



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

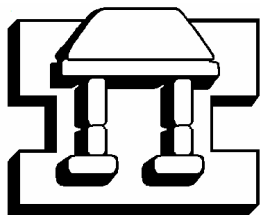
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Actividad Antibacteriana de *Piqueria trinervia* Cav. Sobre
Algunas Bacterias Enteropatógenas

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO
PRESENTA
GUILTELE DALIA GOLDHABER PASILLAS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO
DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

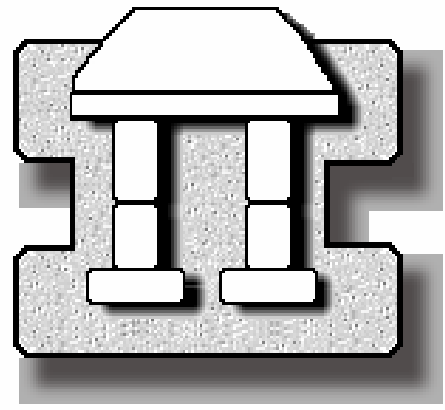


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE FITOQUÍMICA
UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

TESIS

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Piqueria trinervia* Cav. SOBRE
ALGUNAS BACTERIAS ENTEROPATÓGENAS”.**

GOLDHABER PASILLAS GUTELE DALIA
DIRECTOR: DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO
RESPONSABLE DE PROYECTO: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. José Guillermo Avila Acevedo** y al **Dr. Manuel Jiménez Estrada** por aceptar dirigir mi trabajo, por toda la atención, paciencia y tiempo y sobre todo por la gran amistad y cariño.

A las maestras **Biol. Edith López Villafranco, M. en C. Margarita Canales Martínez y M. en C. Claudia Tzazná Hernández Delgado** por la revisión de este trabajo y sobre todo por el gran apoyo y cariño que siempre recibí de ellas.

A todo el Laboratorio de Fitoquímica; a **Ana María García Bores, Andrés Martínez Cortés, Gabriel Martínez Cortés, José Luis Muñoz López, Rodolfo Barroso Villegas y José Luis Carrillo Hernández** por todo el cariño y la ayuda.

Al proyecto **CONACyT** "Obtención y caracterización de compuestos con actividad antiadherente y antimicrobiana de extractos acuosos de plantas medicinales empleadas para curar la diarrea" con No. de referencia 38608M por las facilidades y el apoyo otorgados.

A mis hermanos que tanto amo **Heidi, Liz, Gwendy, Estefi, Jonathan y Edith**, a mis papás que tanto extraño **Paty y Lalo**, a mis abuelos **Silvia y Moisés**, a mis tíos **Vale, Moy, Armando y Pita**, a mis sobrinas hermosas **Michelle, Maryfer y Regina** y a mis primos **Armando, Diego, Moy y Gaby**.

A mis amigos **Corina, Erika, Maloso, Ray, Claudio, Omar y Fili**.

La mort des amants

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE GRÁFICAS	8
ÍNDICE DE ESPECTROS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	16
ENFERMEDADES INFECCIOSAS GASTROINTESTINALES DE ORIGEN BACTERIANO EN MÉXICO	20
PRODUCTOS NATURALES COMO ANTIMICROBIANOS	22
CERAS.....	22
MONOTERPENOS	22
TAXONOMIA DE <i>Piqueria trinervia</i> Cav.....	24
DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL GÉNERO <i>Piqueria</i>	24
DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE <i>Piqueria trinervia</i> Cav.....	25
ANTECEDENTES DE <i>Piqueria trinervia</i> Cav	30
A. HISTÓRICOS	30
B. ETNOBOTÁNICOS.....	30
C. QUÍMICOS	32
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS PARTICULARES	34
METODOLOGÍA	35
I. RECOLECCIÓN DE LA PLANTA.....	35
II. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	35
1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.....	35
2. CUANTIFICACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES DE TODOS LOS EXTRACTOS.....	35
3. BIOENSAYOS PRELIMINARES DE RAÍCES, TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS.....	36
4. MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LOS BIOENSAYOS	36
III. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS	37

1.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MANERA CUALITATIVA	37
2.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MANERA CUANTITATIVA. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	37
IV.	ESTUDIO FITOQUÍMICO	37
1.	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	37
2.	BIOENSAYOS PARA EL FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE TALLOS	38
3.	FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS.....	38
4.	EQUIPO USADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS.....	38

RESULTADOS 39

I.	DATOS DE HERBARIO DE <i>P. trinervia</i> Cav.....	39
II.	EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS RAÍCES, TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS	39
1.	RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE RAÍCES, TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS.....	39
2.	BIOENSAYOS PRELIMINARES DE RAÍCES, TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS.....	40
III.	EXTRACTOS DE TALLOS	43
1.	RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS	43
2.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE TALLOS	44
A.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MANERA CUALITATIVA	44
B.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MANERA CUANTITATIVA. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	45
IV.	EXTRACTOS DE HOJAS E INFLORESCENCIAS	46
1.	RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS	46
2.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS E INFLORESCENCIAS.....	46
A.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MANERA CUALITATIVA	46
B.	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MANERA CUANTITATIVA. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	48
V.	ESTUDIO FITOQUÍMICO	49
1.	AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS.....	49
2.	BIOENSAYOS PARA EL FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE TALLOS	50
3.	ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICOS DE TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS.....	54
A.	PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE TALLOS	54
B.	ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE TALLOS.....	54
C.	PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE HOJAS E INFLORESCENCIAS.....	55
D.	ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE HOJAS E INFLORESCENCIAS.....	55
E.	PROPIEDADES FÍSICAS DEL 3-metil-2-buten-1-ol.....	60
F.	DERIVADOS DEL 3-metil-2-buten-1-ol	61

DISCUSIÓN.....	62
CONCLUSIONES.....	66
PERSPECTIVAS	68
APÉNDICES.....	69
APÉNDICE 1. CUANTIFICACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES.....	69
APÉNDICE 2. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR DE KIRBY-BAÜER	70
APÉNDICE 3. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS.	
DILUCIÓN CUANTITATIVA	73
APÉNDICE 4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM)	
Y DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MEDIA (CBM)	
MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN CALDO.....	75
APÉNDICE 5. CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA Y CAPA FINA.....	77
APÉNDICE 6. ESPECTROS.....	78
BIBLIOGRAFÍA	96

