾ y el chincual ⁽²⁾
Parte utilizada	Hojas
Forma de preparación	Infusión y cataplasma
Época de colecta	Noviembre-Febrero

Tabla 5.- Datos etnobotánicos de la planta *V. dentata* del atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana III (Argueta *et al.*, 1994).

<i>Viguiera helianthoides</i> H. B. K. ⁽³⁾	
Estado	Uso
Sonora	antiséptico
Quintana Roo	antitusivo

- 1) Para los piquetes de insectos, principalmente hormigas, se restriega la hoja entre los dedos y se coloca directamente sobre en la zona afectada.
- 2) Para el chincual (granitos en los glúteos de los bebés ocasionados por el pañal), se hace una infusión colocando hojas tiernas en agua hirviendo, se tapa el recipiente, se deja hervir por un "momento" y después con ese preparado se lava la parte afectada (Canales, en prensa).

3) Sinónimia de *Viguiera dentata*.

II.- BIOENSAYOS PRELIMINARES

Los rendimientos de los sólidos concentrados a sequedad (para extractos), se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Rendimientos obtenidos de los aceites esenciales, del extracto acuoso y de los extractos de diferente polaridad de las partes aéreas de *V. dentata*.

Extractos y aceites	Sólidos solubles (g.)	Rendimiento (%)	Planta utilizada (g.)
Hexano	3.11	3.37	92.16
Acetato de etilo	1.31	1.42	
Metanol	14.49	15.72	
Agua	11.89	23.78	50
Aceites esenciales	1.01	0.202	500

Nota. Para los aceites esenciales se utilizó planta fresca, para los demás extractos se utilizó planta seca.

En la Tabla 6 el extracto con mayor rendimiento fue el extracto de metanol (15.72%) y el rendimiento más bajo fue el de acetato de etilo (1.42 %).

Los resultados obtenidos para determinar la actividad antibacteriana se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Actividad antibacteriana de *V. dentata*.

Microorganismo (La simbología esta presentada en la tabla 2)	Halos de inhibición (mm) de los extractos y de los aceites esenciales de <i>V. dentata</i> .				
	control positivo	Hexano	Acetato de etilo	Agua	Aceites esenciales
B.s.	23.67 ± 2.03	9.00 ± 0.50	15.67 ± 1.15	20.66 ± 1.15	9.33 ± 0.57
S.l.	23.57 ± 0.75	13.67 ± 0.57	n.a	11.33 ± 0.57	n.a.
S.e.	27.00 ± 0.50	8.33 ± 1.15	n.a	10.00 ± 0.50	7.66 ± 0.57
S.a.	25.33 ± 1.50	9.33 ± 0.57	n.a	n.a	9.33 ± 0.57
V.ch.No. 01	30.00 ± 0.82	8.33 ± 0.57	n.a	11.00 ± 0.50	13.00 ± 0.50
V. ch. agua	29.67 ± 1.15	7.67 ± 0.57	n.a	13.66 ± 0.57	15.00 ± 1.00
V.ch. C.C.	27.33 ± 2.30	7.00 ± 0.50	n.a	7.00 ± 0.50	9.00 ± 0.50
E.c.	18.80 ± 0.34	n.a	n.a	n.a	9.00 ± 0.50
E.ae.	21.30 ± 0.50	n.a	n.a	n.a	9.66 ± 0.57
E.ag.	19.30 ± 1.15	n.a	n.a	n.a	8.33 ± 0.57
S.t.	25.67 ± 1.15	n.a	n.a	n.a	8.00 ± 0.50

Promedio de tres repeticiones, con una concentración de 2 mg/disco. Se utilizó como control positivo cloramfenicol 25 µg/disco y como control negativo cada uno de los solventes correspondientes (AcoEt y MeOH y para los aceites esenciales y hexano aceite de olivo estéril).

Nota: El extracto de metanol no presentó actividad sobre ninguno de los tipos bacterianos ensayados.

Los extractos de hexano, acetato de etilo y el extracto acuoso no fueron activos sobre: *Salmonella Typhi*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella boydii* ATCC 8700, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* Tor CDC V 23.

Los aceites esenciales no presentaron actividad sobre las bacterias *Shigella boydii* ATCC 8700, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* Tor CDC V 23.

Simbología: n.a = no presentó actividad

En el bioensayo preliminar el extracto metanólico no presentó actividad sobre las 14 cepas ensayadas; los extractos hexánicos y acuoso presentaron actividad contra bacterias gram positivas y gram negativas, por otra parte el extracto de acetato de etilo solo tuvo actividad contra *Bacillus subtilis*.

Los resultados obtenidos del análisis de varianza de dos factores (ANOVA bifactorial) se pueden observar en la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis de varianza de 2 factores.

Factores	F	P-nivel
Extractos	8.10	0.0089*
Bacteria	1.58	0.2153
Interacción	9.17	0.00041*

Como se observa en la Tabla 8, se puede afirmar que existen diferencias significativas (*) entre la actividad de los diferentes extractos ($P < 0.01$), y también hubo una interacción significativa entre el tipo de extracto y el tipo de bacteria.

Tabla 9. Prueba de Tukey

Extracto/Aceites	Bacterias	Media
Hexano	Gram negativas	7.66±0.70
	Gram positiva	10.08±2.27
Acuoso	Gram negativas	10.5±52.92
	Gram positiva	14.50±5.18
Aceites esenciales	Gram negativas	12.33±2.69
	Gram positiva	8.77±0.97

La prueba de Tukey mostró que en el caso de las bacterias Gram negativas, los aceites esenciales y el extracto acuoso fueron los de mayor actividad y el de menor actividad fue el extracto hexánico. En el caso de las bacterias Gram positivas, el extracto con mayor actividad fue el acuoso, con menor actividad el hexánico y los aceites esenciales (vease Tabla 9).

Para poder observar la actividad de los extractos contra los dos tipos bacterianos (Gram positivas y Gram negativas) se graficó el halo de inhibición del extracto contra la bacteria, obteniendo la figura 5, donde se puede observar que las bacterias Gram positivas fueron más sensibles al extracto acuoso y las Gram negativas a los aceites esenciales.

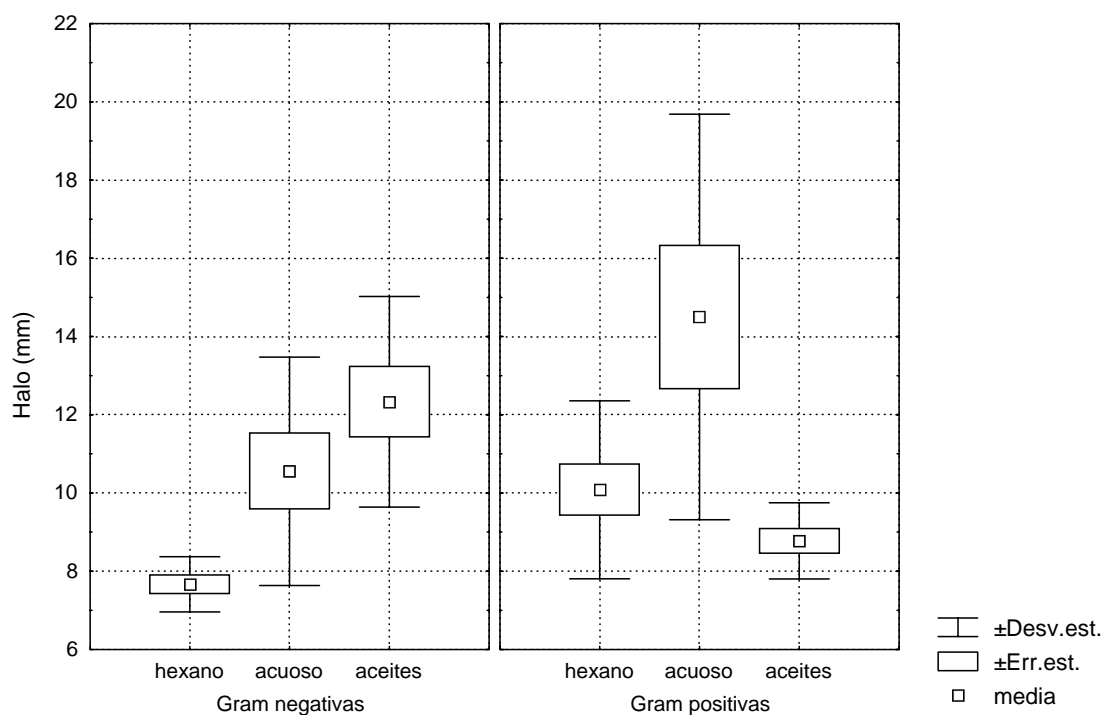


Figura 5. Actividad antibacteriana de *V. dentata*

Con este bioensayo se confirma que la mayor actividad antibacteriana se encuentra en los extractos hexánicos (Rocha, 2002), lo que puede indicar que el compuesto con mayor actividad es no polar.

II. Determinación de la mayor actividad antibacteriana en la planta (tallo, hoja y flor) y rendimiento de cada uno.

Los rendimientos de los sólidos concentrados a sequedad (del tallo, hoja y flor), se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Rendimiento obtenido de los diferentes extractos de *V. dentata*.

Extracto	Hexano	AcoEt	MeOH	Cantidad de planta utilizada (g.)
Hoja	14.94 g.	16.81 g.	78.20 g.	578.42
	2.58%	2.90%	13.51%	
Tallo	25.27 g.	20.07g.	149.81 g.	1376.832
	1.83%	1.45%	10.88%	
Flor	28.93 g.	11.96 g.	80.45g.	398.64
	7.25%	3.00%	13.90%	

En la Tabla 10 se puede observar que el extracto metanólico de flor tuvo mayor rendimiento (13.90%) y el rendimiento más bajo fue el extracto de tallo (1.45%) con el solvente de acetato de etilo.

Como se puede observar en la Tabla 11 los extractos que presentaron mayor actividad fueron los hexánicos de tallo y hoja contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, sin embargo este mismo extracto no presentó actividad contra las bacterias *Sarcina lutea* ni *Enterobacter aerogenes*; el extracto de acetato de etilo de flor únicamente presentó actividad sobre *Staphylococcus epidermidis*.

Tabla 11. Actividad antibacteriana de los extractos de las diferentes partes (hoja, tallo y flor) de *V. dentata*, “chimalacate”.

Microorganismo (La simbología esta presentada en la tabla 2)	Halos de inhibición (mm) de los extractos de <i>V. dentata</i> .						
	Control positivo	Hexano			Acetato de etilo		
		Tallo	Hoja	Flor	Tallo	Hoja	Flor
<i>S. e.</i>	27.00± 0.50	8.33±1.52	7.67± 0.57	6.66±0.57	7.33 ±0.57	7.66 ±1.52	12.00±0.50
<i>B.s.</i>	23.67 ±2.03	18.33 ±1.52	n.a.	12.66±0.57	n.a.	7.66±0.57	n.a.
<i>S.a.</i>	25.33 ±1.5	15.00±1.73	12.00±1.00	n.a.	n.a.	7.67 ±0.57	n.a.
<i>S.t</i>	25.67± 1.15	15.33 ±0.57	11.66±0.57	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>E.ag.</i>	19.33± 1.15	17.33±2.88	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>E.c.</i>	18.80± 0.34	9.33±0.57	12.66±0.57	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>S.b.</i>	19.33 ±0.58	n.a.	n.a.	8.33±1.52	8.00 ±1.00	13.33±1.00	n.a.
<i>Y.e.</i>	21.00 ±0.50	18.33 ±1.52	9.33 ±1.15	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<i>V.ch.Tor.</i>	26.00 ±0.50	n.a.	n.a.	7.00 ±0.50	11.66±0.57	10.66±1.15	n.a.
<i>V.ch.C.C.</i>	27.33± 2.33	7.66 ±1.00	12.66±1.15	8.00 ±0.50	11.33±0.57	11.33±0.57	n.a.
<i>V.ch.agua</i>	29.67 ±1.15	17.33± 2.88	n.a.	n.a.	n.a.	10.66±0.57	n.a.
<i>V.ch. No. 01</i>	30.00 ±0.82	16.00± 0.57	8.00 ±1.00	6.66 ±1.15	n.a.	9.33±0.57	n.a.

Se reportó el promedio de tres repeticiones.

Nota: el extracto de metanol no presentó actividad. Ninguno de los extractos presentaron actividad sobre las bacterias *Sarcina lutea* y *Enterobacter aerogenes*. Se utilizó como control positivo cloramfenicol (25 µg/disco) y como control negativo cada uno de los solventes correspondientes (acetato de etilo y metanol y aceite de olivo estéril para hexanos)

Simbología: n.a. = no presentó actividad.

Los resultados obtenidos del análisis de varianza de tres factores se pueden observar en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis de varianza.

Factores	F	P
Solvente	7.99*	0.0052*
Extracto	94.38*	0.0000*
Bacteria	0.41	0.5209
Solvente-extracto	9.42*	0.0001*
Solvente-bacteria	0.01	0.9113
Extracto-bacteria	0.22	0.7966
Extracto-Solvente-Bacteria	0.079	0.9237

En el análisis de varianza se puede afirmar que existen diferencias significativas (*) entre la actividad de los diferentes extractos, solventes y solvente -extractos ($P < 0.01$) (ver Tabla 12).

Tabla 13. Prueba de Tukey.

Solvente-Extracto-Bacteria	Media	Desviación estándar	Interacción		
			1	2	3
AcoEt-Tallo-Negativa	1.83	4.97	XXXX		
AcoEt-Tallo-Positiva	3.10	1.64	XXXX		
AcoEt-Hoja-Negativa	3.83	9.23	XXXX		
Hexano-Hoja-Negativa	4.91	7.39	XXXX		
Hexano-Hoja-positiva	5.43	5.71	XXXX		
AcoEt-Hoja-Positiva	5.53	5.40	XXXX		
Hexano-Tallo-Negativa	10.41*	4.97		XXXX*	
Hexano-Tallo-Positiva	12.13*	1.64		XXXX*	
AcoEt-Control-Positiva	24.36*	4.91			XXXX*
Hexano-Control-Negativa	24.38*	3.32			XXXX*
AcoEt-Control-Negativa	24.86*	5.91			XXXX*
Hexano-Control-Positiva	24.86*	4.06			XXXX*

Nota: Para realizar estas prueba se descartaron del estadístico los extractos de flor debido a que el extracto de acetato de etilo solamente presentó actividad en una bacteria (ver Tabla 7) y en caso de haberlo considerado produciría errores estándares demasiado grandes para los otros extractos.

Como se observa en la prueba de Tukey (Tabla 13) se puede afirmar que existen diferencias significativas (*) entre la actividad de los extractos, los solventes y los controles ($P < 0.05$).

Los extractos hexánicos de tallo fueron los únicos que mostraron diferencia significativa (*) en relación con los otros extractos, pero fue similar la actividad en cuanto al tipo de bacteria (Gram positiva o Gram negativa).

Para poder observar la sensibilidad de los extractos contra los dos tipos bacterianos se graficó el halo de inhibición del extracto contra la bacteria, obteniendo la siguiente figura:

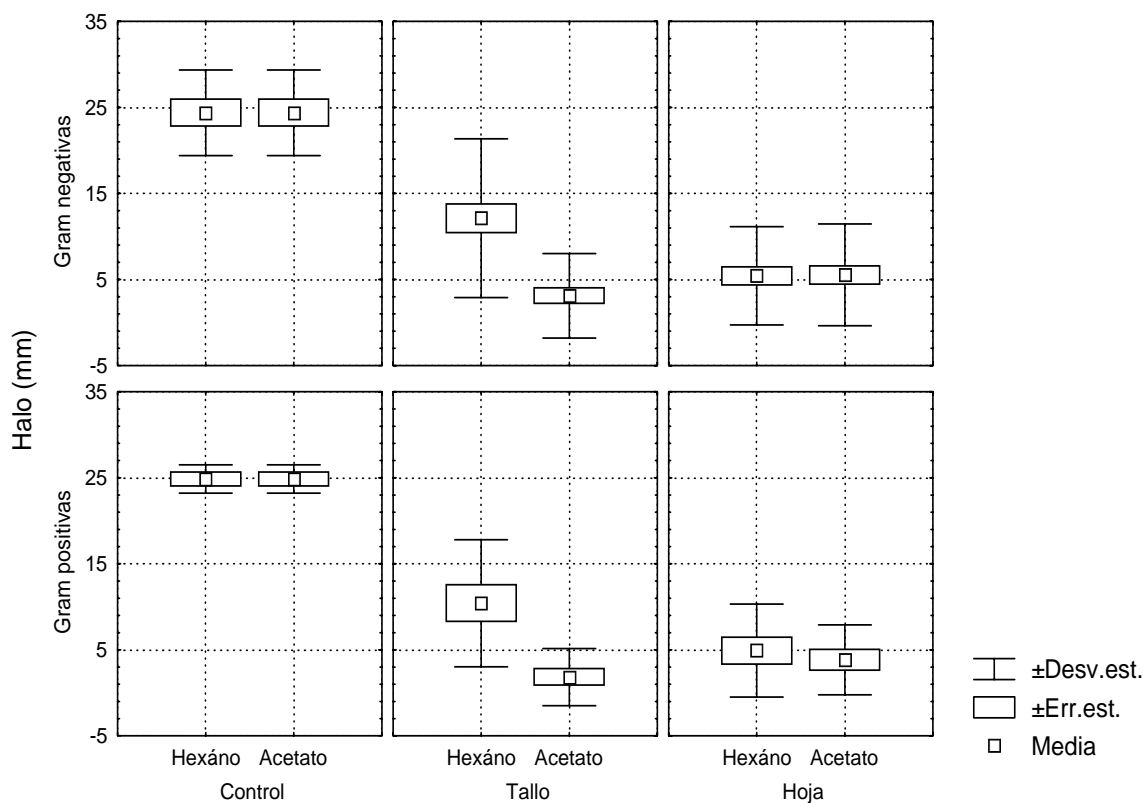


Figura 6. Actividad antibacteriana de los diferentes extractos de *V. dentata*.