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Datos de herbario de <i>P. trinervia</i>	30
TABLA 2. Rendimiento de los extractos de raíces, tallos y hojas e inflorescencias.....	30
TABLA 3. Actividad antibacteriana de los extractos hexánico, de diclorometano y metanólico de hojas e inflorescencias, tallos y raíces.....	32
TABLA 4. Rendimientos obtenidos de los diferentes extractos de tallos.....	35
TABLA 5. Actividad antibacteriana de los extractos metanólico, hexánico y de diclorometano de tallos.....	36
TABLA 6. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y bactericida mínima (CBM) del extracto hexánico de tallos.....	37
TABLA 7. Rangos de CIM y CBM del cloramfenicol.....	37
TABLA 8. Rendimientos obtenidos de los diferentes extractos de hojas e inflorescencias.....	38
TABLA 9. Actividad antibacteriana de todos los extractos de hojas e inflorescencias.....	39
TABLA 10. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y bactericida mínima (CBM) del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	40
TABLA 11. Fraccionamiento del extracto hexánico de tallos.....	41
TABLA 12. Fraccionamiento del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	42
TABLA 13. Concentraciones de las diferentes fracciones obtenidas del extracto hexánico de tallos.....	43
TABLA 14. Evaluación cualitativa (Kirby-Baüer) de las fracciones de la cromatografía en columna del extracto hexánico de tallos.....	44
TABLA 15. Evaluación cualitativa (Kirby-Baüer) de las fracciones de la cromatografía en columna del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	45
TABLA 16. Propiedades organolépticas de las fracciones del extracto hexánico de tallos.....	46
TABLA 17. Propiedades organolépticas de las fracciones del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Ejemplar de Herbario de <i>P. trinervia</i>	17
FIGURA 2. <i>P. trinervia</i> (Mociño, <i>Plantae Novo Hispaniae</i>).....	18
FIGURA 3. Distribución de <i>P. trinervia</i> en América.....	19
FIGURA 4. Distribución de <i>P. trinervia</i> en la República Mexicana.....	20
FIGURA 5. 3-metil-2-buten-1-ol.....	52

ÍNDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. Análisis de varianza de parte de la planta, solvente y tipo de bacteria.....	33
GRÁFICA 2. Desviación estándar, error estándar y media del análisis de varianza de parte de la planta, solvente y tipo de bacteria.....	34

ÍNDICE DE ESPECTROS

ESPECTRO 1. IR de la fracción 53 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	48
ESPECTRO 2. RMN- ¹ H de la fracción 53 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	49
ESPECTRO 3. RMN- ¹³ C de la fracción 53 del extracto hexánico hojas e inflorescencias.....	50
ESPECTRO 4. DEPT de la fracción 53 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	51
ESPECTRO 5. RMN- ¹ H de la fracción 1 del extracto hexánico de tallos.....	69
ESPECTRO 6. RMN- ¹ H de la fracción 3 del extracto hexánico de tallos.....	70
ESPECTRO 7. RMN- ¹ H de la fracción 7 del extracto hexánico de tallos.....	71
ESPECTRO 8. RMN- ¹ H de la fracción 47 del extracto hexánico de tallos.....	72
ESPECTRO 9. RMN- ¹ H de la fracción 129 del extracto hexánico de tallos.....	73
ESPECTRO 10. RMN- ¹ H de la fracción 140 del extracto hexánico de tallos.....	74
ESPECTRO 11. RMN- ¹ H de la fracción 1 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	75
ESPECTRO 12. RMN- ¹ H de la fracción 22 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	76
ESPECTRO 13. RMN- ¹ H de la fracción 27 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	77
ESPECTRO 14. RMN- ¹ H de la fracción 60 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	78
ESPECTRO 15. RMN- ¹ H de la fracción 80 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	79
ESPECTRO 16. RMN- ¹ H de la fracción 96 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	80
ESPECTRO 17. IR de la fracción 27 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	81
ESPECTRO 18. IR de la fracción 60 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	82
ESPECTRO 19. IR de la fracción 80 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	83
ESPECTRO 20. IR de la fracción 96 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.....	84
ESPECTRO 21. RMN- ¹ H de 3-metil-2-buten-1-ol.....	85

RESUMEN

Los usos medicinales de la planta *Piqueria trinervia* Cav. datan del siglo XVI, desde entonces ya se conocían sus propiedades para remediar desórdenes digestivos que incluían fiebres, infecciones intestinales, empacho, diarrea, disentería y paludismo. Sin embargo, hasta la fecha, no se han realizado estudios farmacológicos para determinar su actividad biológica.

Se obtuvieron 9 extractos de diferente polaridad de raíces, tallos y hojas e inflorescencias a partir de 3 kg de planta seca que fue colectada en los meses de octubre del 2001 y del 2002 en el Ajusco, DF. Mediante el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos, de estos, sólo los extractos hexánicos de tallos y hojas e inflorescencias fueron activos sobre 9 cepas bacterianas, que en su mayoría fueron cepas Gram negativas. Se obtuvo la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de ambos extractos sobre *S. boydii*, *S. typhi*, *E. coli*, *V. cholerae*, *B. subtilis* y *S. aureus*. Los extractos se separaron mediante cromatografías de columna y de capa fina, de las cuales se obtuvieron las fracciones activas (5 de tallos y 9 de hojas e inflorescencias) sobre *S. boydii*, *V. cholerae* y *S. aureus*. De acuerdo a los resultados obtenidos en IR, RMN-¹³C, RMN-¹H, HETCOR, COSY y DEPT la fracción 53, que fue una de las más activas, es probable que esté compuesta por una mezcla de ceras y del éster del alcohol 3-metil-2-buten-1-ol.

INTRODUCCIÓN

La flora de México es considerada como una de las más ricas y variadas del mundo, ello se debe a su situación geográfica, lo accidentado de su fisiografía y lo variado de sus climas. Los factores abióticos (precipitación, humedad relativa, luz, temperatura, suelo y altitud) y los bióticos (flora y fauna) son relevantes para entender la distribución de los diversos tipos de vegetación presentes en nuestro país. Se pueden reconocer hasta 10 tipos básicos de vegetación, los cuales a su vez incluyen una gran cantidad de variantes (Rzedowski, 1978; Bravo-Hollis, 1978).

En el territorio mexicano están presentes todos los grandes biomas que se han descrito en la superficie de nuestro planeta. Esta gran diversidad no se debe solamente a la gama de variaciones e interrelaciones fisiográficas, geológicas y climáticas, sino también al hecho de que la vegetación de México participe tanto de los tipos meridionales (sudamericanos), como de los boreales (norteamericano – euroasiáticos), y a la importante participación del componente endémico. El Fondo Mundial para la Naturaleza señala que de las 152 ecoregiones terrestres identificadas en América Latina, 52 se encuentran en México, contribuyendo de manera importante a la biodiversidad (Reyes y Martínez, 2002; WWF, 1999).

La extraordinaria riqueza florística (26 500 especies de las cuales aproximadamente 9 500 son endémicas) y el conocimiento de los grupos humanos, ubica a México en el cuarto lugar mundial y ha permitido que la herbolaria floreciera desde la época prehispánica, además de que una buena parte de esos conocimientos han perdurado en invaluables documentos; entre ellos el Códice de la Cruz-Badiano (*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, de 1552), que fue dictado en náhuatl por el médico indígena Martín de la Cruz, traducido al latín por Juan Badiano e ilustrado con dibujos de las plantas en un estilo típicamente indígena; *El Códice Florentino* redactado por Fray Bernardino de Sahagún entre los años de 1564-65 y 1576-77, que contiene una amplia sección, el libro XI, dedicado exclusivamente a las plantas medicinales de los indígenas mexicanos donde se describen las tradiciones recopiladas de viva voz de los indígenas, además es una obra bilingüe que ofrece la información en náhuatl y en español, y no en latín como era común; *La Historia Natural de la Nueva España* que escribió Francisco Hernández en 1570, médico de cabecera del rey Felipe II y las obras monumentales del médico criollo José Mariano Mociño, escritas ya en el siglo XVI: *Flora mexicana*, *Plantae Novo Hispaniae* y *Flora Guatemalae*. Mociño viajó con Martín Sessé, director de la expedición científica a Nueva

España, recorrió la Nueva España, desde las Californias hasta la ciudad de León en la actual Nicaragua colectando numerosos ejemplares de plantas y animales.

Todos estos conocimientos empíricos han sido transmitidos durante siglos por los diferentes grupos humanos y que continúan siendo los depositarios de este legado. El rescate y la validación de estos conocimientos y recursos biológicos son recientes, pues datan apenas de hace 25 años (Lozoya, 1999).

En México la utilización de plantas alcanza niveles muy altos. Puede suponerse la existencia de 5 000 a 7 000 especies de plantas vasculares, que se utilizan hoy en día por la población del país para muy diferentes fines. En el caso de las plantas comestibles se ha registrado el uso de 6 000 especies y alrededor de 5 000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total). Este número coincide con lo informado en varias regiones del mundo por especialistas en la materia, quienes consideran que una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa (37 000 especies). De las 265 mil especies de plantas superiores que se calcula que habitan el planeta, únicamente se han estudiado en busca de actividad farmacológica entre 5 y 10% de ellas (Caballero, 1990; Huerta, 1997).

A la gran mayoría de estas plantas sólo se les ha investigado algunas de sus propiedades químicas, en ocasiones mediante métodos anticuados. Por esta razón aún se siguen descubriendo en plantas usadas desde hace muchos años con diferentes fines, otros compuestos químicos útiles en farmacéutica. Se cree que sólo 1% de las especies de plantas de los ecosistemas con mayor diversidad biológica del mundo, es decir, las selvas altas perennifolias, han sido estudiadas desde el punto de vista farmacológico (Cordero, 1996).

Se ha estimado que aproximadamente un 80% de los habitantes del mundo confían en la medicina tradicional para sus necesidades primarias de salud, y mucha de esta terapia involucra en la actualidad, el uso de extractos de plantas o sus componentes activos. Como ejemplo, de las 520 nuevas drogas aprobadas entre los años 1983 y 1994, el 39% fueron productos naturales o derivados de éstos y 60-80% de las drogas antibacterianas eran derivadas de productos naturales (Craig, 1999; Harvey, 2000).

Las plantas medicinales son los productos conocidos más antiguos para el cuidado de la salud. Su importancia todavía sigue creciendo aunque varía dependiendo del contexto etnológico, médico e histórico de cada país. Las plantas medicinales también son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no solo cuando los constituyentes de la planta son utilizados directamente como agentes terapéuticos, sino también cuando son utilizados como materia prima para la síntesis de medicamentos o como modelos para los compuestos activos farmacológicamente (OMS, 1996).

Algunas de las principales áreas de investigación para las plantas medicinales son la fitoquímica, la farmacognosia y la horticultura. En el área de la fitoquímica, a las plantas medicinales se les caracterizan sus compuestos activos, los cuales son separados y sometidos a análisis estructurales detallados. La investigación en la farmacognosia de plantas medicinales también se ha involucrado en ensayos de bioactividad, identificación de los potenciales modelos de acción y los sitios blancos para los compuestos fitoquímicos. En el área de horticultura, la investigación de las plantas medicinales se ha enfocado en el desarrollo de la capacidad de crecimiento óptimo en el cultivo. Desde la perspectiva de la fisiología vegetal, existen oportunidades extensivas de investigación básica en plantas medicinales y el estudio de la producción de químicos fitomédicos (Briskin, 2000). Sin embargo, la etnobotánica médica es también un área muy importante, ya que el estudio de las plantas medicinales está basado en el conocimiento popular de ellas.

Las plantas medicinales son usadas básicamente de dos formas diferentes: como mezclas complejas que contienen una amplia gama de constituyentes (infusiones, aceites esenciales, tintes, extractos) y como puros, principios activos definidos químicamente. Los compuestos puros generalmente son empleados cuando los principios activos de una planta medicinal muestran una actividad alta, específica y/o tienen un índice terapéutico pequeño, requiriendo una dosis precisa y reproducible. Por otro lado, el uso de extractos es apropiado para las plantas que muestran una actividad más débil y/o menos actividad farmacológica específica y si el principio activo de una planta medicinal es desconocido (Hamburger y Hostettmann, 1991). Sin embargo, los grupos humanos, en la medicina tradicional, ocupan las plantas medicinales en infusiones.

Los productos naturales son típicamente metabolitos secundarios, producidos por el organismo en respuesta a estímulos externos. Son derivados de plantas, hongos, bacterias, protozoos o insectos. Existen tres tipos de compuestos de defensa básicos: aquellos constitutivamente expresados en ciertas células o tejidos, que tienen un efecto protector debido a su actividad biológica; aquellos constitutivamente expresados pero que requieren de activación bioquímica, compuestos que por sí solos no tienen actividad pero en combinación con otros factores pueden volverse activos y aquellos que son inducibles, los cuales sólo están presentes siguiendo una inducción bioquímica del metabolismo secundario (Strohl, 2000; Verpoorte, 1998).

Los productos naturales están ampliamente reconocidos en la industria farmacéutica por su amplia diversidad estructural así como también por la gran cantidad de actividades farmacológicas. Otro punto de interés es el conocimiento de su estructura, síntesis, uso y el órgano blanco en el organismo (Strohl *op. cit.*; Sneden, 2003).