En la figura 6 se puede observar que el extracto con mayor actividad fue el hexánico de tallo contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.

III. Aislamiento de los compuestos activos.

Una vez que se encontró que el extracto hexánico obtenido de tallo presentó la mayor actividad antibacteriana se realizaron las siguientes particiones:

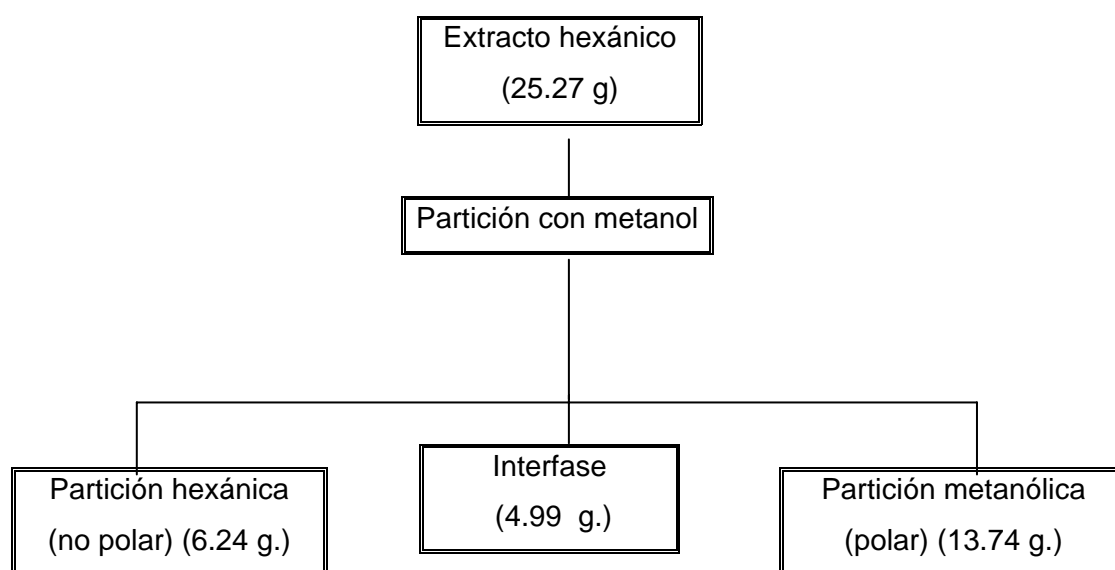


Diagrama 1. Particiones del extracto hexánico de tallo.

La actividad antibacteriana se evaluó contra una bacteria Gram positiva y una Gram negativa, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Actividad antibacteriana de las particiones del extracto hexánico de tallo.

Microorganismo (La simbología esta presentada en la tabla 2)	Control positivo	Partición hexánica	Interfase	Partición metanólica
<i>B.s.</i>	23.67±2.03	10.33±1.15	8.00±0.50	6.33±0.57
<i>V. ch. agua</i>	29.67±1.15	13.67±0.57	9.67±0.57	7.00±1.00

Halos de inhibición en mm. Datos obtenidos al realizar el bioensayo con cada una de las particiones del extracto hexánico de tallo, el resultado es el número promedio de tres repeticiones.

Los resultados obtenidos del análisis de varianza de dos factores se pueden observar en la Tabla 15.

Tabla 15. Análisis de varianza bifactorial de la partición hexánica de tallo.

Factores	F	P
Extracto	48.56	1.77×10^{-6}
Bacteria	18.06	0.0011
Interacción	3.06	0.084

Como se observa en la tabla 12 se puede afirmar que existen diferencias significativas en la actividad antibacteriana entre los extractos y también entre el tipo bacteriano (Gram positivas y Gram negativas).

Debido a que estadísticamente presentan diferencias significativas y se puede considerar que la particiones hexánicas fueron los extractos con mayor actividad, se realizó el aislamiento del principio activo con el extracto hexánico de tallo.

Se corrió una cromatografía en columna con la partición hexánica, de la columna se obtuvieron 325 fracciones de 100 ml cada una, se agruparon mediante cromatografía de placa fina, finalmente se obtuvieron 17 fracciones (Tabla 16).

Tabla 16. Fracciones obtenidas por cromatografía de columna de la partición hexánica de la planta *V. dentata*.

Fracción	Fracciones de la columna	Rendimiento mg	Rendimiento %	Fase móvil
1	1-16	21	0.015	98-2 Hexano- AcoEt
2	17-21	4	2.90×10^{-3}	95-5 Hexano-AcoEt
3	22-27	98	0.071	
4	28-47	150	0.0108	
5	48-59	1	7.26×10^{-4}	
6	60-82	55	0.039	
7	83-112	20	0.014	
8	113-124	1	7.26×10^{-4}	90-10 Hexano-AcoEt
9	125-129	12	8.71×10^{-3}	80-20 Hexano-AcoEt
10	130-132	4	2.90×10^{-3}	70-30 Hexano-AcoEt
11	133-156	32	0.023	
12	157-169	43	0.031	50-50 Hexano-AcoEt
13	170-184	3	2.17×10^{-3}	
14	185-187	13	9.44×10^{-3}	40-60 Hexano-AcoEt
15	188-209	11	7.98×10^{-3}	30-70 Hexano-AcoEt
16	210-234	38	0.027	10-90 Hexano-AcoEt
17	235	11	7.98×10^{-3}	MeOH

La actividad antibacteriana de las 17 fracciones fue evaluada con dos bacterias (una Gram positiva y una Gram negativa) (Tabla 17).

Tabla 17. Evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna de la partición hexánica de *V. dentata*.

Microorganismo (La simbología esta presentada en la tabla 2)	Control positivo	Fracciones obtenidas por cromatografía de columna									
		1	2	3	4	9	11	12	14	15	17
B.s.	23.67±2.03	6	6	7	7	7	7	7	14	n.a	n.a
V.ch. agua	29.67±1.15	10	10	11	9	12	14	n.a	n.a.	8	7

Nota: las fracciones 5, 6, 7, 8, 10, 13, 16, no presentaron actividad contra ninguna de las dos cepas bacterianas.

Simbología: n.a = no presentó actividad. Halos de inhibición (mm)

Se realizó esta evaluación para conocer que fracciones presentan actividad antibacteriana.

De la fracción 5 se obtuvieron cristales blancos con punto de fusión de 85-90 °C, no presentaron actividad, en base al punto de fusión podría considerarse al compuesto como cera.

Como la fracción 3 cristalizó y presentó una actividad antibacteriana considerable, se decidió determinar la estructura química del compuesto responsable de dicha actividad.

IV. Elucidación de la estructura.

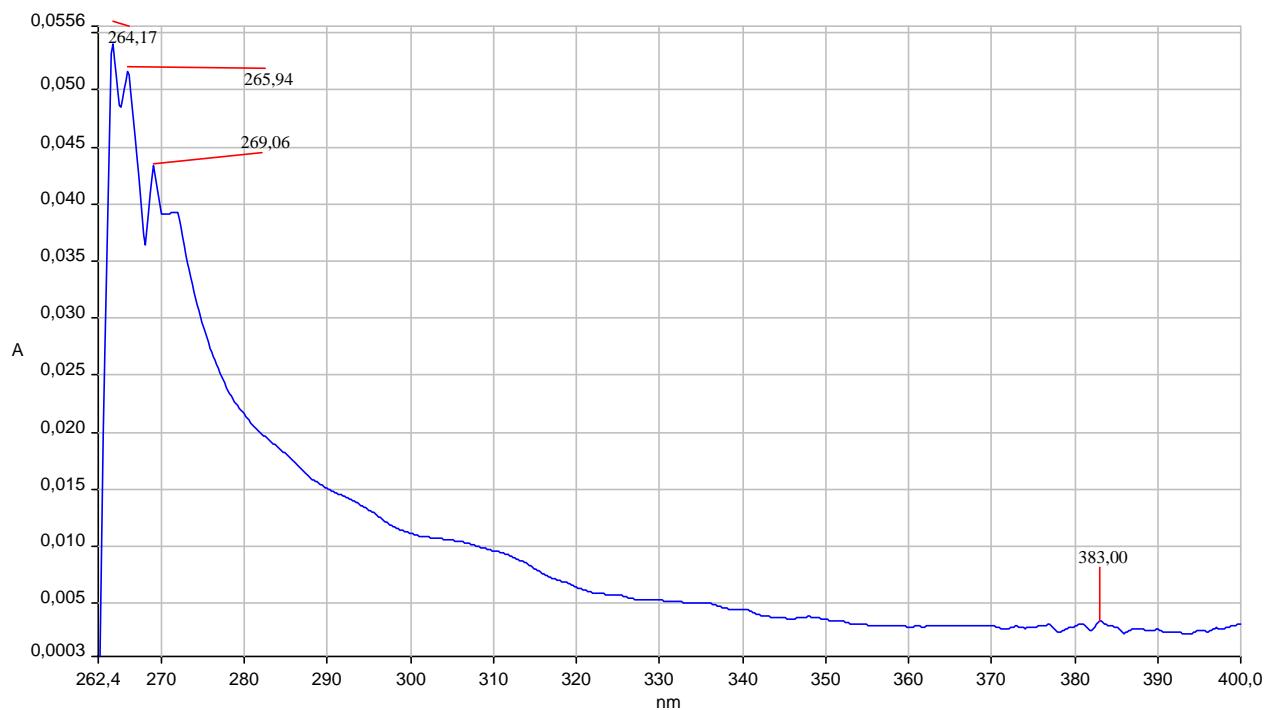
Se determinaron los siguientes parámetros: punto de fusión, fluorescencia UV, color, Rf (Tabla 18), espectro de absorción en el ultravioleta, infrarrojo, resonancia magnética nuclear de protones (RMN¹H), resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN¹³C).

Tabla 18. Parámetros de la fracción activa pura.

Punto de fusión	160-163 °C
Rf (fase móvil Hexano-AcoEt 95-5)	0.542
Fluorescencia UV revelada con sulfato sérico	264 nm
Color	Amarillo claro
Rendimiento	98 mg (0.071%)

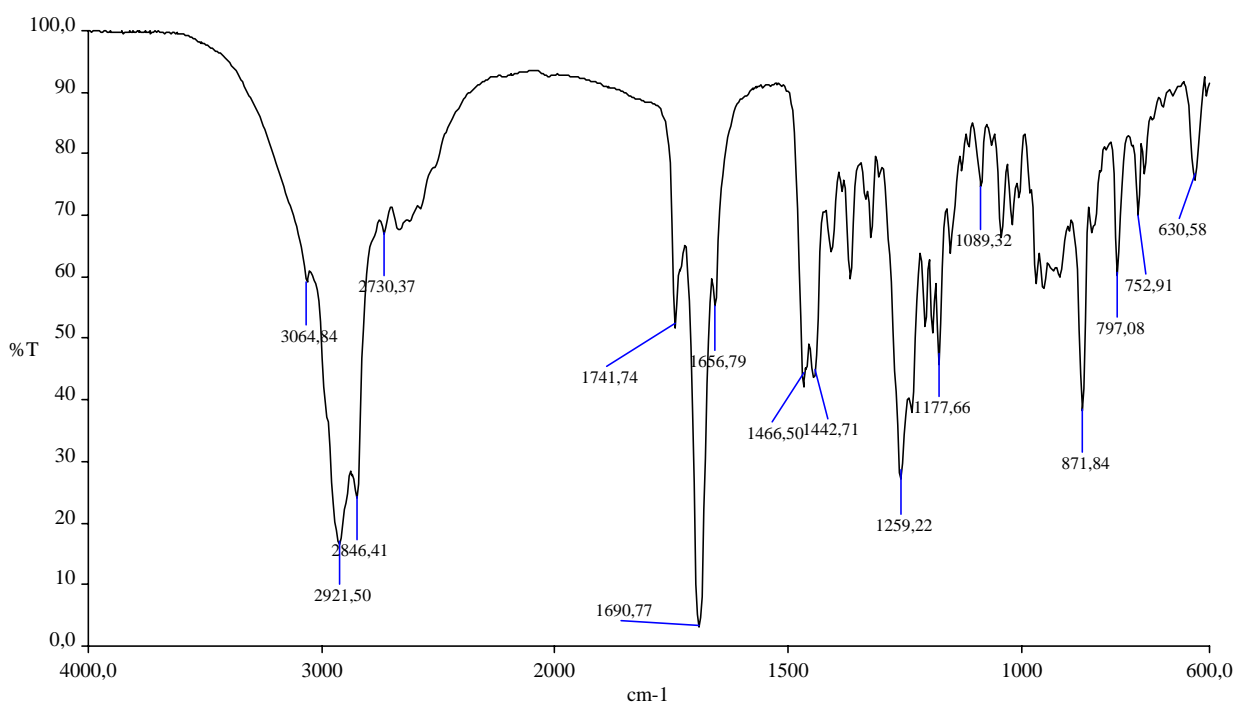
Como se observa en el cuadro anterior el punto de fusión fue de 160-163 °C, esto quiere decir que el compuesto tiene un grado de pureza aceptable ya que el rango de la temperatura de fusión es pequeño.

Figura 7. Espectro de absorción de UV del compuesto aislado de *V. dentata*.



Como se observa en el espectro de UV, el compuesto absorbe a 264.17, 265.94 y 269.06 nm., lo cual sugiere la presencia de terpenos, ya que estos presentan una absorción de 275 a 380 nm, aunque puede variar por efecto de los diferentes solventes, en el que se disuelve o se aísla el compuesto (Dey y Harbone, 1991).

Figura 8. Espectro de infrarrojo del compuesto aislado de *V. dentata*.



El análisis de espectroscopía de Infrarrojo muestra los principales grupos funcionales de la molécula. En la Tabla 19 se observa la presencia de las bandas de absorción del espectro de infrarrojo.

Tabla 19. Grupos funcionales asignables a las bandas de absorción del espectro de infrarrojo

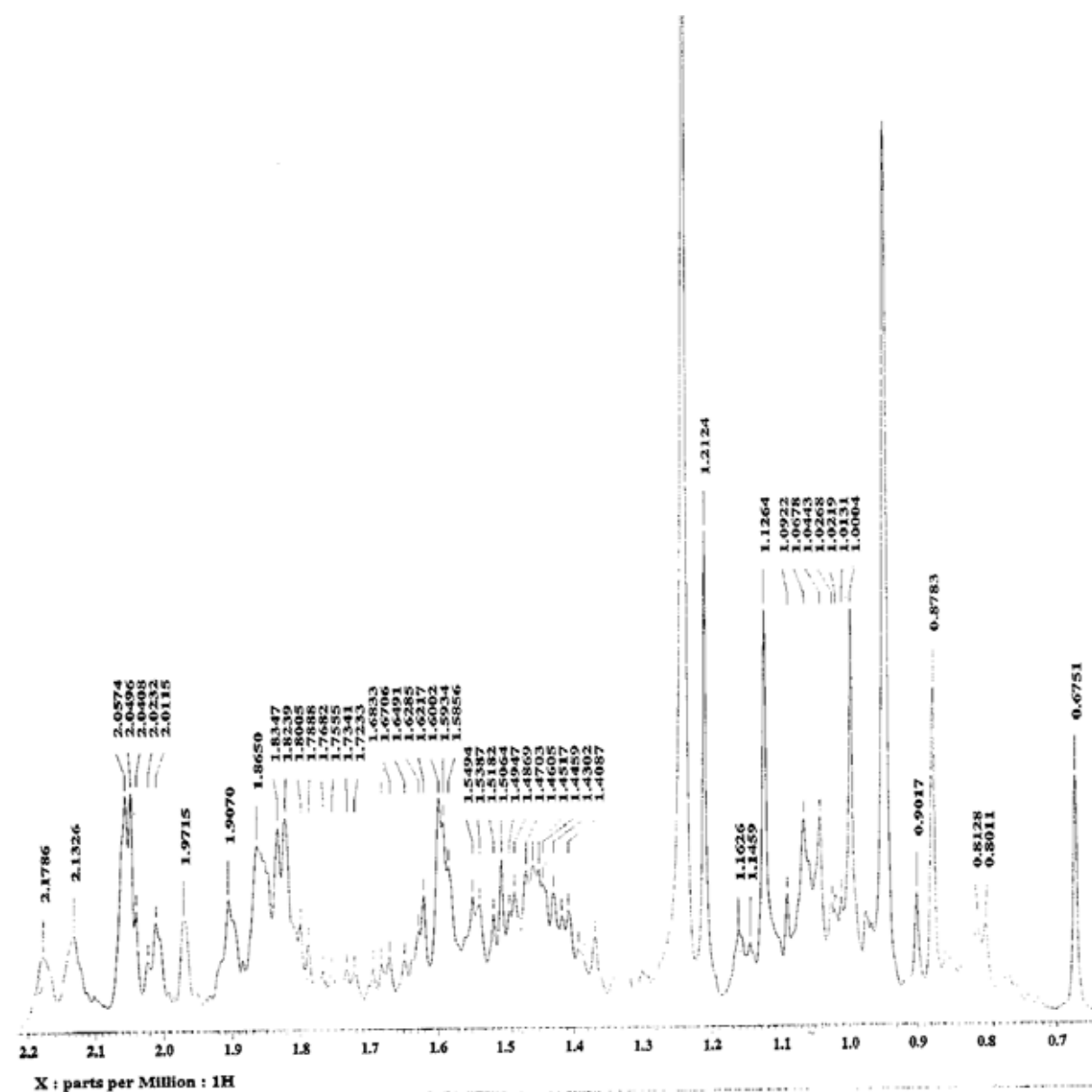
Bandas de absorción	Grupo funcional asignable
3064.84	OH de carboxilo
2921.50, 2846.41 y 2730.37	- CH, -CH ₂ y -CH ₃ grupos alquilo y grupos alcanos
1741.74	Ácido Carboxílico
1690.77 y 1656.79	Enlaces doble carbono (C=C)
1466.50 y 1442.71	Hidrocarburos con enlaces simples (C-C)

En 3064.84 se observa la señal del grupo OH de carboxilo, cuando el enlace de hidrógeno existe en pequeña cantidad (o no tiene importancia), se observa un pico de OH más angosto y menos intenso.