Los efectos medicinales benéficos de los materiales de las plantas resultan típicamente de combinaciones de productos secundarios presentes en la planta y aunque éstos puedan tener una variedad de funciones en las plantas, es muy probable que su función ecológica pueda tener alguna relación en los efectos medicinales potenciales en humanos. Por ejemplo, los productos secundarios involucrados en la defensa a través de citotoxicidad hacia un patógeno microbiano podrían ser una medicina antimicrobiana útil para los humanos, si no es demasiado tóxico. De igual manera, los productos secundarios involucrados en la defensa contra herbívoros a través de actividad con neurotoxinas, podrían probar efectos benéficos en humanos como antidepresivos, sedantes, relajantes musculares o anestésicos, a través de su acción en el sistema nervioso central. Para promover la supervivencia ecológica de plantas, las estructuras de los productos secundarios han evolucionado para interactuar con blancos moleculares que afectan las células, tejidos y funciones fisiológicas en competencia con microorganismos, plantas y animales. Algunos metabolitos secundarios pueden emplear su acción al asemejarse a metabolitos endógenos, ligandos, hormonas, moléculas transductoras de señales o neurotransmisores y así tener efectos medicinales benéficos en humanos, debido a las similitudes en sus sitios blancos. El desarrollo de similitudes estructurales entre productos secundarios de plantas y de sustancias endógenas de otros organismos podría ser llamado *modelaje molecular evolutivo* (Briskin, 2000).

En contraste a los fármacos sintéticos basados en un solo químico, muchos fitofármacos emplean sus efectos benéficos a través de una acción de adición o sinergia de muchos compuestos químicos que actúan en uno o varios sitios blancos asociados a procesos fisiológicos. Algunos autores han señalado que este efecto aditivo o sinérgico puede ser benéfico al eliminar los problemas de efectos secundarios asociados con la predominancia de un solo compuesto xenobiótico en el cuerpo. También se ha documentado cómo las interacciones sinérgicas han subrayado la efectividad de un gran número de fitofármacos. Éste fenómeno tiene su origen en el papel funcional de los productos secundarios en promover la supervivencia de la planta (Kaufman, 1999; Tyler *et al.*, 1999; Wink, 1999).

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos se pueden definir como un producto del metabolismo microbiano que es capaz de matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos y además es efectivo a bajas concentraciones. Actualmente se conocen más de 5000 antibióticos de los cuales alrededor del 75% son producidos por el género *Streptomyces*.

Los antibióticos deben su toxicidad selectiva a las diferencias entre las células eucariotas y procariontes. Su eficacia tóxica es la consecuencia de su capacidad de inhibir una reacción bioquímica específica y esencial, ya sea para la célula eucariota o para la célula procarionte. Para que el antibiótico ejerza su acción es necesario que llegue al foco infeccioso, penetre en las bacterias (por difusión o transporte activo) y alcance intracelularmente la concentración necesaria. Una vez dentro de la célula el antibiótico puede ser bacteriostático si inhibe la multiplicación de forma reversible, o bactericida si tiene un efecto letal. En general, cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una u otra forma. Algunos ejemplos de antibióticos bacteriostáticos son: macrólidos, tetraciclinas, cloramfenicol; y de antibióticos bactericidas son: betalactámicos, aminoglicósidos, polipeptídicos, polienos (Mateos, 2003).

La intensa presión ejercida sobre los microorganismos a través del uso masivo y creciente de agentes antimicrobianos en el hombre, los animales y en la agricultura, ha creado un problema de resistencia que se está convirtiendo rápidamente en una de las preocupaciones más relevantes en salud pública. Los elementos críticos son los siguientes:

- Patógenos resistentes a los antimicrobianos están reemergiendo y diseminando más rápidamente que en décadas anteriores;
- La resistencia antimicrobiana es un problema global, que afecta a países desarrollados y subdesarrollados, y que rápidamente se disemina entre continentes a través de las personas que hacen viajes internacionales;
- El tratamiento a las infecciones resistentes se dificulta cada vez más, tanto por los altos costos de los agentes de "nueva generación" existentes, como por la pérdida total de efectividad de los agentes antimicrobianos disponibles en los mercados;
- La resistencia antimicrobiana debe ser vista con un enfoque más amplio en el contexto de la salud pública.

Algunos de los factores que favorecen la diseminación de la resistencia se deben a que las bacterias son extremadamente eficientes en multiplicar los efectos de la resistencia, no sólo por el rápido incremento en el número de cepas individuales resistentes, sino también por la diseminación de genes resistentes entre cepas de la misma especie o de diferentes especies por una gran variedad de métodos genéticos (OMS, 1997).

En general se reconocen tres mecanismos principales de transferencia genética: la conjugación celular (*conjugación*), la infección vírica (*transducción*) y la captación de DNA libre (*transformación*) (Davis *et al.*, 1978). Se describen con más detalle de la siguiente manera:

- *Conjugación*: es un mecanismo de transferencia de información genética en bacterias mediado por plásmidos. Uno de los ejemplos más estudiados es la conjugación entre cepas "macho" y "hembra" de *Escherichia coli*. Las cepas macho poseen el plásmido F en forma extracromosómica: cepas F⁺; o integrado al cromosoma bacteriano: cepas Hfr. Las cepas hembra carecen de plásmido F. El plásmido F posee genes que dirigen la síntesis de un pili sexual llamado pili E, el cual permite que las cepas macho establezcan contacto con las cepas hembra para formar un puente conjugacional a través del cual pasa el DNA de la cepa macho a la hembra de manera lineal.

El plásmido F no posee genes de resistencia a antibióticos, pero muchos otros plásmidos conjugativos sí, éstos últimos se denominan plásmidos R y su presencia en las cepas bacterianas posibilita la transferencia horizontal de genes de resistencia. Algunos plásmidos que poseen genes de resistencia a antibióticos no son conjugativos pero pueden ser movilizadas por otro plásmido conjugativo o por bacteriófagos transductores. Los plásmidos también pueden transferirse horizontalmente por transformación.

- *Transducción*: mecanismo de transferencia de información genética en bacterias mediado por bacteriófagos transductores. De acuerdo a su ciclo de vida los bacteriófagos se clasifican en líticos y temperados. Los líticos son aquellos que matan (lisan) a toda bacteria que infectan, liberando progenie viral. Los temperados pueden, dependiendo de condiciones ambientales, optar por cualquiera de dos vías mutuamente excluyentes: lisis o lisogenia. En la lisogenia el fago y la bacteria coexisten en armonía debido a que la expresión de los genes virales estructurales y de lisis se reprimen debido a la acción de una proteína represora codificada por un gen fágico. El DNA de algunos fagos puede replicarse en forma autónoma en tanto que el de otros se integra al cromosoma bacteriano y se replica como parte de éste.

Dentro de los fagos temperados existen algunos que a baja frecuencia (aprox. 10^{-6}) incorporan segmentos de DNA cromosómico o plasmídico en su cápside en lugar de DNA viral; estos fagos se denominan transductores y no poseen DNA propio. Cuando un fago transductor infecta a otra bacteria, le inyecta el DNA bacteriano o plasmídico que, en caso de poseer genes de resistencia, le confieren este fenotipo a la cepa receptora. Para que el DNA bacteriano recibido sea heredado establemente a las bacterias hijas es necesario que sea capaz de replicarse, condición que se logra cuando ese DNA es incorporado al cromosoma bacteriano por recombinación.

- *Transformación*: mecanismo de transferencia de información genética en bacterias mediado por DNA desnudo. Algunas bacterias, como los pneumococos, son capaces de captar naturalmente DNA presente en el medio, el cual puede incorporarse al cromosoma por recombinación. El DNA plasmídico también puede ser captado por transformación (Lewin, 2000).

No todos los organismos poseen estos mecanismos, pero cada uno de ellos ayuda a amplificar la resistencia determinante en el mundo bacteriano (Levy, 2002; Martínez y Baquero, 2002). Dentro de los mecanismos de resistencia a fármacos se encuentran los siguientes (Brooks, 2000):

1. Producción de enzimas que destruyen o modifican al fármaco activo.
2. Cambio de la permeabilidad al fármaco.
3. Alteración estructural del "blanco" del fármaco.
4. Desarrollo de una vía metabólica diferente que pasa por alto la reacción inhibida por el fármaco.
5. Desarrollo de una enzima diferente que todavía puede ejecutar su función metabólica pero es mucho menos afectada por el fármaco.

La resistencia antibiótica se ha convertido en un problema clínico y público en la actualidad. Enfrentando la creciente cantidad de antibióticos en los últimos 60 años, las bacterias han respondido a esta gran cantidad de medicamentos con la propagación de progenie no susceptible a éstos. Es muy claro que los antibióticos son el punto fundamental en la selección de la resistencia bacteriana, el esparcimiento de los genes de resistencia y las bacterias resistentes también contribuye a este problema (Brooks *op. cit*).

ENFERMEDADES INFECCIOSAS GASTROINTESTINALES DE ORIGEN BACTERIANO EN MÉXICO

En México las infecciones gastrointestinales de origen bacteriano se encuentran dentro de las diez primeras causas de muerte dentro de la población indígena, y corresponden a un 1.11% del total de las causas de muerte. Los niños menores de un año son los más susceptibles y existe una gran mortalidad en este grupo cuando no son atendidos oportunamente. El mecanismo de transmisión fundamental es indirecto, a través de los alimentos y el agua. Estas infecciones provocan epidemias en lugares con condiciones de alta población y poca higiene (Claver *et al.*, 2000; INEGI, 2001; Longanga *et al.*, 2000; Sepúlveda, 1994; SSA, 1992; SSA DF, 2000).

Dentro de los organismos más comunes que causan las infecciones gastrointestinales se encuentran: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Shigella spp.*, *Bacillus spp.* y *Yersinia enterocolitica*. Los signos más característicos son gastroenteritis, diarrea, vómitos, fiebres, náuseas, deshidratación, sangrados con pus y enterocolitis (Mims, 1993).

Dentro de la medicina tradicional, en algunas regiones del País, como en el caso de los habitantes de San Luis Potosí, las diarreas se clasifican dependiendo de su origen: calor o frío, por la coloración y contenido de las heces fecales, además de la presencia de dolor abdominal. Es una afección que se presenta sobre todo en época de calor y de lluvias. Las causas de este padecimiento van desde el consumo de alimentos; la cantidad ingerida de ellos; el estado de los mismos; debido a falta de higiene; la sensibilidad de cada organismo (Bye, 2003).

Diversos grupos humanos utilizan como alternativa para el tratamiento de estos padecimientos bebidas preparadas con plantas medicinales en forma de cocimiento, té, agua de uso, macerados e infusiones, acompañadas de algunas prácticas, rezos y ciertas reglas que deben observarse al coleccionar la planta. Algunas de las familias botánicas más frecuentemente utilizadas para estos padecimientos son: Lauraceae, Cistaceae, Simaroubaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae, Puniaceae, Myrtaceae, Brassicaceae, Plantaginaceae, Verbenaceae, Rosaceae, Urticaceae y Lamiaceae por mencionar algunas (Bye *op. cit.*; Nascimento *et al.*, 2000).

Una de las familias botánicas más importantes es la Asteraceae, debido a su contribución con un gran número de plantas para la farmacopea mexicana. Las razones de su importancia incluyen el gran número de especies distribuidas en México y su amplia gama de productos naturales que son útiles en el tratamiento de enfermedades que afligen a los habitantes del México rural. Sin embargo, sólo pocas de las especies utilizadas en la medicina tradicional para tratar estos padecimientos han sido evaluadas clínicamente o estudiadas química y biológicamente para identificar los compuestos activos y determinar sus índices terapéuticos (Heinrich *et al.*, 1998; Longanga, 2000).

PRODUCTOS NATURALES COMO ANTIMICROBIANOS

Aproximadamente 12 000 metabolitos secundarios se han aislado de las plantas superiores y probablemente representen el 10% del total estimado. Algunos como los terpenos, dan a las plantas sus olores; otras son responsables de sus pigmentos. Muchos compuestos son responsables del sabor y algunas hierbas sirven como condimentos de alimentos. Algunos metabolitos secundarios con uso como antimicrobianos son:

CERAS

Se han encontrado en las ceras epicuticulares de hojas de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) la presencia de hidrocarburos de cadena larga y ácidos grasos de naturaleza saturada que tienen propiedades como antimicrobianos y antiforrajeros. Se ha evaluado la actividad antifúngica de los extractos de hojas de esta planta sobre el hongo oportunista *Cryptococcus neoformans* que causa lesiones principalmente en el sistema nervioso en pacientes con SIDA (Sena *et al.*, 2002).

Durante su extracción las ceras van acompañadas de terpenos y esteroides. Los terpenos son activos contra bacterias, hongos, virus y protozoarios. El mecanismo de acción de éstos no se ha comprendido completamente, pero se especula que involucra disrupción de membrana (Cowan, 1999; Kunst *et al.*, 2003).

MONOTERPENOS

Se ha comprobado que los monoterpenos son citotóxicos para los tejidos de las plantas, ya que causan una reducción drástica en el número de mitocondrias intactas y en el aparato de Golgi, impidiendo la respiración y disminuyendo la permeabilidad de la membrana celular (Dey y Harborne, 1991).