Los enlaces entre átomos de carbonos sp^2 (C=C) dan lugar a absorciones características de intensidad variable, entre 1600 y 1700 cm^{-1} .

Los enlaces entre átomos de carbono sp^3 (enlaces simples C-C) en anillos aromáticos dan lugar a absorciones débiles en el infrarrojo ($2921, 50, 2846.41$ y 2730.37 cm^{-1}), la confirmación de estos se observa a 1466.50 y 1442.71 cm^{-1} . En 1741.74 se observa la señal del carbonilo de ácido.

Figura 9. Espectro de RMN¹H del compuesto aislado de *Viguiera dentata*



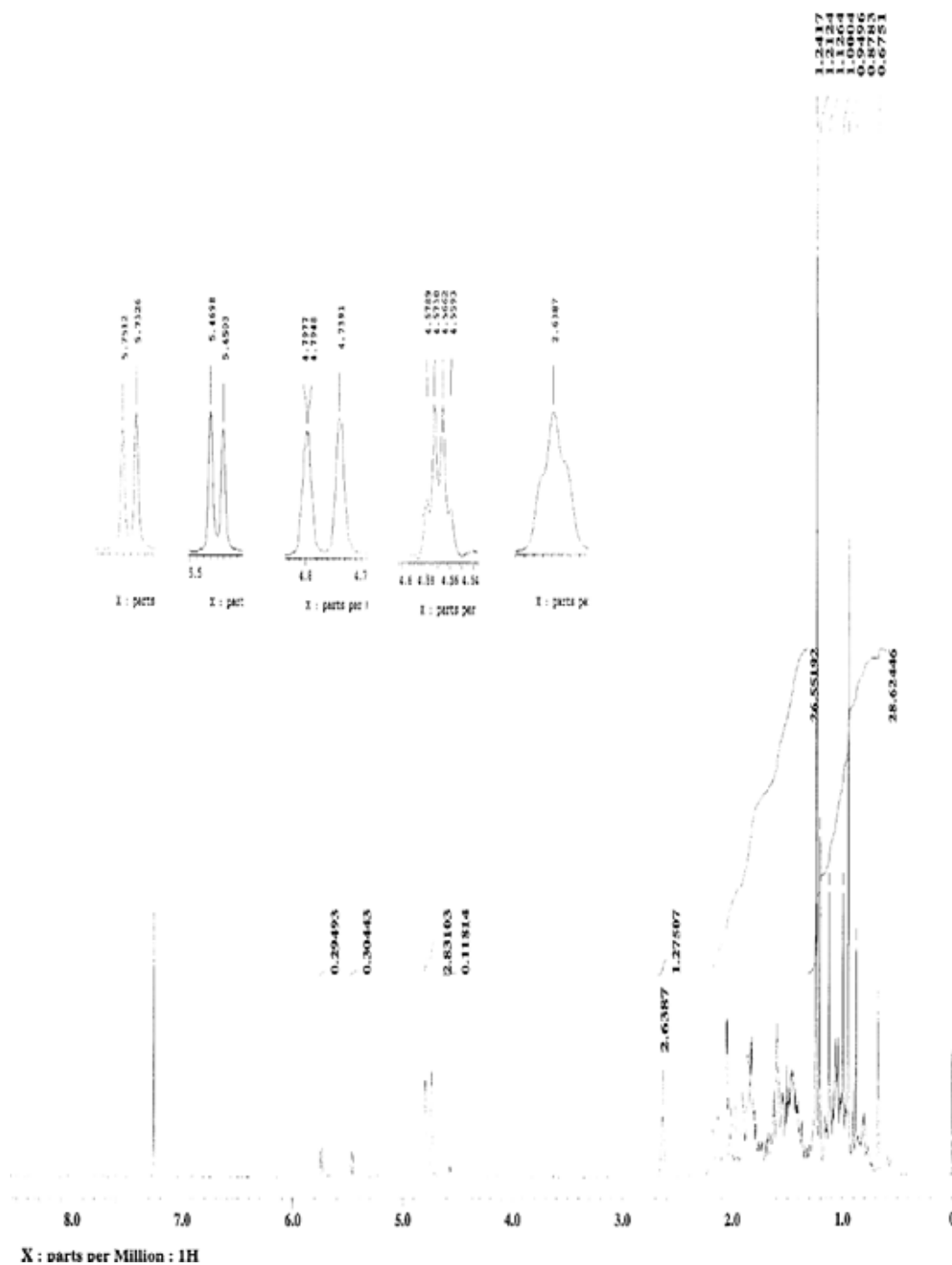


Figura 9. Espectro de RMN¹H del compuesto aislado de *Viguiera dentata* continuación.

El espectro de resonancia magnética nuclear de hidrogeno, permitió conocer las diferentes señales de resonancia de cada protón (H') para ubicar a cada

uno de ellos en la conformación espacial de la molécula, en el cual se presentaron las siguientes señales:

De 5.7512 a 5.4503 se puede observar la señal de los protones vinílico con respecto a otro = 5.74 (d, J=5.58) y =5.46 (d, J=5.85).

Entre las señales 4.7977 a 4.7391 se observa el protón del carbono 5 = 4.76 (1H,d, J=15) la señal de protón del carbono 6 se observa como un cuadruplete 4.57 (d,d, J₁=3.81; J₂= 1.77).

En 2.87 (triplete) se tiene la señal del protón del carbono 13; finalmente en 2.1786 a 2.0115 se tienen las señales de los protones alquílicos. En la Tabla 20 se puede observar el resumen de los principales desplazamientos químicos encontrados.

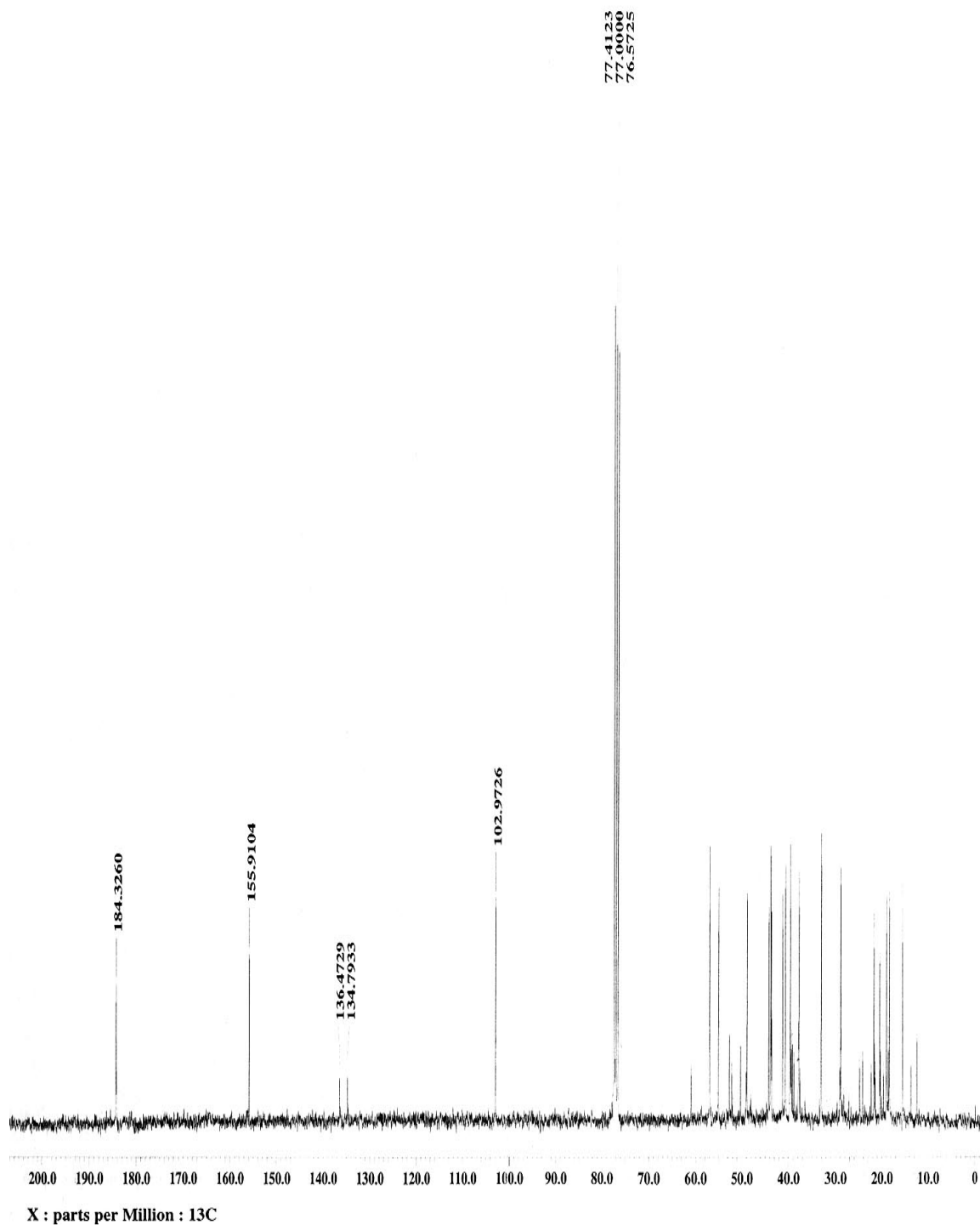
Tabla 20. Desplazamientos químicos observados en el espectro de RMN¹H del compuesto activo puro de *V. dentata*

Desplazamiento (ppm)	Integración	Multiplicidad	Acoplamiento J	Grupo
5.7512 5.74 5.46 5.4503	1H 1H	d d	5.58 5.85	Vinílicos
4.7977 4.76 4.7391	1H	d	15	Alquílico
4.57	1H	c	3.81 1.77	Alquílico
2.6387	1H	t		Alquílico
2.1786 2.0115	1H	s		Alquílico

De 5.7512 a 5.4503 se puede observar la señal de los protones vinílicos con respecto a otro =5.74 (d, J= 5.58) y = 5.46 (d, J=5.85).Entre las señales 4.7977 a 4.7391 se observa el protón del carbono 4.76 (1H, d, J=15) la señal del

protón del carbono seis se observa como un doble de dobles 4.57 (d d $J_1 = 3.81$; $J_2 = 1.77$).

Figura 10. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono¹³ del compuesto aislado de *Viguiera dentata*.



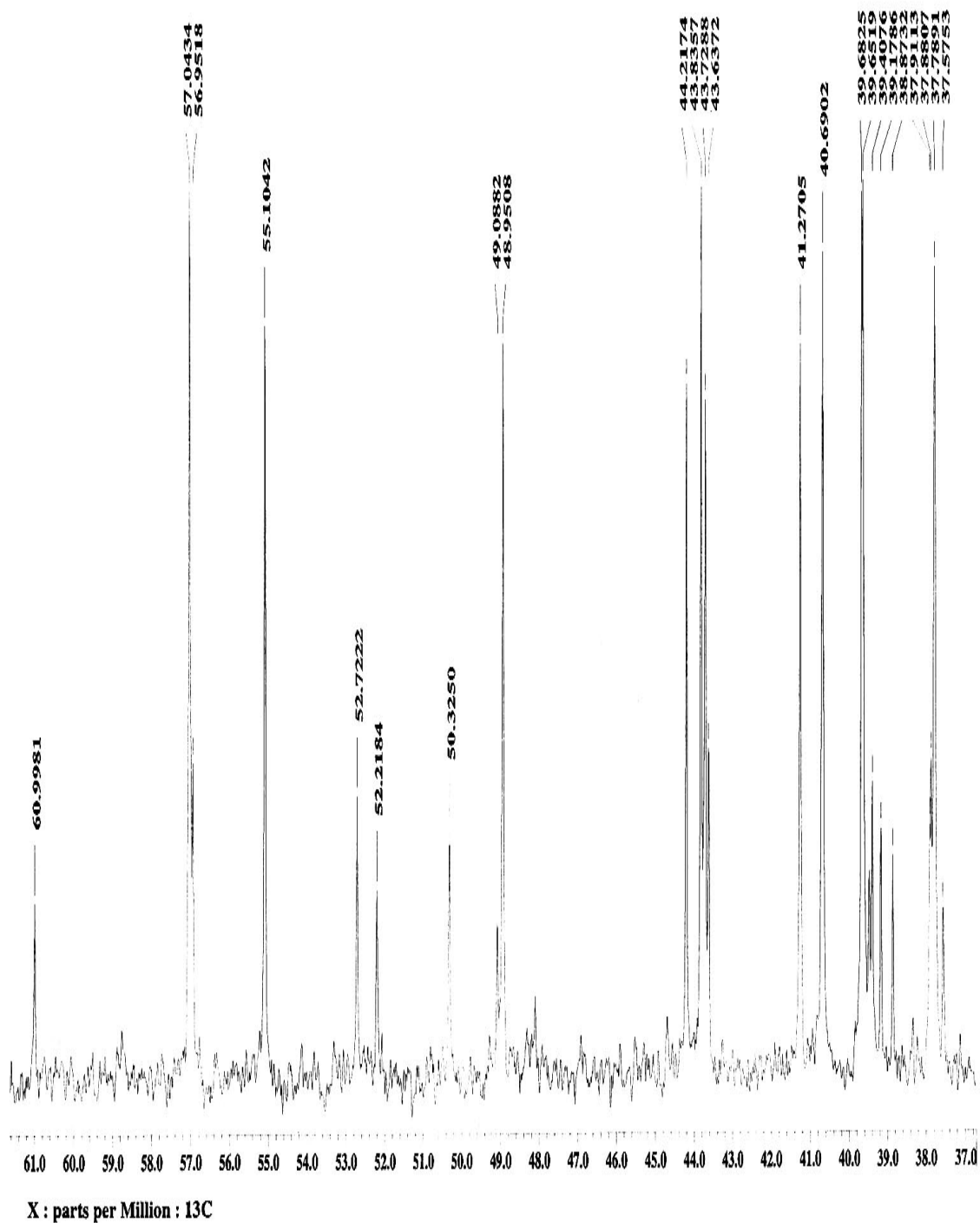


Figura 10. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono¹³ del compuesto aislado de *Viguiera dentata* continuación.

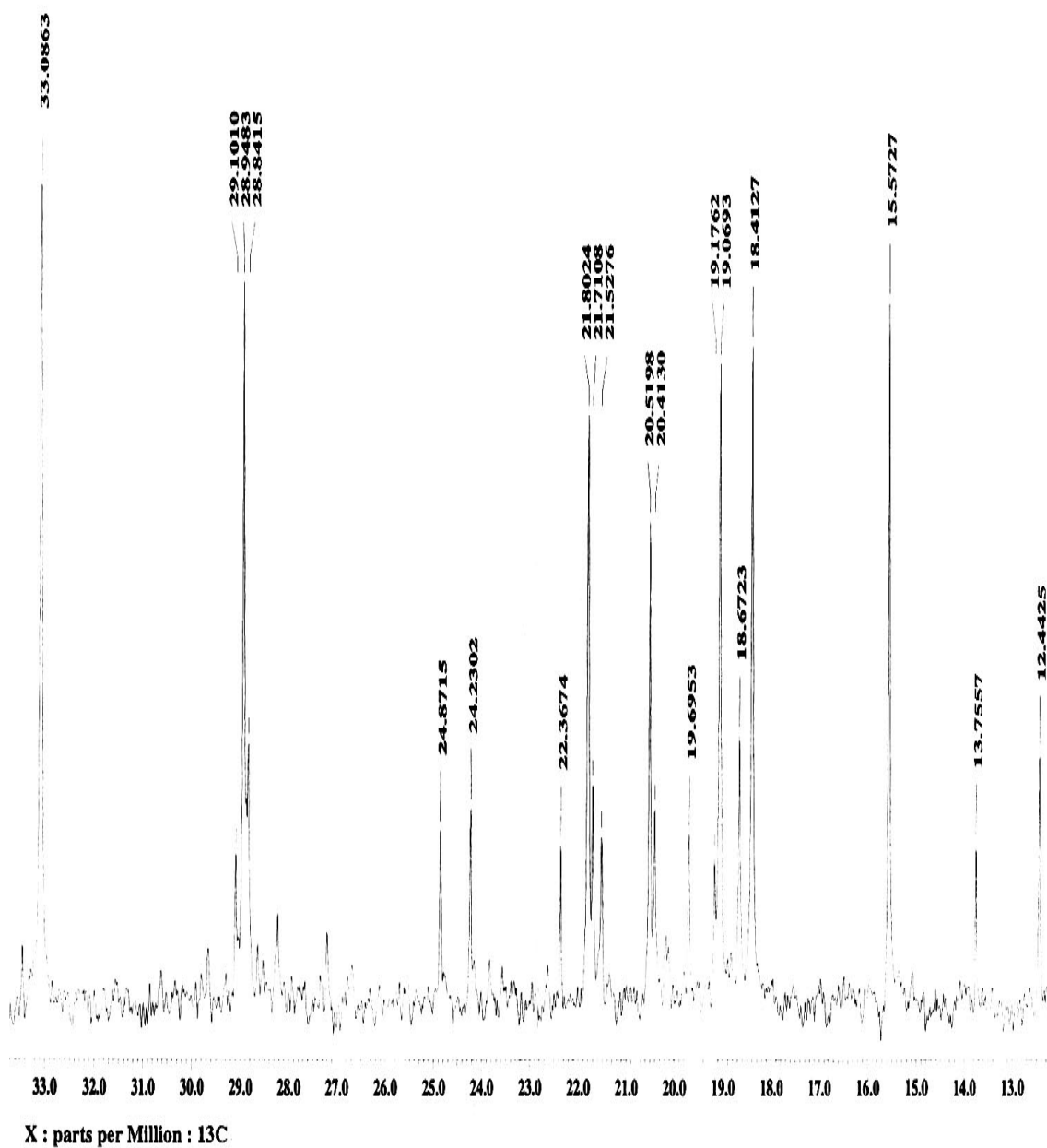
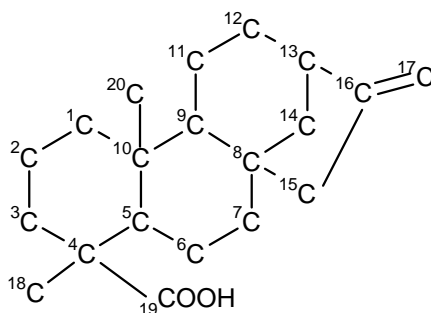


Figura 10. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono¹³ del compuesto aislado de *Viguiera dentata* continuación.