La pérdida de K^+ es la primera indicación de daño a membrana en microorganismos. Los monoterpenos como el carvacrol, citronelol, geraniol y timol provocan lisis en células de *Staphylococcus aureus* puesto que provocan la liberación de enzimas autolíticas de las membranas de la pared celular las cuales inducen una lisis eventual. Mientras la activación de las enzimas autolíticas es responsable de este efecto, la lisis también puede deberse al debilitamiento de la pared celular y la ruptura subsecuente de la membrana citoplasmática

debido a la presión osmótica más que a una acción específica en la membrana citoplasmática (Walsh *et al.*, 2003).

El daño parcial de las membranas celulares bacterianas puede alterar su permeabilidad y afectar la habilidad de la membrana para osmoregular la célula adecuadamente o para repeler materiales tóxicos. Consecuentemente, la pérdida de la tolerancia a sales u otros compuestos potencialmente tóxicos pueden ser agentes causales del daño a la membrana en bacterias dañadas (Carson *et al.*, 2002; Walsh *op. cit.*).

TAXONOMIA DE *Piqueria trinervia* Cav.

REINO: PLANTAE
DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA
CLASE: MAGNOLIÓPSIDA
ORDEN: ASTERALES
TRIBU: EUPATORIEAE
FAMILIA: ASTERACEAE
GENERO: <i>Piqueria</i>
ESPECIE: <i>trinervia</i>

(INBio, 1997)

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL GÉNERO *Piqueria*

Son hierbas anuales o perennes o bien arbustos; tallos erguidos o decumbentes, ramificados; hojas opuestas o alternas, pecioladas o subsésiles, de borde entero, aserrado o dentado; capítulos homógamos, pequeños, dispuestos en inflorescencias corimbosas o paniculadas; involucro cilíndrico, ovoide o campanulado, sus brácteas pocas, en una o dos series ligeramente imbricadas, de longitud similar trinervadas y de borde escarioso; receptáculo plano o convexo, desnudo; flores menos de 10, todas hermafroditas, tubulosas, corola blanca, tubo corto, piloso o glanduloso-puberulento, limbo campanulado, brevemente 5-lobado; anteras de base obtusa, sin apéndice en el conectivo; ramas del estilo largas, sobresalientes, claviformes de ápice obtuso, con numerosas papilas; aquenio prismático, con 4 a 10 costillas, vilano ausente o en forma de disco anular deciduo. Comprende 6 especies distribuidas en la República Mexicana, Costa Rica, Guatemala, Panamá Brasil y Haití (Figura 3) y unas 20 especies distribuidas en América tropical (Béjar, 2000; Molina, 1975; Rzedowski y Rzedowski, 1985; Turner, 1997).

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Piqueria trinervia* Cav.

Es una hierba perenne, erguida, hasta de 70 cm de altura; tallo ramificado cilíndrico, de 2 a 4 mm de diámetro, verde-amarillento y frecuentemente rojizo, glabro o puberulento solamente a lo largo de dos hileras longitudinales dísticas; hojas opuestas, peciolo de 2 a 3 mm de largo, caso glabro, lámina lanceolada o angostamente ovada, ápice agudo, borde aserrado, base cuneada, glabras, tri a pentanervadas desde la base; capítulos de 3 a 4 mm de largo, dispuestos en inflorescencias cimoso-corimbosas; brácteas involucrales 4, elípticas, anchas, de ápice redondeado y mucronado, eroso-marginadas, verdes, glabras; flores 4; corola de 1.5 mm de largo, tubo cortísimo, blanco con tinte rojizo, densamente pubescente, lóbulos blancos, glabros; aquenio de ± 1.5 mm de largo, glabro con 4 costillas, vilano ausente (Figura 1 y 2).

Se ha colectado entre 2 300 y 3 000 m de altitud, principalmente en sitios con matorral y pastizal, aunque se extiende al bosque de pino y encino y ocasionalmente al de oyamel. Esta especie se encuentra ampliamente distribuida en México, Centroamérica y Las Antillas (Rzedowski y Rzedowski, 1985) (Figura 3).

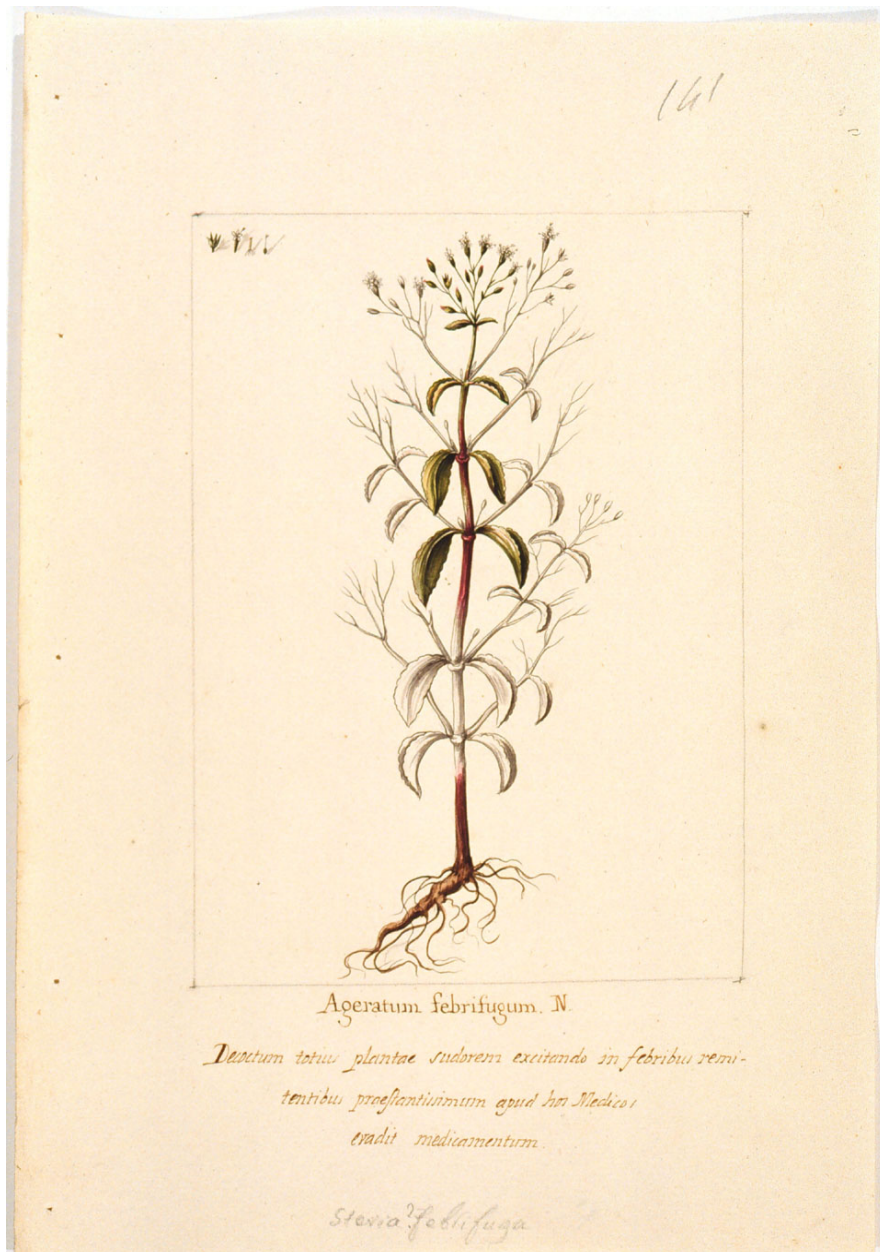


FIGURA 2. *P. trinervia* Cav.
(Hunt Institute for Botanical Documentation, 1997)

Number:	0013
Subject:	Asteraceae. <i>Piqueria trinervia</i> Cav.
Transcription:	<i>Ageratum febrifugum</i> N. -- <i>Stevia? febrifuga</i>
Iconos:	141
Corresp:	DC 551
Ref.:	Prod. 5: 104, 1836. Pl. Nov. Hisp. 135, 1889; ed. 2, 126, 1893.
Notes:	"Decoctum totius plantae sudorem excitando in febris remittentibus praestantissimum apud hos Medicos evadit medicamentum."



FIGURA 3. Distribución de *P. trinervia* en América.
(En los Países de: Costa Rica, Guatemala, Panamá Brasil y Haití).



FIGURA 4. Distribución de *P. trinervia* en la República Mexicana.

(En los Estados de: Guerrero, Oaxaca, Morelos, Durango, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Distrito Federal, San Luis Potosí, Hidalgo, Nayarit, Puebla, Chiapas, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Zacatecas, Aguascalientes, Colima, Querétaro, Tlaxcala, Veracruz, Campeche).

P. trinervia se distribuye en los Estados de: Guerrero, Oaxaca, Morelos, Durango, Jalisco, Michoacán, Estado de México, Distrito Federal, San Luis Potosí, Hidalgo, Nayarit, Puebla, Chiapas, Nuevo León, Tamaulipas, Sinaloa, Zacatecas, Aguascalientes, Colima, Querétaro, Tlaxcala, Veracruz, Campeche (Argueta *et al.*, 1994; Benítez, 1986; Breedlove, 1986; Comisión de Recursos Naturales y Desarrollo Rural, 2002; Galicia, 1992; Martínez, 1979; SEMARNAT, 2002; Turner, 1997)(Figura 4).

Esta especie predomina en hábitats muy diversos debido a que puede vivir en lugares abiertos y soleados. Es encontrada frecuentemente como pionera en sucesiones secundarias que suceden al abandono de campos agrícolas, como ruderal y en lugares abiertos en general (González de la Parra *et al.*, 1981; Mendoza *et al.*, 1994).

ANTECEDENTES DE *Piqueria trinervia* Cav.

A. HISTÓRICOS

Los usos medicinales de *P. trinervia* datan del siglo XVI, donde en el Códice Florentino, menciona su uso para bajar la fiebre, bajo el nombre de *Cuapupoltzin*. Sahagún escribió: "...La raíz, cocida en agua, es benéfica para los que sufren de excesivo calor interno. La decocción en agua debe ser tomada. Entonces el paciente debe comer y evitar tomar cualquier otra agua. Cuando este calor esté purgado y mitigado". Mociño en su obra *Plantae Novo Hispaniae* escrita en el siglo XVI incluye información acerca de los usos que se le atribuyen a esta planta además de incluir dibujos hechos a mano de la misma (Figura 2). Juan de Esteyneffer a inicios del siglo XVIII refiere su uso para el humor colérico. Vicente Cervantes, a finales del mismo siglo la refiere como aromática, estomática, febrífuga y para curar los tabardillos y las fiebres ardientes. A finales del siglo XIX, el Instituto Médico Nacional la relata como antipalúdica y antitérmica. En el siglo XX, Maximino Martínez señala los usos siguientes: antipirético, cálculos de la vesícula, emético, enfermedades exantemáticas y para el pasmo. Luis Cabrera la indica para la bronquitis, enfermedades exantemáticas. Finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México la consigna como antipalúdica, antipirética y para el tifus exantemático (Argueta *et al.*, 1994; Béjar *et al.*, 2000).

B. ETNOBOTÁNICOS

En nuestro País *P. trinervia* presenta la siguiente sinonimia popular: *Tzonixtalli* (náhuatl), Altarreina, Caballo Blanco de Tierra, Flor de San Nicolás, raíz de San Nicolás, San Nicolás, Tabardillo, *yoloxiltic*. En el Estado de México se le conoce como *ph mpa* (otomí), *istactziota*, *pempa*. En Michoacán como *cumanchikua*, *juvhi*, *k'uin*, *k'umanchikua* (purépecha), *yoloquilte* y *cuimic* (náhuatl). En el estado de Morelos como *tzonixtalli* (náhuatl) y en el estado de Oaxaca como *ita xímíría*, *yuku xímíría*. En el estado de Guerrero como *xoxonitzzac*, *xonitzal*, *cualpopolchi*. También presenta la siguiente sinonimia científica: *Ageratum febrifugum* y *Stevia febrifuga* (McVaugh, 2000).

P. trinervia se usa principalmente para el empacho en la región central del país, en estados como Hidalgo, Estado de México, Michoacán y Tlaxcala. Esta enfermedad se describe como indigestión o ahito. Para curarla se prepara una infusión con las flores y la

hoja, si el empacho es de leche, entonces se pica la raíz, se hierve y se toma hasta que obren bien. De igual manera es empleado para el dolor de estómago, se le puede agregar sal o azúcar y tomarlo caliente. El dolor, puede deberse a ingestión de alimentos en exceso o cuando algo "cae mal" al estómago o bien por exceso de trabajo. Contra la disentería en adultos o cuando los niños obran verde, se cuece la planta con tequezquite quemado, se toma hasta que desaparezca el padecimiento. Es empleada para la calentura, síntoma que puede derivar de alguna infección o resfrío, manifestando sudor y delirios. Para bajarla, se machacan las ramas con piedras y se cuele, y se hace un macerado en agua, se administra por el ano cada tercer día. Se emplea en ayunas como agua de uso, cuando la fiebre es por tifo (enfermedad infecciosa transmitida por el piojo humano), se hierven las ramas para darse baños de la rodilla para abajo, además debe tomarse parte de éste caliente. Por otro lado, se maceran las ramas y hojas con alcohol, con esto se frotan las partes afectadas por granos, llamados "ronchas", la persona que aplica el macerado debe estar fumando cigarro y echar el humo en esta parte. Otros padecimientos en los que se emplea *P. trinervia* son: resfrío, catarro, para acelerar el parto, reumas, lavar heridas, sarampión, chincualo de los niños, dolor de oídos, así como para el espanto y mal aire. También se utiliza para aplicar lavativas, en inflamaciones, para la baba cuando brotan los dientes, como estimulante y purgante, contra las lombrices y el paludismo (Argueta *et al.*, 1994).