El espectro de resonancia magnética nuclear de carbono¹³ nos indica las señales de resonancia de cada carbono que forma parte de la estructura de la molécula.

Tabla 21 .Asignación de los desplazamientos del ¹³C-NMR (ppm) del compuesto aislado de *V. dentata*.



Carbonos asignables	¹³ C-NMR señales químicas (ppm) del compuesto aislado de <i>V. dentata</i> .
C-1	40.6
C-2	19.6
C-3	38.8
C-4	43.8
C-5	57.04
C-6	22.3
C-7	41.2
C-8	48.9
C-9	55.1
C-10	39.6
C-11	18.6
C-12	33.08
C-13	44.2
C-14	39.6
C-15	49.02
C-16	155.9
C-17	102.9
C-18	29.1
C-19	189.3
C-20	15.5

Se compararon los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono ¹³ obtenidos del espectro del ácido ent-Kaur-16-en-19-oico (Dey y Harbone, 1991)

Tabla 22. Comparación del ¹³C-NMR del compuesto aislado de *V. dentata*.

CARBONOS ASIGNABLES	A= ¹³ C-NMR señales químicas (ppm) del ácido kaurenico-16-en-19-oico.	B= ¹³ C-NMR señales químicas (ppm) del compuesto aislado de <i>V. dentata</i> .
C-1	41.1	40.6
C-2	19.8	19.6
C-3	38.6	38.8
C-4	43.8	43.8
C-5	57.1	57.04
C-6	22.5	22.3
C-7	41.5	41.2
C-8	44.4	48.9
C-9	55.2	55.1
C-10	39.9	39.6
C-11	18.6	18.6
C-12	33.3	33.08
C-13	44.2	44.2
C-14	39.9	39.6
C-15	49.2	49.02
C-16	155.7	155.9
C-17	103.5	102.9
C-18	29.3	29.1
C-19	179.9	189.3
C-20	16.0	15.5

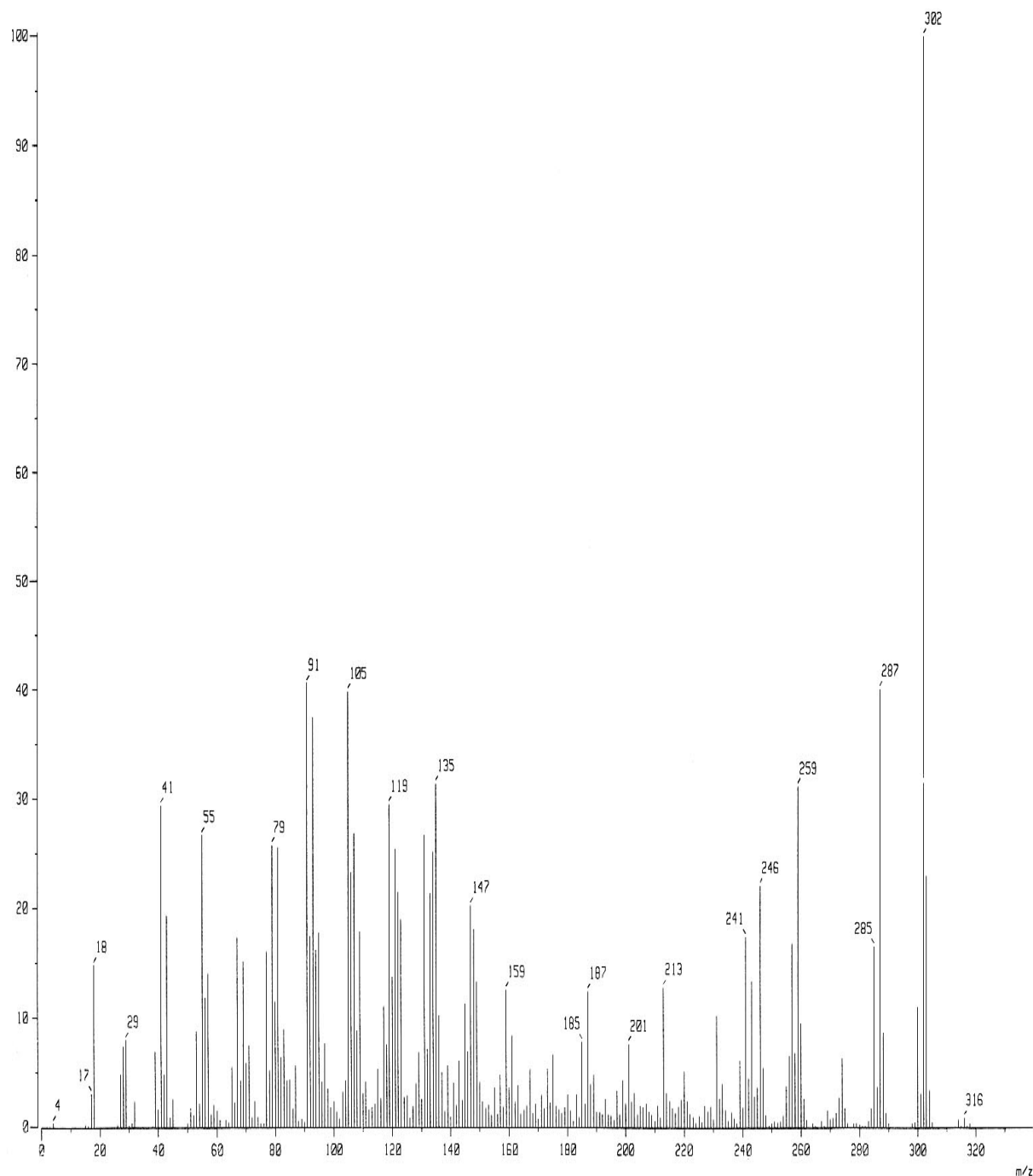
En el espectro de masas (Figura 11) se observa que el ion molecular del compuesto es de 302 e/z, el cual coincide con el del ácido ent-Kaur-16-en-19-oico (C₂₀H₃₀O₂). Por lo que se decidió comparar el Peso Molecular y los picos principales del ácido kaurenico con las señales obtenidas del compuesto aislado (Tabla 23).

Tabla 23. Comparación de las señales obtenidas del espectro de masas del compuesto aislado de *V. dentata* con los picos principales del espectro de masas del ácido kaurenico.

Compuesto aislado de <i>V. dentata</i>	Ácido kaurenico (Mitscher et al., 1983)
302	302
287	287
259	259
241	241
213	213
187	187
159	159
147	147
135	133
119	131
105	105
91	91

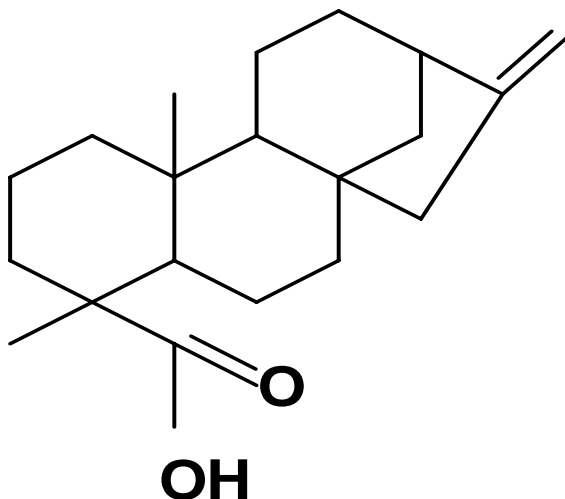
Como se puede observar en la Tabla 23 las señales del compuesto aislado corresponden al ácido kaurenico.

Figura 11. Espectro de masas del compuesto con actividad antibacteriana aislado de *V. dentata*



Con las constantes espectroscópicas registradas con los espectros de UV, RMN¹H RMN¹³C y de masas, se llegó a la determinación de la estructura química del compuesto con actividad antibacteriana, el cuál fue el ácido kaurenoico (ácido ent-Kaur-16-en19-oico), cuya fórmula se muestra en la figura 12.

Figura 12. Estructura propuesta del compuesto aislado de *Viguiera dentata* (Cav.) Sprengel responsable de la actividad antibacteriana.



Estructura que corresponde al compuesto ácido ent-Kaur-16-en-19-oico, con fórmula condensada $C_{20}H_{30}O_2$, y un peso molecular de 302.

V. Determinación de MIC y CBM del compuesto activo aislado de la planta *Viguiera dentata*.

En la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Bactericida Mínima (CBM), se utilizó la microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1985). Utilizando las 14 cepas bacterianas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) del compuesto activo puro.

Cepas bacterianas	CMI []mg/ml	CBM []mg/ml
<i>B.s.</i>	0.125	0.25
<i>S.e.</i>	0.250	0.375
<i>S.l</i>	0.125	0.25
<i>S.a</i>	0.250	0.375
<i>E.c.</i>	0.75	2.0
<i>V.ch. cc</i>	2.0	>2.0
<i>V. ch. agua</i>	0.75	1.5
<i>V.ch. Tor</i>	0.75	1.5
<i>V.ch. no.01</i>	0.375	0.75
<i>S.b.</i>	0.250	0.375
<i>S.t.</i>	1.5	2.0
<i>E. ae.</i>	2.0	>2.0
<i>E. ag.</i>	2.0	>2.0
<i>Y.e.</i>	1.0	2.0

Simbología: > = mayor

CMI= concentración Mínima Inhibitoria

CBM= Concentración Bactericida Mínima.

En la Tabla 24 se muestra que la bacteria *Bacillus subtilis* fue más sensible que la bacteria de *Vibrio cholerae* aislado de agua contaminada puesto que los valores de CMI fluctúan entre 0.25 y 0.5 mg/ml; el valor de CBM es de 0.5 mg/ml para esta bacteria, cabe mencionar que ambos valores de MIC y CBM para estas cepas se encuentran muy cercanos entre si. También se muestran los valores para la bacteria de *Vibrio cholerae* aislada de agua contaminada la cual fue mayor el valor para MIC de 1.00 mg/ml y para CBM fue mayor de 2 mg/ml.

Concluido el aislamiento de uno de los principios activos de la planta, se decidió evaluar sí el compuesto inhibía el crecimiento de la levadura *Candida*

albicans. Pero al realizar el bioensayo, el principio activo no presentó actividad antifúngica sobre la levadura ensayada.

Se decidió comparar el rendimiento del ácido kaurenico (Tabla 18) con el rendimiento obtenido de otras especies de *Viguiera* (Tabla 25).

Tabla 25. Rendimiento del ácido kaurenico en algunas especies del género *Viguiera*.

Especie	Rendimiento %	Localidad	Otros datos	Referencia
<i>V. decurrens</i>	0.1151	Chihuahua	mp170-174°C, 100:0:0 hexano, percolación	Marquina, 2001
<i>V. hypargyrea</i>	0.32	Durango	Hexano-acetato 9:1 CH ₂ Cl ₂ -Me ₂ CO 98:2	Alvarez <i>et al.</i> , 1985
<i>V. hyparhyrea</i>	Raíz: 0.02	Durango	Hexano- EtOAc 9:1 Rf 0.65 m.p.165-167 °C; 44.8° , CHCl ₃	Zamilpa <i>et al.</i> , 2001
<i>V. bishoppii</i>	Raíz: 0.08.	Bolivia	Et ₂ O-petrol 1:10	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981
<i>V. procumbens</i>	Raíz: 0.91 Aéreas:0.086	Bolivia	Et ₂ O-petrol 1:10	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981
<i>V. lanceolata</i>	Raíz: 0.08 Aéreas: 0.028	Bolivia	Et ₂ O-petrol 1:10	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981
<i>V.pazensis</i>	Aéreas: 0.011	Bolivia	Et ₂ O-petrol 1:10	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981
<i>V. incana</i>	Aéreas: 0.13	Ecuador	Et ₂ O-petrol 1:10	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981
<i>V. dentata</i>	Raíz: 2.21 Aérea: 0.42	Bolivia		Bohlmann <i>et al.</i> , 1981
<i>V. dentata</i>	Aéreas: 1.28	Chiapas	Columna hexano- CH ₂ Cl ₂ -MeOH(7:4:1)	Gao <i>et al.</i> , 1985
<i>V. dentata</i>	Aéreas: 0.071	San Rafael Coxcatlán, Puebla.	m.p.160-163°C, Rf= 0.542, Hexano-AcoEt 95-5	Tabla 15

En la Tabla 18 y 25 se muestra el rendimiento del ácido kaurenico en diferentes especies del género *Viguiera* y se observa gran diferencia en el rendimiento del compuesto según la especie y la parte de la planta de que fue aislado.

DISCUSIÓN

I.-OBTENCIÓN Y DATOS GENERALES DE LA PLANTA

Se colectó la planta en su época de crecimiento, que comprendió entre los meses de octubre y noviembre del 2001, ya que la acumulación de gran parte de los metabolitos secundarios, producidos por las plantas superiores, parece ser regulada durante el desarrollo y puede responder a señales tanto internas como externas (Flores *et al.*, 1989). Entonces la época de colecta es un factor importante para el estudio de las plantas medicinales, pues se ha comprobado que las plantas biosintetizan metabolitos secundarios en diferentes fases de su desarrollo y en diferentes estaciones del año en relación directa a los cambios medioambientales.

Se utilizó el criterio etnobotánico para la elección de la especie puesto que es de gran importancia en la medicina tradicional de nuestro país que se ha ido perdiendo, por los fuertes procesos de aculturización y pérdida de interés tradicional por las nuevas generaciones (Cervantes y Valdés 1990). Así el tener una investigación etnobotánica como antecedente juega un papel básico y fundamental en la metodología de esta investigación así la realización de estos estudios (etnobotánica, bioquímica vegetal y fitoquímica) pueden indicarnos la ruta de aislamiento y síntesis más rápida y económica de compuestos fitoquímicos de interés comercial que pueden ser más económicos. Es necesario rescatar el conocimiento tradicional de las plantas medicinales sistematizar dicha información, extrapolarlo con los estudios químicos y fitoquímicos que se le han realizado a las plantas esto permite tener modelos estructurales en base a la relación estructura química-actividad, asimismo no sólo se conoce la utilización de la planta sino la posible relación biológica y química que tiene la planta y esta con otras con las que aparentemente no tiene ninguna conexión taxonómica.

II.- Bioensayos preliminares

Para realizar el estudio preliminar se utilizó el método de percolación ya que es un método eficiente y rápido en comparación con otros métodos de separación de compuestos, como por ejemplo maceración, tinturas, reducción, de cocción, infusión (Soriano, 1994), que requieren de diversas metodologías por ejemplo: unas requieren de calor, pero se pueden perder compuestos volátiles de bajo peso al hervir, otras se dejan reposar en alcohol u otro solvente durante 7 a 14 días según la planta por lo tanto se requiere de mucho tiempo para poder extraer los compuesto y más tiempo, si se requieren de distinta polaridad (baja a alta polaridad) además la mayoría se debe de filtrar (ápendice 1).

Se preparó un extracto acuoso ya que estudios etnobotánicos previos (Rosas 2003; Canales en proceso) mencionan que en la zona utilizan la planta por medio de infusiones, baños y cataplasma (Tabla 3) así justificar el uso del el extracto acuoso, compararlo contra los extractos de diferente polaridad y verificar si el extracto hexánico presenta la mayor actividad antibacteriana (Rocha, 2002).

Viguiera dentata es una planta que contiene aceites esenciales que le confiere un olor agradable, especialmente cuando está fresca; los componentes de los aceites esenciales no sólo poseen aromas agradables sino que con frecuencia tienen propiedades biológicas interesantes (Gros *et al.*, 1985; Dey y Harborne (1991); Harborne 1993), por lo que se decidió determinar la actividad antibacteriana.

Se obtuvo un rendimiento de 0.202 % de los aceites esenciales este resultado concuerda con lo mencionado por Bruneton (1991), cuantitativamente, los contenidos en aceites esencial son muy bajos, normalmente inferiores al 1 %, además la concentración de varios ingredientes en aceites esenciales en las mismas especies de plantas puede variar por la ecología, (factores del entorno, las condiciones climáticas y la naturaleza del suelo), también los factores de crecimiento de la planta influyen directamente en la producción de aceites (Deans y Svoboda, 1989; Wang y Yin, 1991; Yin, 1991).

El mayor rendimiento (Tabla 6) lo obtuvo el extracto de metanol y el menor rendimiento el de acetato de etilo. Las plantas producen compuestos secundarios que las protegen contra los ataques de hongos, bacterias e insectos (Coley *et al.*, 1985; Harborne, 1988). La pared celular vegetal presenta una barrera contra la entrada en el citoplasma de organismos potencialmente patógenos, así cuando se ven expuestas al ataque por microorganismos, hay una interacción considerable de moléculas de origen microbiano vegetal defensivas, (Margalef, 1977; Azcon-Bieto *et al.*, 1993) por tanto existe una particular resistencia inducida (Margalef, 1977) se sabe que al tener esta interacción la planta produce estos metabolitos que pueden explicar junto con otros factores ambientales el porque se obtiene mayor o menor rendimiento de los extractos o el porque se encuentran ciertos compuestos (Flores *et al.*, 1989).

El extracto metanólico no presentó actividad contra ninguna de las 14 cepas bacterianas, el extracto de acetato de etilo únicamente fue activo contra la bacteria *Bacillus subtilis* (Tabla 7); el extracto hexánico y el extracto acuoso tienen mayor actividad contra la bacteria *Bacillus subtilis*. El extracto acuoso no presentó actividad contra *Sarcina lutea* en comparación con el extracto hexánico y los aceites esenciales, probablemente al realizar la liofilización, el extracto acuoso contenía compuestos pequeños que se pudieron volatilizar puesto que esta técnica se hace a presión reducida y alto vacío, tal vez algunos de estos compuestos tenían o actuaban junto con otro compuesto (sinergismo) en la inhibición de *Sarcina lutea*; por lo que se recomienda extraer estos compuestos con algún otro solvente. El hecho de que el extracto metanólico no presente actividad antibacteriana y el extracto acuoso sí presente y los dos extractos son polares, radica en la diferente forma que se obtuvieron y los posibles compuestos que contiene cada uno, el extracto acuoso se realizó mediante la técnica de infusión (apéndice 1) así el extracto contiene todos los compuestos presentes en la planta (compuestos de baja a alta polaridad) y el extracto metanólico se realizó mediante la técnica de percolación (apéndice 4) empezando desde polaridad baja a alta (hexano a metanol) así el extracto metanólico únicamente contiene compuestos polares además este

procedimiento se realiza en frío y el de infusión requiere calor esto hace que el extracto contenga compuestos de polaridad baja y de bajo peso molecular y el otro no.

Al comparar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales se encontró la presencia de halos de inhibición en las mismas bacterias que presenta el extracto acuoso y el extracto hexánico pero con la gran diferencia de presentar actividad con cuatro bacterias más: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans* y *Salmonella typhi* (bacterias gram negativas).

Al comprobar que los aceites esenciales de la planta *Viguiera dentata*, presentaron actividad antibacteriana, probablemente al realizar la extracción por arrastre de vapor se aislaron monoterpenos hidrocarburos, alcoholes o cetonas que son los mayores constituyentes de los aceites (Gros *et al.*, 1985) y podría ser uno o varios de estos compuestos lo (s) responsable(s) de la actividad antibacteriana que se presenta; ya que algunos monoterpenos y compuestos fenólicos de bajo peso molecular presentes en los aceites esenciales de las plantas poseen una actividad antimicrobiana inespecífica puesto que tienen la capacidad de disolver las membranas celulares, con esto, se produce un efecto similar al de la lisis bacteriana provocada mediante enzimas líticas (lisozimas) o por tratamiento con disolventes orgánicos (Harvey, 1982) este efecto es observado especialmente en bacterias gram negativas (Kubo, 1993) esto es concuerda con los resultados que obtuvimos para aceites esenciales (Tabla 7 y 9)

Son de gran importancia los terpenos que se puedan encontrar en los aceites esenciales pues tienen diversas funciones en la planta, como la inhibición de hongos y bacterias, emiten señales de atracción o repelación influyendo en la depredación de la planta; así como en el fenómeno de alelopatía donde inhibe la germinación de otras especies competitivas (Crawford, 1989; Harborne, 1993).

Los extractos acuosos y hexánicos presentaron menor actividad en las bacterias gram negativas esto era de esperarse pues generalmente estas

bacterias son más resistentes que las bacterias gram positivas (Pa *et al.*, 195; Vlietinck *et al.*, 1995; Kudi *et al.*, 1999).

Al observar que no existe mucha diferencias significativas entre el extracto acuoso y el extracto hexánico, este último extracto nos hace pensar como ya se había mencionado que la actividad se debe principalmente a la presencia de compuestos poco polares además de que el extracto de hexanos es una fracción y el extracto acuoso concentra todos los compuestos de la planta. Para separar y purificar el compuesto con actividad es más fácil aislarlo de una fracción que de un extracto que contiene muchos compuestos de diferente polaridad.

Al separar la planta y evaluar la actividad antibacteriana de los diferentes extractos, los hexánico presentaban mayor actividad contra más bacterias (Tabla 11); pero esto no sólo se observó para esto sino para todos los demás extractos, la actividad contra diferentes bacterias tanto gram positivas como contra bacterias gram negativas aumenta conforme se separan las diferentes partes de la planta.

Al realizar el análisis de varianza de la actividad antibacteriana se esperaba encontrar la mayor actividad en los extractos de hoja ya que el estudio etnobotánico refiere que son precisamente las hojas tiernas las que usa la gente en San Rafael Coxcatlán, sin embargo se encontró que la mayor actividad la presenta el extracto de tallo (Tabla 11). En la zona de estudio utilizan la hoja joven de la planta pero al utilizarla llevan parte del tallo (Canales comunicación personal) por lo que el empleo de esta planta resulta eficaz.

La actividad encontrada en tallo y en hojas puede deberse a que el transporte de sustancias orgánicas es consecuencia de la especialización funcional que son distribuidos desde las zonas de síntesis (hojas) o de almacenamiento (parénquimas reservantes) a todos los órganos de la planta, donde son necesarios para el metabolismo y el crecimiento; las hojas en desarrollo reciben la mayor parte de los metabolitos desde las hojas adultas situadas en la región apical de la planta, mientras las raíces los reciben desde las hojas

más basales; esto se realiza en el floema mediante el paso obligatorio del tallo (corteza)(Azcon-Bieto *et al.*, 1996), entonces en el tallo se encuentra la mayor concentración del compuesto responsable de la actividad.

También se sabe que los productos secundarios al sintetizarse se encuentran en tejidos específicos en la planta completa, la síntesis se lleva a cabo en la fase estacionaria; así la expresión de las vías de síntesis de los metabolitos secundarios en las plantas generalmente se encuentran en tejidos específicos (etapas particulares de su desarrollo), pero también la acumulación de gran parte de los metabolitos secundarios, parece ser regulada durante el desarrollo (Flores *et al.*, 1989).

III. Aislamiento de los compuestos activos.

Al realizar la cromatografía se observó que la fracción 5 cristalizó, no presentó actividad pero presenta un color blanco y un punto de fusión bajo (85-90 °C), característico de las ceras y puede ser considerado como tal debido a que las ceras se encuentran depositadas sobre las paredes externas de las células epidérmicas de las partes aéreas de las plantas (tallos y hojas principalmente) (Romo de Vivar, 1985; Azcon-Bieto *et al.*, 1993) además de haber sido obtenidas con solventes de baja polaridad (hexano-acetato de etilo 95-5 respectivamente) también característico de estas (Bruneton, 1991). Las ceras son de carácter hidrofóbico, reducen de forma importante la permeabilidad al agua y los solutos restableciendo una barrera física que evita su pérdida a través de la interfase planta-aire, restringiendo también la difusión de gases; las ceras son comunes en plantas de regiones áridas (Azcon-Bieto *et al.*, 1993).

En el presente estudio, a diferencia del trabajo de Rocha (2002) que solamente trabajó ensayos preliminares de toda la planta, se trabajó cada parte aérea, encontrando la ventaja de que fraccionando desde un principio la planta y realizando particiones de cada extracto con metanol para separar sustancias polares y con hexano para obtener sustancias no polares, resulta más fácil separar grandes grupos de compuestos a partir de su polaridad; la desventaja de este método es el tiempo que se emplea en la etapa de percolación de cada

parte de la planta, pero que es compensado ya que es un método más rápido para aislar y separar los principios activos; siempre y cuando se puedan llevar a cabo las particiones, ya que muchas veces aunque se realicen las particiones no se logran separar fácilmente los compuestos o se disuelven totalmente y después se tienen que separar mediante un embudo de separación y para esto se requiere más tiempo y al realizar una cromatografía de capa fina (CCF) no se logra observar la separación de compuestos por polaridad, ya que muchos de estos pueden presentar polaridades similares, otra desventaja puede ser que al realizar las particiones de los extractos y realizar la purificación del compuesto el rendimiento sea poco y no sea suficiente para realizar las pruebas para su identificación o para determinar su actividad biológica.

V. Elucidación de la estructura.

Al principio se podría pensar que el compuesto que se aisló del extracto hexánico era un terpeno ya que son comúnmente de olores fuertes y las sustancias son de consistencia grasosa y contienen un punto de fusión de 140-180 C° (Harborne y Baxter, 1993). Al observar que en espectro de UV el compuesto absorbe a 383.00 nm, a 264.17, 265.94 y 269.06, sugiere la presencia de terpenos, ya que estos presentan una absorción de 275 a 380 nm, aunque puede variar por efecto de los diferentes solventes, en el que se disuelve o se aísla el compuesto (Dey y Harborne, 1991) y al complementarlo con el espectro de RMN C¹³ se puede confirmar que es un diterpeno ya que presenta 20 carbonos característico de éstos (Gros *et al.*, 1985).

Es importante hacer notar que en los espectros se observa la presencia de otro compuesto; que no se detectó en las cromatografías de placa fina que se realizaron para determinar la pureza del compuesto y que al ser reveladas con sulfato sérico sólo mostraron una mancha debido a que la concentración fue baja, sin embargo el compuesto fue detectado en los estudios espectroscópicos realizados ya que éstos son mucho más sensibles. La presencia del compuesto contaminante puede deberse a varios factores: a) el compuesto activo sufrió alguna alteración durante el proceso de purificación, b) tal vez se trate de un intermediario de la ruta de biosíntesis del compuesto

activo con propiedades muy similares y por lo tanto se aisló con éste (Hernández, 1999).

VI. Determinación de la actividad antibacteriana del compuesto activo aislado de la planta *Viguiera dentata*.

Al realizar los ensayos preliminares para determinar la actividad de los extractos, estos se encontraban a una concentración de 2 mg/10µl, se observó que el extracto hexánico presentó actividad contra la bacteria *V.ch.* agua (Tablas 7, 11 y 14) de igual manera se observó actividad al evaluar el compuesto puro (Tabla 17), sin embargo al determinar CBM este valor quedó por arriba de 2 mg/ml (Tabla 24), esto probablemente se debió a que en los bioensayos preliminares y al evaluar el compuesto puro junto con las fracciones, el extracto se realizó mediante la técnica de difusión en agar, en cambio cuando se determinó CBM el extracto se incluyó en el caldo (microtécnica de dilución en caldo) y como se trata de compuestos no polares y el medio es hidrofílico, hubo poco contacto con la bacteria.

Aunque los resultados parecen indicar que los extractos crudos pueden ser más efectivos que los compuestos purificados. La pérdida en la actividad con la purificación sugiere efectos sinérgicos con otros compuestos presentes en la planta (Pistelli *et al.*, 2000). Fue notorio que conforme se purificaba el compuesto activo se reducía la cantidad necesaria de sustancia para observar halos de inhibición. Se podría afirmar que presenta un amplio espectro de actividad antibacteriana.

La eficacia de MIC y CBM es de gran importancia para saber la cantidad que se requiere para inhibir o matar un tipo de bacteria y es un factor determinante para evaluar un antibiótico, la sustancia antibacteriana es importante si su índice terapéutico (que es la relación entre la dosis tóxica y la concentración mínima inhibitoria) es grande (Avila, 2002).

Mittscher *et al.*, (1983) reporta que el ácido Ent-Kaur-16-en-19-oico no presenta actividad contra *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus*

aureus, *Escherichia coli* y *Candida albicans* a concentraciones de 100 µg/ml; pero si contra *Mycobacterium smegmatis* (MIC 25 µg/ml). Marquina *et al.*, (2001) reportan que el ácido Ent-kaur-16-en19-oico no presenta actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aureginosa*, *Trycophyton mentagrophytes* y *Candida albicans* a concentraciones mayores de 400 µg/ml; este último dato concuerda con nuestros resultados, puesto que el ácido Ent-Kaur-16-en19-oico que se aisló tampoco presentó actividad contra esta levadura. Velikova *et al.*, (2000) menciona que el ácido kaurenico tiene actividad contra *S. aureus* (16 ±1 mm) pero no contra *E. coli* (400 µg en copa); Zgoda-Pols *et al.*, (2002) mencionan la actividad antimicrobiana contra *Mycobacterium smegmatis* (MIC 6.25 µg/ml) pero no contra *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina, *Candida albicans* y *Criptococcus albidus* (> 100 µg/ml 96-pozos/placa) Wilkens *et al.*, (2002) menciona que el ácido kaurenico presenta actividad selectiva contra bacterias gram positivas, es bacteriolítico para *Bacillus cereus*, por otra parte, las mutantes LPS de *Salmonella typhi* son resistentes a este compuesto, pero los esferoplastos de *Escherichia coli* son más sensibles.

En el presente trabajo el ácido kaurenico (AK) presenta actividad antibacteriana contra las catorce cepas bacterianas, en particular contra *Bacillus subtilis* y *Sarcina lutea*, Lo que concuerda con los resultados de Wilkens *et al.*, (2002) que menciona la actividad selectiva contra bacterias gram positivas puesto que en nuestros resultados las bacterias gram negativas (*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter agglomerans* y *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico) requiere una concentración mayor para inhibir su crecimiento así como para actuar como bactericida en comparación con las bacterias gram positivas (*Bacillus subtilis*)(Tabla 24).

El hecho de que Mitscher *et al.*, (1983) y Marquina *et al.*, (2001) reportan que el ácido kaurenico no presenta actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, a concentraciones mayores de 100 y 400 µg/ml respectivamente y Velikova *et al.*, (2000) menciona lo mismo para esta última bacteria y nuestros resultados difieren de estos (*Staphylococcus aureus*, MIC

mayores de 0.250 µg/ml y menor de 0.375 µg/ml y *Escherichia coli* MIC de 0.75 µg/ml y CBM de 2.0 µg/ml); radica en el método, la concentración y el medio de cultivo empleado, pues Wilkens *et al.*, (2002) al realizar la caracterización de la actividad bactericida del ácido kaurenoico contra *Bacillus cereus* dice que el utilizar determinado método para evaluar la actividad antibacteriana de compuestos hidrofóbicos, en este caso del ácido kaurenoico esa actividad antibacteriana en particular es afectada por la composición y el pH del medio de cultivo, pues al evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos, los valores de MIC incrementan por agitación del LB (Luria-Bertani) y MH (Müller-Hinton) complejo medio, el efecto de lisis disminuye en un medio de cultivo denso, esto quiere decir que el efecto lítico y la retención del ácido kaurenoico (AK) depende de la densidad del medio de cultivo y de la forma que presente la bacteria a ensayar, presentando mayor actividad antibacteriana las formas esféricas y las vesículas. También menciona que la insolubilidad del compuesto en medios acuosos es limitada usando métodos con disco de papel, entonces los resultados van a ser diferentes y dependen de la interacción de los compuestos orgánicos y el medio de cultivo utilizado. Así al tratarse de compuestos no polares y el medio es hidrofílico, el contacto con la bacteria fue mínimo por lo tanto no hubo interacción y no presentaron actividad (Hernández, 1999).

El mecanismo de acción de los terpenos no ha sido totalmente entendido, pero se especula que involucra el rompimiento de la membrana por sus compuestos lipofílicos.

Como el compuesto fue activo tanto en bacterias gram positivas como en gram negativas se podría descartar la posibilidad de que actúe a nivel de pared celular, por lo que es probable que actúe a nivel de inhibición en la síntesis de alguna biomolécula (Hernández, 1999).

Como la actividad antimicrobiana es inespecífica puede tener la capacidad de disolver las membranas celulares, con esto, se produce un efecto similar al de la lisis bacterianas provocada mediante enzimas líticas (lisosimas) o por tratamiento con disolventes orgánicos (Harvey, 1982) este efecto es observado

especialmente en bacterias gram negativas (Kubo, 1993). Helander *et al.*, (1998) demostraron que las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium* al ser sometidas a dosis bajas de carvacrol y de timol aumentaban la concentración de ATP y de glucosa 6-fosfato extracelular, debido a esto, se evidenció el efecto lítico de estos compuestos sobre la membrana celular bacteriana. Y puede ocurrir algo similar con el AK, pues sugiere que la membrana externa puede servir como barrera preventiva contra AK y la vía de entrada es la membrana citoplasmática aunque la acción sobre la síntesis de peptidoglicano no puede descartarse, los resultados que se obtuvieron exponen al protoplasto de *B. cereus* son también líticos en medio iso-osmótico después de estar expuestos al AK. También menciona que un ácido débil puede transportar protones a través de la membrana, un posible mecanismo de acción del AK es la interacción del transporte de electrones y subsecuentemente la fosforilación oxidativa en la membrana citoplasmática. Otro posible mecanismo de acción es la ruptura de la membrana citoplasmática por interacción física. Estructuralmente la presencia del ácido carboxílico en posición 19 parece ser importante sobre la actividad antibacteriana, porque derivados sintéticos y naturales con este grupo bloquean o interaccionan con enlaces hidrógenos teniendo menos uniones. Además también sugiere un sitio blanco, una estructura esencial o funcional del AK (Wilkens *et al.*, 2002).

En las plantas, se considera que tienen función defensiva las sustancias secundarias, de las que se reconocen cinco grupos principales: fenilpropanos (derivados de la fenilalanina), acetogeninas, terpenoides, esteroides y alcaloides; la distribución de las sustancias secundarias es muy desigual, ciertas familias están menos defendidas que otras. Distintas acumulan aminoácidos no usuales, utilizables para la planta, pero que pueden interferir con el metabolismo de los animales y por lo tanto se comportan como tóxicos. (Margalef, 1977) es por esta razón que se debe evaluar la toxicidad del compuesto responsable de la actividad antibacteriana.

Otras actividades que se le han encontrado al compuesto son: actividad contráctil del músculo vascular liso (antiespasmódica) (Tirapelli *et al.*, 2002;

Zamilpa *et al.*, 2002); actividad trypanocidal (Alves *et al.*, 1992; Batista *et al.*, 1999), actividad anticonceptiva (Blocka *et al.*, 1998), potente estimulador de la contracción uterina (oxitócico) (Page *et al.*, 1992) como inhibidor de la generación de malondialdehído en plaquetas de ratas responsable de la trombina (actividad antiplaquetaria) (Harborne y Tomas-Barberan, 1991; Yang *et al.*, 2002).

En cuanto a la toxicidad del compuesto se encontró que:

El ácido ent-kaur-16-en-19-oico, presenta actividad tóxica contra crustáceo de mar (LC(50)=4.8 m/ml) y citotóxica contra células KB (IC(50)= 1.6 m/ml)(Mongelli *et al.*, 2002), después de la fertilización inhibe la primera división del óvulo (IC(50)=84.2 mM), inhibe el desarrollo de células tumorales (EC(50)= 78 mM) células leucocitos de CEM en un 95% y células de cáncer HCT-8 colon en un 45%; produce hemólisis en células de ratón (EC(50)=74 mM) y eritrocitos de humano (Ec(50)= 56.4 mM), es embriotóxico de blástulas (IC (50)=44.7 mM) y estados de larva (< 10 mM)(Costa-Lotufo *et al.*, 2002). Activo contra células p388 de leucemia, no presenta actividad tóxica contra células de cáncer de ovario, carcinoma de colon, cáncer cérvico-uterino (Marquina, 2001) tampoco es activo contra la replicación de VIH en células de linfocitos H9 (Yang-Chang *et al.*, 1996).

Los productos químicos que le sirven de defensa a las plantas generalmente se encuentran en forma de látex, en glándulas o en las resinas protegiendo sitios de alta actividad fisiológica (Oyama y Espinoza, 1986). El ácido ent-kaur-16-en-19-oico es un diterpeno que se encuentra en forma de resina; este metabolito secundario, además de trabajar como agente protector, también pueden funcionar como compuesto reductor de la digestibilidad (Oyama y Espinoza, *op cit*) y control biológico de alimentación y ovoposición de insectos fitófagos (Harborne, 1988), puesto que presenta actividad insecticida (Slimestad *et al.*, 1995), en especial contra larvas de distintas especies de lepidópteros, inhibe la presencia del colesterol sugiriendo una interacción con el sistema hormonal de estos insectos (Ellinger *et al.*, 1976) al funcionar el compuesto como reductor de la digestibilidad puede actuar a nivel externo con respecto al organismo

herbívoro o patógeno, interactuando con almidones, celulosa o proteínas en general o con enzimas digestivas, de tal modo que los recursos potenciales son muy poco digeribles, aunque para ser efectivos necesitan existir en concentraciones mayores, a mayores dosis, mayor efectividad, por sus concentraciones (altas) son más costosas para el organismo que los produce, pero difíciles de superar por herbívoros; así los protege contra organismos generalistas, y aunque en menor grado contra organismos especialistas (Rhoades y Cates, 1976; Oyama y Espinoza, 1986), tal es el caso de no presentar actividad contra *Epilachna varivestis* larvae (Coleoptera: Coccinellidae) (Marquina *et al.*, 2001).

También puede actuar en menos casos como hormonas vegetales y como metabolitos en otros procesos fisiológicos; la conversión del ácido kaurenico a 7-OH ácido kaurenico es el paso primario en el metabolismo de las giberelinas (GA) regulado por la vernalización de las hojas (Hazebroek *et al.*, 1993), también otros compuestos son derivados del ácido ent-kaur-16-en-19-ico, pues tiene hidroxilaciones kaurenicas, ya que tienen posiciones antipodales "ent" estereoquímicas (Dey y Harborne, 1991).

Por otra parte al comparar el rendimiento del compuesto (Tabla 25) con el rendimiento obtenido de otras especies de *Viguiera* se observaron diferencias entre la misma especie y las diferentes especies del género *Viguiera*, esto debido a que la forma de aislar, el tipo de solvente, así como la zona en que fue colectado son diferentes para cada especie, Rajeswara *et al.*, (1990) mencionan que la composición y rendimiento de los terpenos es influenciada por la colecta de la planta en las diferentes localidades; y por los años de colecta (Rajeswara *et al.*, 1993) también por la variación geográfica donde se encuentran las diferentes especies del género (Gutiérrez-Lugo *et al.*, 1996) el fotoperiodo, intensidad de luz, temperatura los meses y las estaciones (Rajeswara *et al.*, 1996) también influye notoriamente en el rendimiento y producción de los metabolitos secundarios, en este caso del ácido kaurenico.

Es importante señalar la presencia de este diterpeno en la especie *V. dentata*, puesto que en este trabajo se describe la composición química y el potencial

biológico específicamente antibacteriano de las diferentes partes de la planta. Además sirve como base para realizar otros trabajos.

Los resultados indican que la especie *V. dentata* presenta diversos compuestos activos con actividad antibacteriana que aún no se han aislado; pero al tener como antecedentes la actividad biológica de los terpenos que ya se habían aislado de la planta: el compuesto diversifolin presenta actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* además de presentar actividad antiinflamatoria (Rungeler *et al.*, 1998), el espatulenol contra bacterias Gram positivas y Gram negativas (Cobos *et al.*, 2001) como *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis* (Ulubelen *et al.*, 1994), presenta actividad tóxica en *Artemia* sp. y citotoxicidad en células KB, inhiben la topoisomerasa I de humanos (Pacciaroni *et al.*, 2000); el compuesto manool tiene actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Ulubelen *et al.*, 1994) actividad tóxica contra crustáceos, contra larvas de mosquitos y citotóxico contra tres líneas celulares tumorales de humano (He *et al.*, 1997), el ácido oleanólico presenta actividad contra *Bacillus subtilis* y contra *Staphylococcus aureus* resistente a metacilina (Woldemichael *et al.*, 2003), con lo anterior se dedujo que estos compuestos también son responsables de la actividad antibacteriana de *V. dentata* aunque no se descarta la posibilidad de que se encuentren otros compuestos con dicha actividad.

Entonces el ácido kaurenico al ser un precursor de las giberelinas y los otros compuesto antes mencionados son también responsables de la actividad antibacteriana de la planta, se puede explicar con más facilidad el porque toda la planta presenta esta actividad antibacteriana; el compuesto se encontró en tallo pero también se puede encontrar en raíz (Bohlmann *et al.*, 1980) y en hojas (partes aéreas) (Bohlmann *et al.*, 1980; Gao *et al.*, 1985) pues al ser un intermediario de las giberelinas (Hazebroek *et al.*, 1993) y estas son reguladoras del crecimiento vegetal (Romo de Vivar, 1985), se puede encontrar en cualquier parte de la planta y como los otros compuestos pueden ser responsables de la actividad antibacteriana, también se pueden encontrar en las partes aéreas de la planta esta es la razón por la que *V. dentata*, presenta actividad en las diferentes partes de la planta (tallos, hoja y flor).

La planta *Viguiera dentata* presenta una actividad antibacteriana contra bacterias gram positivas y gram negativas. Al inhibir el crecimiento de las bacterias (gram positivas) que provocan infección en la garganta, como *S. aureus* y al inhibir a la bacteria *S. epidermidis* que provoca infecciones en la piel, se justifica el uso como antiséptico y antitusivo que se le da en las diferentes zonas de México (Tabla 5), así como el uso que se le da en la zona de San Rafael Coxcatlán contra el chincual; esta correlación de la planta utilizada con fines médicos y la actividad antibacteriana presente en ella, indica que este conocimiento puede ser similar a un entendimiento de la ecología química indígena, además se consideran que la interacción entre los metabolitos secundarios de las plantas usadas en la medicina tradicional y el estado de enfermedad el paciente podría ser más complejo que el resultado de la actividad directa ya que este es una entidad química única (Lopez *et al.*, 2001).

Al ser considerada la especie *V. dentata* como maleza o mala hierba, ha provocado que se vea a todas las malezas como plantas que deben ser erradicadas ya que muchas puedan acabar con cultivos cuando no se les controla (Villaseñor *et al.*, 1998), pero la realización de estudios químico y biológicos permite ver a estas plantas de acuerdo al potencial biológico que presentan y más aún como recurso que debe aprovecharse pues tiene amplia distribución en México (Villaseñor *et al.*, *op cit*), así resultaría más productivo y representaría una alternativa más para la elaboración de formas farmacéuticas en un futuro.

CONCLUSIÓN

- ❖ La época de colecta es un factor importante para los estudios fitoquímicos, ya que las plantas biosintetizan metabolitos secundarios en diferentes fases de su desarrollo y en relación directa a los cambios medioambientales.
- ❖ Resultó de gran importancia utilizar el criterio etnobotánico, químico y fitoquímico en la elección de la planta porque sirven como bases para comprobar y aislar el compuesto responsable de la actividad antibacteriana.
- ❖ Se valida el uso de *V. dentata*, en la medicina tradicional en México y sobre todo en la región de San Rafael Coxcatlán, Puebla, pues se justifica el uso de infusiones, baños y cataplasmas al comprobar que el extracto acuoso inhibe el crecimiento bacteriano y que los extractos hexánicos de hoja y tallos son los que presentan mayor actividad antibacteriana.
- ❖ Los aceites esenciales también presentan actividad antibacteriana principalmente en bacterias gram negativas.
- ❖ Uno de los principios activos responsables de la actividad antibacteriana es el ácido ent-Kaur-16-en-19-oico.
- ❖ La planta *Viguiera dentata* presenta actividad antibacteriana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas principalmente en estas últimas.
- ❖ Existen otros compuestos presentes en *Viguiera dentata* con polaridad media a no polar que seguramente también presentan actividad antibacteriana no polar en flor, no polar y mediana polaridad para tallo y hoja.

RECOMENDACIONES

- ❖ Se propone que se realicen investigaciones de actividad antiinflamatoria de *Viguiera dentata* debido a que en la zona se utiliza contra la picadura de hormiga.
- ❖ Se pueden realizar estudios comparativos en cuanto a rendimientos y a metabolitos secundarios.
- ❖ Complementar el estudio comparando la producción de metabolitos secundarios de la planta en las diferentes épocas del año.
- ❖ Realizar un estudio para conocer si los granitos en los glúteos de los bebés, es causado por dermatitis bacteriana o alérgica.
- ❖ Se sugiere determinar la (s) otra (s) estructura (s) química (s) responsable (s) de la actividad antibacteriana de *Viguiera dentata*.
- ❖ Es necesario realizar más estudios para determinar el mecanismo de acción del ácido kaurenico.
- ❖ Determinar la toxicidad del extracto crudo activo para poder vislumbrar la aplicación y comercialización del producto.

REFERENCIAS

1. Aguilar, A., y Camacho, J.R. 1985. Uso popular de las plantas medicinales y su distribución por aparato y sistemas. Archivos de investigación médica. México. Suplemento 6:13-14.
2. Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S., Jacquez, P., López, V.M.E. 1994. Instituto Mexicano del Seguro Social. Herbario medicinal del IMSS. México p. 253.
3. Alvarez, L., Mata, R., Delgado, G., Romo De Vivar, A. 1985. Sesquiterpene lactones from *Viguiera hipargyrea*. Phytochemistry. 24(12): 2973-2976.
4. Alves, T.M.A. Chaves, P.P.G., Santos, L.M.S.T., Nagem, T.J., Murta, S.M.T., Ceravolo, I.P. Romanha, A.J., Zani, C.L. 1995. A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. Planta Médica. 61: 85-87.
5. Ambrosio, S.R., Tirapelli, C.R., Bonaventura, D., De Oliveira, A.M., Da Costa, F.B.F. 2002. Primarane diterpene from *Viguiera arenaria* (Asteraceae) inhibit rat carotid contraction. Fitoterapia. 73 (64): 84-89.
6. Argueta, V.A., Cano, A.L., Rodarte, M.E. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana III. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la medicina tradicional. México. Pp. 1195-1786.
7. Avila, A.J.G. 1996. Actividad *Anti-vibrio cholerae* de dos Plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis profesional (Biólogo) Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM. México.
8. Avila, A.J.G. 2002. Estudio fitoquímico de *Buddleja perfoliata* y *Buddleja acordioides*. Evaluación de la actividad antibacteriana y fotoprotectora de sus principales metabolitos secundarios. Tesis (Doctor en Ciencias) UNAM Instituto de Química. México.
9. Azcon-Bieto, J., Talon, M. 1993. Fisiología y bioquímica vegetal. Mc Graw-Hill. España.
10. Batista R., Chiari, E., De Liveira, A.B. 1999. Trypanosomal kaurene diterpenes from *wedelia paludosa* (Asteraceae). Planta Médica. 65(3):283-284.
11. Barry, A.L. y Thornsberry, C.1987. Pruebas de susceptibilidad: Técnicas para pruebas de difusión. En Lenette, W., H., Manual de microbiología

- clínica. 4° ed. Editorial médica panamericana Buenos aires Argentina. Pp. 561-574.
12. Blocka, C.L., Santosa, S.R.A., De Souza, M.M., Scheidta, C., Yunesb, A. R., Alves, S.M., Delle, M.F., Cechinel, F.V. 1998. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 61(1): 85-89.
 13. Bohlmann, F., Jakupovic, J., Ahmed, M., Grenz, M., Suding, H., Robinson, H., y King, M.R. 1981. Germacranolides and diterpenes from *Viguiera* species. *Phytochemistry*. 230:113-116.
 14. Bohlmann, F., Gerke, T., Jakupovic, J., King, M.R., Robinson, H. 1984. Cadina -4,11-dieno from *Viguiera oblongifolia*. *Phytochemistry*. 23(5):1183-1184.
 15. Bruneton, J. 1991. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Ed. Acribia. España.
 16. Canales, M.M. 2000. Actividad antibacteriana de la planta *Alternanthera caracasana HBK* (Tianguis). Tesis profesional (Maestro en Biología de Recursos Vegetales) Universidad Nacional Autónoma de México. ENEP Iztacala. México.
 17. Canales, M. M. En prensa.
 18. Cabrera-Rodríguez, L. y Villaseñor, J.L. 1987. Revisión bibliográfica sobre el conocimiento de la familia Compositae en México. *Biótica*. 54:90-102.
 19. Chang, S.T., Chen, P.F., Chang, S.C., 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmoploeum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 77:123-127.
 20. Casas, A., Pickersgill, B., Caballero J., Valiente-Banuet A. 1997. Ethnobotany and domestication in xoconochtlí, *Stenocercus stellatus* (Cactaceae), in the Tehuacan valley and la mixteca baja, México. *Economical Botany*. 51:279-292.
 21. Cervantes, S.L. y Valdés G.J. 1990. Plantas medicinales del distrito de Ocotlán, Oaxaca. *Anales Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*. 60(1): 85-103, 30-XI.
 22. Cobos, M.L., Rodríguez, J.L., Oliva, M.L., Demo, M., Faillaci, S.M., Zygodlo, J.A, 2001. *Planta Médica*. 67(1): 84-86.
 23. Coley, P.D., Bryant, J.P, y Chaplin, F.S. 1985. Resources availability and

- plant antiherbivore defense. *Science*. 230: 895-898.
24. Costa-Lotufo, L.V., Cunha, G.M., Farias, P.A., Viana, G.S., Cunha, K.M., Pessoa, C., Moraes, M.O., Silveira, E.R., Gramosa, N.V., Rao, V.S. 2002. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. *Toxicon*. 40(8):1231-1234.
 25. Cragg, G., Newman, D., Snader, K. 1997. Natural products in drug discovery in development. *Journal Natural Products*. 60:52-60.
 26. Crawford, R.M.M. 1989. Studies in plant survival ecological case histories of plant adaptation to adversity. Vol. 11. Blackwell Scientific Publications. Londres. Pp.296.
 27. Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press. New York. p.1262.
 28. Da Costa F.B. Albuquerque, S., Vichnewski, W. 1996. Diterpenes and synthetic from *Viguiera aspillioides* with trypanomicidal activity. *Planta Médica*. 62(6): 557-559.
 29. Da Costa F.B. Vichnewski, W. 1996. Constituents of *Viguiera aspillioides* and *V. Robusta*. *Biochemical systematics and Ecology*. 24(6): 585-587.
 30. Dávila, P., Villaseñor, J.L., Medina, R.L., Ramirez, A. Salinas, A., Sánchez-Ken, J., y Tenorio P. 1998. "Listado florístico de México X flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. UNAM. México.
 31. Davino, S., C., Giesbrecht, A., M., Roque, N., F. 1989. Antimicrobial activity of kaurenoic acid derivatives substituted on carbon-15. *Brazilian Journal Medical Biology Research*. 22(9):1127-1129
 32. De Wet, J. M.J. and Harlan, J.R. 1979. Weeds and Domesticales: Evolution in the Man Made Habitat. *Economic Botany*. 29: 99-107.
 33. Deans y Svoboda, 1989; Wang y Yin, 1991; Yin, 1991 En: Chang, S. T., Chen, P., F., Chang, S., C., 2001. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmoploeum*. *Journal of Ethnopharmacology*. 77:123-127.
 34. Delgado, G., Romo De Vivar, A., Ortega, A., Cárdenas, J. y Shlemper, O. 1983. Diterpenoids from *Viguiera insignis*. *Phytochemistry*. 22(5): 1227-1230.
 35. Delgado, G., Romo De Vivar A. 1984. Ent-Kaurenoid esters from *Viguiera stenoloba*, structural revision of stenolobin and its biomimetic conversión to

- zoapatlin. Chemistry letters.1237-1240.
36. Delgado, G., Romo De Vivar, A., Cárdenas, J. Pereda-Miranda, R., Huerta. 1984 Ent-beyerene and ent-atisene diterpenes from *Viguiera insignis*. Phytochemistry. 23(10): 2285-2288.
 37. Delgado, G., Romo De Vivar, A., Herz, W. 1992. Sesquiterpene lactones from *Viguiera* species. Phytochemistry. 21 (6): 1305-1308.
 38. Dey, P.M., Harborne, J.B. 1991. Methods in Plant Biochemistry, Volumen 7. Terpenoids. Editado Academia. Londres.
 39. Domínguez, A.X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa S.A. de C.V. México D.F.
 40. Elliger, C.A., Zinkel, D.F., Chan, B.G., Waiss, A.C. Jr. 1976. Diterpene acids as larval growth inhibitors. Experientia. 15(11):1364-1366.
 41. Fernández, Buces M. N. 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. UNAM. Facultad de Ciencias. Pp. 4-8, 35-40, 115.
 42. Finegold, S.M y Jo Baron, E. 1989. Métodos para evaluar la efectividad antimicrobiana, En: Diagnostico microbiológico. 7ª edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 191-210.
 43. Fisher, N.H.1991. Sesquiterpenoid lactones, In: Methods in plant biochemistry, Vol. 7 "Terpenoids". Edited by Charlwood, B.V. and Banthorpe, D.V: Series editor Dey, P.M. Academic Press. San Diego, California USA. Pp. 187-210.
 44. Flores, E.H., Ayora, T., Méndez, M., y Lozoya, V.V. M. 1989. Obtención de metabolitos secundarios a partir de raíces transformadas. Ciencia y Desarrollo. XV(86): 87-90.
 45. Gao, F., Misk,i M., Gage, D.A. y Mabry, T.J. 1985. Terpenoid constituents of *Viguiera dentata*. Journal of natural products. 48(2): 316-318.
 46. Gershenzon, J., Liu, Y., Mabry, T., J., Korp, J. D., Bernal, I.1983. Germacranolides from *Viguiera microphylla*. Phytochemistry. 23(6): 1281-1287.
 47. Gros, G.E., Pomillo, A., Seldes, M.A. y Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría general de la organización de los estados americanos. Programa regional de desarrollo científico y

- tecnológico. Washington, D. C.
48. González, M.S. y Peñalosa, C.I. 1981. Manual de biomoléculas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México.
 49. Guillet, G., Chauret, D., Arnason T. J. 1997. Phototoxic polyacetylenes from *Viguiera annua* and adaptations of a chrysomelid beetle, *Zigogramma continua*, feeding on this plant. *Phytochemistry*. 45(4): 695-699.
 50. Gutiérrez, A., I. 1989. Determinación del efecto antimicrobiano, in vitro, de las plantas de la subclase dicotiledonea, utilizadas popularmente contra la disenteria (causada por *Shigella dysenteriae*, y *Shigella flexneri*). Tesis profesional (Biólogo) Universidad Nacional Autónoma de México. ENEP Iztacala. México D.F.
 51. Gutiérrez-Lugo, M.T., Barrientos-Benítez, T., Luna, B., Ramírez-Gama, R. M., Bye, R., Linares, E., Mata, R., 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal Plants. *Phytomedicine*. 2(4): 341-347.
 52. Hamburger y Hostettman, 1991. En Gutiérrez-Lugo, M.T., Barrientos-Benítez, B., Luna, R.M., Ramírez-Gama, Bye, R., Linares E., Mata, R. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine*. 2(4): 340-347.
 53. Harborne, J.B. 1988. Introduction to ecological biochemistry, 3a edición. Academic press harcourt Brace jovanovich, publicaciones. Londres.
 54. Harborne, J.B. 1993. Phytochemical methods. Chapman and hall. New York.
 55. Harborne, J. B. y Tomas-Barberan, F.A. 1991. Ecological chemistry and Biochemistry of plants terpenoids. *Phytochemical Society of Europe*. Oxford. p. 252.
 56. Harborne, J.B. y Baxter, H. 1993. Phytochemical dictionary, a handbook of bioactive compounds from plants. Taylor y Francis. London.
 57. Harvey, S.C. 1982. Antisépticos y desinfectantes, fungicidas, ectoparasiticidas. En: "Las bases farmacológicas de la terapeutica" Editado por Goodman, A., Goodman, L.S. y Gilman, A. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. pp. 950-972.
 58. Hazebroek, K.P., Metzger, J.D., Mansager, E.R. 1993. Thermoinductive regulation of Gibberellin metabolism in *Thlaspi arvense* L. (II. Could induction

- of enzymes in Gibberellin Biosynthesis). *Plant Physiology*. 102 (2): 547-552.
59. He, K., Shi, G., Zeng, L., Ye, Q., Mc Laughlin, J., L. 1997. Konishiol a new sesquiterpene and bioactive components from *Cunninghamia konishii*. *Planta Médica*. 63(2):158-160.
60. Heinrich, M., Robles, M., West, J., E., Ortiz de Montellano, R.B., Rodríguez, E. 1998. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 38: 539.
61. Helander, I.M., Alakomi, H.L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E.J., Gorris, L.G.M. and Von Wright, A. 1998. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal Agriculture Food Chemical*. 46: 3590-3595.
62. Hernández, D.C.T. 1999. Actividad Antimicrobiana de la planta *Tagetes lucida Cav.* (Pericon). Tesis profesional (Maestro en Biología de Recursos Vegetales) Universidad Nacional Autónoma de México. ENEP Iztacala. México.
63. Heywood, V.H. 1985. Las plantas con flores. Ed. Reverté. España. Pp.332.
64. Itaya, N.M., Schorr, K., Arakawa, N.S., Schiling, E.E., Spring, O. 2001. Intraspecific variation in the chemistry of glandular trichomes of two Brazilian *Viguiera* species (Heliantheae; Asteraceae). *Journal of Brazilian Chemical society*. 12(3): 403-407.
65. Koneman W.E. 1985. Diagnostico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. México.
66. Konishy, K., Ito, C. and Kanbara, H. 1987. Inhibitory effects of tannic acid on the respiratory chain of *Photobacterium phosphoreum*. *Chemical Pharmacology Bulletin*. 35(3): 1169-1175.
67. Kubo, I. 1993. Antimicrobial activity of green tea flavor components. In *Bioactive volatile compounds from plants*. Edited by Teranish, R. and Buttery, R.G. American Chemical Society. Washington, D.C. USA. Pp. 57-70.
68. Kudi A.C., Umoh, J.U., Eduvie, I.O., Gefu, J. 1999. Screening of some Nigerian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 67: 225-228.
69. Kumate, J. 1993. La medicina herbolaria contemporánea. En: *La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana*. Secretaria de

- Salud. 50 aniversarios, edición conmemorativa. México. Pp.11-12
70. Lin J.A.R., Opoku, M. Geheeb-Keller, A.D. Hutchings, S.E., Terblanche, A.K., Jager and J. Van Staden. 1999. Preliminary screening of some traditional Zulu medicinal plants for anti-inflammatory and anti-microbial activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 68(1-3): 267-274.
71. Lopeza, A., Hudsonb, J.B. y Towers G.H.N. 2001. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 77 (2-3): 189-196.
72. Lu T., Vargas, D., Franzblau, S.G., Fischer, N.H. 1995. Diterpenes from *Solidago rugosa*. *Phytochemistry*. 38(2): 451-456.
73. Mac Neish, R.S. 1992. The origins of agricultura and settled life. University of Oklahoma press. Norman and London.
74. Margalef, R. 1977. Ecología. Ediciones omega S.A. España p. 951.
75. Marquina, S., Maldonado, N., Garduño-Ramírez, M., L., Aranda, E., Villareal, M.L., Navarro, V., Bye, R., Delgado, G., Alvarez, L. 2001. Bioactive oleanolic acid saponins and constituents from the roots of *Viguiera decurrens*. *Phytochemistry*. 56: 93-97.
76. Martínez, A.M.A. 1982. Investigaciones en plantas medicinales en la sierra norte de Puebla. Jardín botánico del instituto de biología, UNAM. Pp. 59-71. En: La Herbolaria en México, Memorias de la primera semana de la herbolaria en la UNAM. Cuaderno de extensión académica 36. Coordinación de difusión cultural México, dirección general de extensión académica. Pp.116.
77. Martínez, M. 1987. Plantas mexicanas. Fondo de cultura económica. México. Pp. 267, 1238
78. Martínez, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de cultura económica. México. p. 1216.
79. Mata, R. 1993. Estudios químicos y aspectos biológicos de algunas plantas usadas en la medicina tradicional de México. En: La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana. Secretaria de salud. 50 aniversarios, edición conmemorativa. México. Pp.143
80. Meckes, M. 1993. Investigación de las plantas medicinales en México. Avances y perspectivas. En: La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana. Secretaria de salud. 50 aniversarios edición

- conmemorativa. México. Pp.69-73
81. Medina, S.J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis Lic. Biología. UNAM-Campus Iztacala. Pp. 3, 6,7.
 82. Méndez, M.J. 1995. Actividad antimicrobiana de *Tanacetum parthenium* (L.) Fam. Compositae. Tesis licenciatura (biólogo) Universidad Nacional Autónoma de México. ENEP Iztacala. México D.F.
 83. Mendoza, L., Wilkens, M., Urzua, A. 1997. Antimicrobial study of the resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolates from *Chilean pseudognaphalium* (Asteraceae). *Journal of Ethopharmacology*. 58: 85-88.
 84. Mitscher, L.A.M Rao, G.S.R. Veysoglu, T., Drake, S., Haas, T. 1983. Isolation and identification of trachiloban-19-oic and (-)-kaur-16-en-19-oic acids as antimicrobial agents from the prairie sunflower, *Helianthus annuus*. *Journal of Natural Products*. 46(5): 745-746.
 85. Mongelli, E., Pomilio, A.B., Sanchez, J.B., Guerra, F.M., Massanet, G.M. 2002. Ent-kaur-16-en-19-oic acid, a KB cells cytotoxic diterpenoid from *Elaeoselinum foetidum*. *Phytother Research*. 16(4): 387-378.
 86. Mori, A., Nishino, C., Enoki, N. and Tawata, S. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 26 (8): 2231-2234.
 87. Murphy-Cowan, M. 1999. Plant products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology*. 12(4): 564-582.
 88. Murray, P.R., Drew, W.L., Kobayashi, S.G. y Thomson, J.H. 1993. *Microbiología Médica*, segunda edición, Times Mirror de España, S.A. Barcelona España.
 89. Myrnk, Q.N., Weiser, R.S. 1991. *Bacteriología y micología médica*. segunda edición. Interamericana, Mc Graw-Hill, México.
 90. Oyama K., Espinoza, F. 1986. Herbivoros y plantas ¿cómo interactúan? *Ciencias*. 9: 38-46.
 91. Pacciaroni, A.V., Mongelli, E., Ariza, E.L., Romano, A., Ciccia, G., Silva, G. L. 2000. Bioactive constituents of *Conyza albida*. *Planta Médica*. 668(8): 720-723.

92. Page J.E., Balza, F., Nishida, T. and Neil Towers, G.H. 1992. Biologically active diterpene from *Aspilia mossambicensis*, a chimpanzee medicinal plant. *Phytochemistry*. 31: 3437-3439.
93. Paz, E.A., Cerdeiras, M.P., Fernández, J., Ferreira, F., Moyna, P., Soubes, M., Vazquez, A., Vero, S., Zunino, L. 1995. Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 45: 67-70
94. Pistelli, L., Bertoli, A., Zucconelli, S., Morelli, I., Panizzi, L., Menichini, F. 2000. Antimicrobial activity of crude extracts and pure compounds of *Hypericum hircinum*. *Fitoterapia*. 71: 138-S140.
95. Rajeswara R.B.R., Sastry, K.P., Prakasa R.E.V.S., Ramesh, S. 1990. Variation in yield and quality of *Geranium (Perlargonium graveolens* L' Her. Ex Aition) under varied climatic and fertility conditions. *Journal Essent Oil Research*. 2: 73-79.
96. Rajeswara R.B.R., Bhattacharya, A.K., Kaul, P.N., Chand, S., Ramesh, S. 1993. Changes in profiles of essential oils of rose-scented *Geranium (Perlargonium species)*. During leaf ontogeny. *Journal Essent Oil Research*. 5: 301-304.
97. Rajeswara R.B.R., Kaul, P.N., Mallavarapu G.R., Ramesh, S. 1996. Effects of seasonal climatic changes on biomass yields and terpenoid composition of rose-scented *Geranium (Perlargonium species)*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 24(7-8): 627-635.
98. Rhoades, D. F. y Cates R. G. 1976. A general theory of plant antiherbivore chemistry. *Biological interactions between plants and insects*. En: Oyama K., Espinoza, F. 1986. *Herbivoros y plantas ¿cómo interactúan?*. *Ciencias*. 9: 38-46.
99. Rocha, T.R. 2002. Estudio preliminar de la actividad antibacteriana de las plantas reportadas como medicinales de San Rafael Coxcatlán, Puebla. Tesis licenciatura (Biólogo) Universidad Nacional Autónoma de México. ENEP Iztacala. México D.F.
100. Rodríguez L.M.C. 1997. Actividad anti-vibrio cholerae de los aceites esenciales de *Lepechinia caulescens* C.L. *spicata* wild). Tesis licenciatura (Biólogo) Universidad Nacional Autónoma de México. ENEP Iztacala. México D.F.

101. Romo de Vivar, A. 1982. Importancia de los estudios químicos en las plantas medicinales. Instituto de química, UNAM. Pp.73-80. En: La Herbolaria en México, Memorias de la primera semana de la herbolaria en la UNAM. Cuaderno de extensión académica 36. Coordinación de difusión cultural México, dirección general de extensión académica. p: 116.
102. Romo De Vivar, A. 1985 (a). Los metabolitos de *Viguiera* (Compositae, Heliantheae) química e implicaciones quimiotaxonómicas. Boletín de la sociedad Chilena de química. 30. (2): 79-100.
103. Romo de Vivar, A. 1985(b). Productos naturales de la flora mexicana. Editorial Limusa. México.
104. Rosas, M.R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael Coxcatlán, Puebla. Tesis licenciatura (Biólogo) Universidad Nacional Autónoma de México. ENEP Iztacala. México D.F.
105. Rubio, C.L.J. 1996. Estudio químico y microbiológico de la planta *Eucaliptos globulus*. Tesis licenciatura (Biólogo) Universidad Nacional Autónoma de México. ENEP Iztacala. México D.F.
106. Rungeler, P., Lyss, G., Castro, V., Mora, G., Pahi, H.L., Merfort, I. 1998. Study of three sesquiterpenes lactones from *Tithonia diversifolia* on their anti-inflammatory activity using the transcription factor NF-Kappa b and enzymes of the arachidonic acid pathway as targets. *Planta Médica*. 64(7): 588-93.
107. Rzedowski, J. 1972. Contribuciones a la fitogeografía florística e histórica de México III. Algunas tendencias en la distribución geográfica y ecológica de las Compositae mexicanas. *Ciencias (México)* 27:123-132.
108. Rzedowsky, C.G. 1985. Flora fanerogámica del Valle de México, Volumen II. Editado por Rzedowsky, J. Escuela Nacional de ciencias biológicas Instituto Politécnico nacional, México, D.F. e Instituto de Ecología, D.F.
109. Rzedowsky, J.1978. Vegetación de México. Limusa. México.
110. Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30(12): 3875-3883.
111. Slimestad, R., Marston, A., Mavi, S. y Hostettmann, K. 1995. Larvicidad constituents of *Melantheria albinervia*. *Planta Médica*. 61: 562-563.
112. Soriano, R. A.1994. Farmacognosia de algunas plantas medicinales de

- uso frecuente en la población mexicana. Tesis licenciatura (biólogo) Universidad Nacional Autónoma de México. ENEP Iztacala. México D.F.
113. Spring, O., Zipper, R., Klaiber, I., Reeb, S., Vogler, B. 2000. Sesquiterpene lactones in *Viguiera eriophora* and *Viguiera puruana* (Heliantheae; Asteraceae). *Phytochemistry*. 55: 255-261.
114. Spring, O., Zipper, R., Reeb, S., Vogler, B., Da Costa B., F. 2001. Sesquiterpene lactones and myoinositol from glandular trichomes of *Viguiera quinqueremis* (Heliantheae; Asteraceae). *Phytochemistry*. 57: 267-272.
115. Stepp, J. y Moerman, D.E. 2001. The importance of weeds in the ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 75:19-23.
116. Tirapelli, C., Ambrosio, S.R., Da Costa, F.B., De Oliveira A.M. 2002. Inhibitory action of Kaurenic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenyleprine-induced rat carotid contraction. *Fitoterapia*. 73 (1): 56-62.
117. Trease, G.E. y Evans, W.C. 1991. *Tratado de Farmacognosia*. Ed. Interamericana. Mc Graw-Hill. México.
118. Turner, B.L., Nesom, G.L. 1998. Biogeografía, diversidad y situación de peligro o amenaza de Asteraceae de México. En: Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A., Fa, J. (compiladores). 1998. *Diversidad Biológica de México. Orígenes y distribución*. Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 545-561.
119. Ulubelen, A., Topcu, G., Eris, C., Sonmez, U., Kartal, M., Kurucus, Bozok-Johansson, C. 1994. Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*. 36(4): 971-974.
120. Vaccarini, E.C., Palacios, M.S., Meragelman, M.K., Sosa, E.V. 1999. Phytogrowth-inhibitory activities of a clerodane from *Viguiera tucumanensis*. *Phytochemistry*. 50:227-230.
121. Valiente-Banuet, A., Casas, A., Alcántara, A., Dávila, P. 2000. La vegetación del valle de Tehuacan-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica*. México. 67:24-74.
122. Vanden Berghe y Vlietnick, 1991. En: Dey, P.M., Harborne, M.J.B., Hostettmann, K. (Eds.) *Methods in Plant Biochemistry*, Vol. 6. "Assays for bioactivity" editado por Hostettmann, K. Series editor Dey P., M., Academia Press. New York, USA. Pp. 47-71.

123. Velikova, M., Bankova, V., Tsetkova, I., Kujumgiev, A., Marcucci, M.C. 2000. Antibacterial ent-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia*. 71(6): 693-696.
124. Villaseñor, J.L. 1993. La familia Asteraceae en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. Volumen en español. (XLIV). Pp.117-124.
125. Villaseñor R.J.L., Espinosa G.F.J.1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México.
126. Vlietink, A.J. Van Of., L., Totte, J., Lasure, A., Vanden Berghe, D., Rwangabo, P.C., Mvukiyumwami, J. 1995. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *Journal of Ethnopharmacology*. 46:31-47.
127. Vogel, A.Y.1989. Textbook of practical organic chemistry. 5th Ed. Longman Scientific and Technical, U.K. P. 1225. En: Avila A.J.G. 1996. Actividad *Anti-vibrio cholerae* de dos Plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis profesional (Biólogo) Universidad Nacional Autónoma de México. UNAM. México.
128. Wang, C.L., Yin, H.W. 1991. The locational and seasonal variations of leaf essential oil from cultivated *Cinnamomum osmophloeum* Kaneh. *Bulletin of Taiwan Forestry Research Industry New series*. 6: 313-328.
129. Wilkens, M., Alarcón, C., Urzua, A., Mendoza, L.2002. Characterization of the bactericidal activity of the natural diterpene Kaurenoic acid. *Planta Médica*. 68(5): 452-454.
130. Williamson, M.E., Okpako, T.D., Evans, J.F. 1996. Pharmacological methods in phytotherapy research. Volumen I. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. Wiley, J. & Sons. London.
131. Woldemichael, G.M., Singh, M.P., Maiese, W.M., Timmermann, B.N. 2003. Constituents of antibacterial extracto *Caesalpinia paraguarienses* Buró. *Z. Naturforsch.* 58(1-2): 70-75.
132. Yang-Chang, W., Yu.Chun, H., Fang-Rong, C., Mark, C., Hui-Kang, W., Kuo-Hsiung, L. 1996. Identification of ent-16 β , 17-dihidroxykauran-19-oic Acid as an anti-HIV principle and isolation of the new diterpenoids

- Annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products*. 59: 635-637.
133. Yang, Y.L, Chang, F.R., Wu, C.C., Wang, W.Y., Wu, Y.C. 2002. New ent-kaurane diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products*. 65(10): 1462-1467.
134. Ying, H.W. 1991. Yield and composition variation of essential oil from leaves of different *Cinnamomum osphloeum* cañeria clones in Taiwan. *Quarterly Journal of Chinese Forestry*. 24: 83-104.
135. Zamilpa, A., Tortoriello, J., Navarro, V., Delgado, G., Alvarez, L. 2002. Antispasmodic and antimicrobial diterpenic acids from *Viguiera hypargyrea* roots. *Planta Médica*. 68(3): 281-283.
136. Zgoda-Pols, J.R., Freyer, A.A., Killmer, L.B., Porter, J.R. 2002. *Fitoterapia*. 73(5): 434-438.

APÉNDICE 1

Las preparaciones más frecuentes o comunes que se pueden llevar a cabo en casa, son:

Infusión: calentar 500 ml de agua y añadir 50 gramo de la planta necesaria en el primer hervor. Seguidamente se aparta del fuego, se tapa y se deja reposar unos minutos (10 minutos). La infusión una vez hecha no debe hervir. Se suele preparar con las partes jóvenes de la planta, como hojas, flores y semillas. (Equivale a una taza) se cuela y después se toma.

De cocción: proceso por el cual la planta (un gramo de planta molida o triturada con una taza de agua fría) se hierve durante un periodo de tiempo determinado de 2 a 3 minutos si se trata de hojas, ramas jóvenes, raíces delgadas y semillas; se hierve de 5 a 10 minutos este procedimiento si se trata con las partes más duras, como leños, corteza, hojas coriáceas, raíces y tallos.

Reducción: si la cocción se lleva a cabo durante más de 20 minutos, se produce la reducción. Se emplea para principios activos que resisten el calor y de los que se necesita, por su escasa proporción, una mayor concentración.

Maceración: consiste en dejar reposar las plantas en agua fría durante algunas horas, (de preferencia molida o triturada durante 12 a 24 horas en un recipiente tapado) Sirve para extraer principios activos inestables frente al calor pero solubles en agua, y se usan en plantas de difícil extracción y que requieren varios minutos de ebullición.

Tintura o vinos medicinales: es la maceración hecha en alcohol (a diferentes concentraciones 80°, 70°, 60°, 50°, 40°,30°, 20° y 10°. con una proporción de planta al 20% respecto del alcohol), la mezcla se coloca en una botella que cierre herméticamente y se deja reposar de 7 a 14 días según la planta. Se usa si los principios activos no se disuelven bien en agua o son de sabor desagradable, empleándose generalmente planta seca. Son muy conocidos los vinos de quina o el aguardiente de endrino (pacharán).

Jarabes: son disoluciones de azúcar (medio Kilo) en agua a las que después se les añade la planta (fresca o seca 100 gramos para un litro de agua). Este preparado tiene una duración de treinta días.

Zumo o jugo: directamente se trituran las plantas frescas o sus frutos o se exprimen según el caso y luego se tamiza el líquido. Se consume recién preparado, solo o mezclado con agua razón de una cucharada por cada 25 ml de zumo.

Aceites medicinales: al igual que el alcohol, el aceite es otro de los disolventes más usados. De hecho hay ciertas plantas que transfieren mejor sus principios activos al aceite. Son los más utilizados para uso externo (friegas, masajes o untes).

Cataplasmas o emplastos: se hacen hirviendo la planta o sometiéndola a la acción del agua. Las plantas hervidas se envuelven en paños delgados que se sitúan sobre la zona a tratar. Se pueden usar también hojas frescas que solo se machacaron con agua o aceite o sales hasta que adquiriera la consistencia de papilla.

Compresas, ungüentos o fomentos: consiste en una cocción a razón de un gramo por 100 ml de agua y antes de que la cocción se enfríe se moja un lienzo en la cocción y se aplica en la parte afectada mientras esta caliente, se repite esta operación de 5 a 7 veces con la misma cocción; la cual se calienta tantas veces como sea necesaria.

Vahos: se preparan con hierbas aromáticas, las cuales se hierven en agua. El vapor que se desprende del recipiente una vez retirado éste del fuego, es el que debe ser inhalado

Extracción alcohólica: consiste en mezclar la planta y alcohol potable de 96° con una relación en peso de uno a uno: se deja reposar durante 7 días. Se filtra o no y a partir del octavo día está listo para usarse.

Gargarismos o colutorio: se utiliza una cocción a razón de un gramo por 100 ml de agua, después de colar y entibiar se hacen gárgaras y generalmente no se toma el líquido. Este tratamiento se repite cada 4 o 6 horas con planta nueva cada vez.

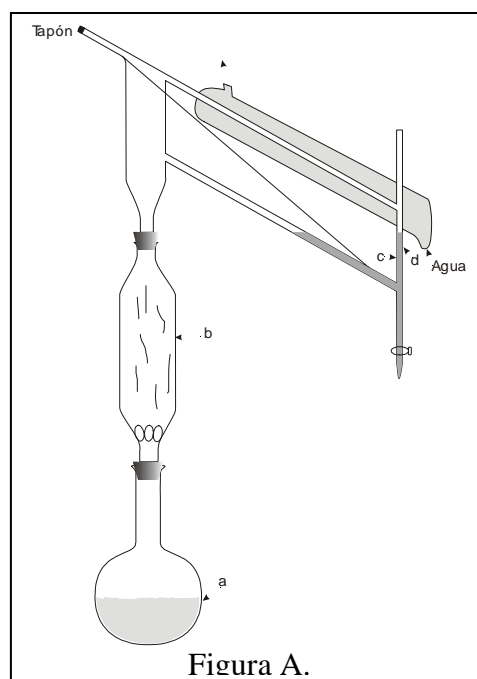
Baños: Es una cocción a razón de un gramo por 100 ml de agua con la cual una vez colada, en este caso de que así se prefiriera, se impregna todo el cuerpo mientras está caliente, se realiza generalmente en la noche, antes de dormir (Soriano, 1994)

APÉNDICE 2

OBTENCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES POR DESTILACIÓN MEDIANTE ARRASTRE DE VAPOR (Vogel, 1989)

Los aceites esenciales se obtienen por la técnica de destilación por arrastre de vapor a partir de material vegetal lo mas fresco posible, en este método se explota la característica que poseen las esencias de presentar bajas presiones de vapor por lo tanto pueden ser arrastradas por sustancias que poseen presiones de vapor mas altas. El aparato a utilizar es el mostrado en la figura A.

Empleando este aparato se pueden destilar por arrastre de vapor continuo de 100 a 500 g de planta fresca, con buena recuperación de esencia. 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 la esencia y el destilado; se colecta la esencia ó la mezcla esencia-éter, se refrigera a 0 °C por 24 hrs para separar el éter de la mezcla. La cantidad de aceite se puede medir en una micropipeta (Domínguez, 1973).



En este caso se pesará 500 g. de la planta y se obtendrán los aceites por arrastre de vapor a partir de material vegetal lo más fresco posible (Domínguez, 1973; Vogel, 1989).

APÉNDICE 3

CUANTIFICACIÓN DE SÓLIDOS (González y Peñalosa, 1981 modificado).

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

- a) Pesar en la balanza analítica determinada cantidad de muestra (peso seco de la muestra)
- b) Realizar la extracción de sólidos utilizando cualquier técnica (en este caso, arrastre de vapor, o percolación)
- c) Esperar que el exceso de solvente se haya evaporado, entonces se pesa un frasco vacío y previamente etiquetado.
- d) se coloca la muestra (aceites esenciales o extracto según sea el caso) y se pesa nuevamente el frasco.

Los sólidos se calculan por diferencia entre el peso del frasco vacío y el peso del frasco con la muestra.

APÉNDICE 4

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS HERBALES POR PERCOLACIÓN.

(Lin *et al.*, 1999)

Se coloca la planta (parte aérea seca) molida o “picada” en un embudo de vidrio el cual contiene un tapón de gasa o de algodón que permite que no se mezcle la planta con el recipiente de vidrio se le agrega los siguientes disolventes: hexanos, acetato de etilo, metanol, este orden está determinado de acuerdo a su polaridad (de menor a mayor). Se le añade suficiente disolvente empezando con el compuesto no polar en este caso el disolvente de hexano, hasta que el disolvente salga transparente siguiéndole el solvente de acetato de etilo de mediana polaridad y por último el metanol que es polar. Una vez obtenido cada uno de los extractos, se destila el exceso de solvente, (en este caso en un rotavapor a presión reducida) y se coloca en charolas de vidrio para llevar a sequedad a temperatura ambiente.

APÉNDICE 5

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR O DE KIRBY-BAUER

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

El método utiliza para evaluar la actividad antibacteriana de los preparados herbales, y las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas, la metodología es la siguiente:

MEDIO. Se utiliza 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 4 mm. Si es mas fino, los antibióticos tienden a difundir mas en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de mas de 4 mm de espesor produce una mayor difusión de antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

Nota: Para la levadura *Candida albicans*, se utilizó el agar dextrosa Sabouraud.

INOCULO. Con una 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*, *Shigella boydii* etc.). Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260), se enjuaga bien 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 Mc Farland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml.

El estándar 0.5 de Mc Farland se prepara añadiendo 0.5 ml de cloruro de bario 99.5 H₂SO₄ 0.36 N (Hendrickson, 1987). La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o en su defecto con un espectrofotómetro (Spectronic 21 Milton Roy) a 660 nm.

Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina 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 Müller-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 estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, la placa de Müller-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 utilizarán pozos y sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman N° 5 (los pozos se utilizarán con los extractos no polares; los sensidiscos se utilizarán para evaluar biológicamente los extractos de polaridad intermedia, alta y las fracciones separadas mediante cromatografía). En todos los casos se harán las diluciones necesarias para que los pozos y los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto (2 µg/ 10 µl).

PREPARACIÓN DE MUESTRAS. Para el bioensayo preliminar el vehículo será agua destilada. En cuanto a la evaluación de las fracciones, los sensidiscos se impregnarán con las soluciones valoradas de la muestra hasta llegar a la concentración deseada de sustancias (2 mg por disco); en este caso se utilizarán solventes como el metanol y el acetato de etilo para solubilizar los compuestos, para posteriormente impregnar los discos dejando evaporar el solvente durante 24 horas.

CONTROLES NEGATIVOS. Para los bioensayos preliminares se utilizarán sensidiscos con los diferentes solventes (metanol y acetato de etilo) dejándolos

evaporar durante 24 hrs. Al igual que los experimentales, para los extractos no polares se utilizará aceite de olivo estéril.

CONTROL POSITIVO. Se evaluará la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos con 25 µg cloramfenicol.

INCUBACIÓN. Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad. Se colocan en una estufa (aparato de laboratorio con termostato 9 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 LOS RESULTADOS. Se miden Las zonas de inhibición con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, la prueba se realizará por triplicado y se reportarán los valores promedio en mm.

APÉNDICE 6

AISLAMIENTO DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.

Se realizó una partición dirigida, la partición consiste en agregar al extracto el disolvente de metanol para eliminar compuestos con afinidad polar, Se realizó una cromatografía de columna, con la partición hexánica de tallo.

Cromatografía

Las técnicas cromatográficas es una técnica de separación que se basa en la diferencia del coeficiente de distribución de los componentes de una mezcla, entre dos fases que pueden ser:

- (1). Una fase sólida y una fase líquida como en la cromatografía de adsorción (columna y placa delgada), o
- (2). Dos fases líquidas, una móvil y una inmóvil como en la cromatografía en papel (partición). (Soledad, 1994)

Cromatografía en capa fina y de columna. Para la separación por placas finas se utilizaron cromatofolios de gel sílice (ALUGRAM SIL g/uv²⁵⁴); para las cromatografías en columna se utilizaron sílica gel malla 60-GF 254.

En la cromatografía de capa fina se acostumbra reportar el valor de R_f que representa la relación entre la velocidad de migración de la sustancia a investigar y la velocidad de migración del frente del disolvente.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la sustancia}}{\text{Distancia recorrida por el frente del disolvente}}$$

El valor del R_f de las sustancias es una constante para un sistema cromatográfico determinado. (Soledad, 1994)

Los compuestos separados por placa de CCF se hacen visibles, sea utilizando métodos generales o específicos. Así, la luz ultravioleta detecta los compuestos

fluorescentes; han de examinarse a la luz ultravioleta de onda larga (365 nm) y corta (263 nm). Los compuestos que causan extinción de la fluorescencia se detectan empleando absorbentes impregnados. Los reactivos de yodo, Dragendorff y el sulfato sérico (utilizado en este caso para determinar si el compuesto estaba realmente puro) que requiere el calentamiento de la CCF a 100 °C durante tiempo variable (5-10 minutos).

Para separar los compuestos activos, se determinó la mezcla de solventes (fase móvil) y el soporte (fase estacionaria) para obtener la mejor separación en cromatografía de placa fina y así poder extrapolar estos resultados en el montaje de la cromatografía de columna.

Una vez comprobada la actividad antibacteriana de la fracción 3 se determinó la pureza del compuesto por cromatografía en placa fina, usando la mezcla hexano-AcoEt (95-5) y revelada con sulfato sérico. La cromatografía mostró una sola mancha.

DETERMINACIÓN DE PUNTO DE FUSIÓN. Se utilizó un aparato para medir el punto de fusión Fischer-Johns

ELUCIDACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS. Se realizó mediante estudios espectroscópicos:

El espectro de Infrarojo y el espectro de ultravioleta fueron obtenidos en los equipos marca perkim elmer, modelo spectrum 2000 y lambda 2S respectivamente.

Los espectro de resonancia magnética nuclear protónica (RMN¹H), y de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN¹³C) fueron obtenidos en los equipos Varian Unity VXR-300s, y Jeol eclipse 300, los cuales se operaron a una frecuencia de 300 y 75.44 MHz, respectivamente y en un aparato FT-NMR Varian PIOS 500, que trabajó a una frecuencia de 500 MHz (para RMN¹H) y 125.7 MHz (para RMN ¹³C). Los espectro se obtuvieron en CDCL₃; los

desplazamientos químicos se expresan en unidades de ppm (δ). En el caso de los espectros de RMN¹H, las constantes de acoplamiento (J) se obtuvieron directamente del espectro y se reportan en Hertz (Hz).

El espectro de masas se determinó en un aparato Jeol JMS-SX102A mediante la técnica de Ion normal (MF-Linerar).

APÉNDICE 7
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y
CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) MEDIANTE LA
MICROTECNICA DE DILUCIÓN EN CALDO

(Koneman, 1985 modificado).

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.

a) Preparación de reactivos y diluciones.

La microplaca se prepara colocando 50 µl de caldo Müller–Hinton (Bioxon 260) en cada pozo con las concentraciones del extracto o fracciones a probar en las concavidades apropiadas. Las concentraciones utilizadas serán: 0.075, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 0.5 y 2.0 mg/ml. Se deja 24 horas para que se evapore el solvente en el que se disolvió el extracto, cada bioensayo se realiza por triplicado manejándose un control positivo cloramfenicol (25 µg/ml) y un negativo utilizando el solvente en el que se disuelve el extracto.

b) La inoculación e incubación de los tubos. Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 ml de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) y se incuba a 35°C durante 18 a 24 horas (produciendo una concentración bacteriana de aproximadamente 10^8 organismos) y se diluye 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 colocan 50 µl de esta suspensión diluida.

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

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

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

Para la **Concentración Bactericida Mínima (CBM)** se utilizará el método modificado de dilución en agar, cada bioensayo se realizará por triplicado.

d) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA
(Finegold y Jo Baron, 1989)

Para medir la capacidad de un microbio para matar a un organismo se realiza la prueba de actividad bactericida se emplea 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 inoculara en una placa de agar de Müller-Hinton (Bioxon 110-1) para determinar el número real de unidades formadoras de colonia (UFC) del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la inoculación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación del factor de dilución.

Luego de haber determinado la CIM se siembra una cantidad conocida del inóculo (usualmente 0.1 ml) tomado de cada uno de los tubos de caldo que no presentan turbidez luego de la incubación, en placas de agar Mueller-Hinton. El número de colonias que se desarrolla en estos subcultivos luego de incubar

durante 18 horas se compara con el número de UFC/ml del cultivo original. En aquellos tubos que no presenten turbidez, los microorganismos permanecerán viables o bien, habrán sido destruidos por el agente microbiano. Debido a que incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0.1% del inóculo original, se denomina Concentración Bactericida mínima (CBM).