Otros usos no medicinales que se le atribuyen a *P. trinervia* son: forrajera, donde se utiliza para el pastoreo cerril, ornamental, ritual en las coronas de día de muertos, con los tallos se elaboran juegos pirotécnicos y de uso doméstico, hervida y tomada como té. No se encontraron reportes para la comercialización de la especie (SEMARNAT, 2002).

C. QUÍMICOS

Referencia	Compuesto aislado o utilizado de <i>Piqueria trinervia</i>	Actividad contra
Bohlmann, F. y Zdero, C., (1968)	El terpeno α -santalal.	
Romo, J. et al., (1970)	El acetato de carquejilo y un diol sólido: piquerol A, el acetato de carquejilo y el piquerol B y su acetato, un aldehído terpénico que es el que proporciona por aromatización el 2,3,6-trimetil benzaldehído.	
Bohlman, F. y Suwita, A., (1978)	2 terpenos, el santalal XI y santalol XII y pentainenos y derivados del carquejol.	
González de la Parra, M et al., (1981)	Piquerol A y B.	<i>Bidens odorata</i> , <i>Bidens serrulata</i> , <i>Bromus carinatus</i> , <i>Lepidium virginicum</i> , <i>Lopezia racemosa</i> y <i>Raphanus raphanistrum</i> .
Sangaiah, R. y Krishna Rao, G.S., (1981)	2-metil-3-isopropenilanisola y 2-isopropenil-3-metilanisola.	
Soriano-García, M. et al., (1983)	Estructura cristalina y molecular del Piquerol A.	
Jiménez-Estrada, M y González de la Parra, M., (1983)	El alcohol diterpénico trinervinol.	
Rubio, M. et al., (1985)	Estructura electrónica de los terpenos Piquerol A y B.	
Cruz-Reyes, A. et al., (1989)	Piquerol A.	<i>Fossaria humilis</i> , <i>F. spp.</i> , <i>Physa cubensis</i> , <i>Pseudosuccinea columella</i> y <i>Biomphalaria glabrata</i>
Cruz-Ortega, R. et al., (1990)	Piquerol A y diacetil piquerol.	<i>Ipomoea purpurea</i>
Jiménez-Estrada, M. y Rodríguez, C., (1990)	Piquerol A y diacetil piquerol.	<i>Culex quinquefasciatus</i> , <i>Aedes aegypti</i> y <i>Spodoptera frugiperda</i> .
González de la Parra, M. et al., (1991)	Piquerol A.	<i>Boophilus microplus</i> .
Castro, C. et al., (1992)	Piquerol A.	<i>Trypanosoma cruzi</i> .
Mendoza, J.L. et al., (1994)	Piquerol A y diacetil piquerol.	<i>Pisum sativum</i> .
Soriano-García, M. et al., (1996)	Estructura molecular de la acetónida-3-trinervinona (2.2.4b'.8'.8'-pentametil-6,10 ^{a'} -epoxispiro(1,3-dioxepano-5,2'-perhidrofenantreno)-7'-ona, (C ₂₃ H ₃₆ O ₄)).	
Jiménez-Estrada, M. et al., (1996)	Transformaron el piquerol A en derivados aromáticos: diacetato, alcohol benzílico, derivado dialquil hidroquinona y fenólicos.	<i>Amarantus hypochondriacus</i> . <i>Echinocloa crusgalli</i> .
Jiménez-Estrada, M. y Díaz, E. (1998)	Revisaron la estructura del trinervinol.	

Saad, I. et al., (2000)	El monoterpreno 2-metilen-7,7-dimetilbicyclo (3,3,1) heptano-4,6-diol.	
Béjar, E. et al., (2000)		Hicieron una compilación de plantas mexicanas con compuestos bioactivos utilizados en el siglo XVI en la medicina tradicional de México, mencionando las características químicas, biológicas y etnobotánicas de <i>Piqueria trinervia</i> .

OBJETIVO GENERAL

- ❖ Determinar la actividad antibacteriana de los extractos de *P. trinervia* y realizar un estudio biodirigido tendiente a aislar el o los principios activos responsable(s) de la actividad biológica.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Recolectar *P. trinervia* en su hábitat natural.
- ❖ Obtener extractos de diferente polaridad.
- ❖ Evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos mediante la técnica de difusión en agar (técnica de Kirby-Baüer).
- ❖ Obtener la concentración inhibitoria mínima (CIM) y bactericida mínima (CBM) de los extractos activos.
- ❖ Separar las fracciones activas mediante técnicas cromatográficas biodirigidas para tratar de aislar el o los compuestos activos.
- ❖ Iniciar la identificación de las estructuras químicas de los compuestos activos mediante estudios espectroscópicos.

METODOLOGÍA

I. RECOLECCIÓN DE LA PLANTA

P. trinervia fue recolectada en el Km. 12 de la carretera panorámica al Ajusco, Delegación Tlalpan, México DF en octubre del 2001 y octubre del 2002; se depositó un ejemplar en el herbario IZTA para su identificación y No. de registro 28245 (Herbario IZTA).

II. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Los extractos se obtuvieron por maceración de raíces, tallos y hojas e inflorescencias de acuerdo al siguiente procedimiento: se colocaron 200 g de material vegetal seco y molido en un matraz de 4 lts y se cubrió completamente con 2.5 lts de hexano, la mezcla se dejó reposar durante 24 hs, posteriormente se filtró y se destiló a sequedad bajo presión reducida en un rotavapor, de esta manera se obtuvo el extracto hexánico, repitiendo esta operación hasta agotar la extracción. Para obtener los extractos metanólico y de diclorometano de diferentes partes de la planta se llevó a cabo la misma técnica.

2. CUANTIFICACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES DE TODOS LOS EXTRACTOS

La cuantificación de sólidos solubles se realizó de acuerdo al método propuesto por González-Peñalosa (2000) (Apéndice 1).

3. BIOENSAYOS PRELIMINARES DE RAÍCES, TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS

El método que se utilizó para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos preliminares de las diferentes partes de *P. trinervia*, fue el de difusión en medio sólido (Kirby-Baüer) mediante la técnica de Barry y Thornsberry (1987) modificada por Avila, (1996) (Apéndice 2). La concentración de los extractos en los sensidiscos fue de 2 mg/sensidisco. Los bioensayos se realizaron por triplicado.

Los resultados de los bioensayos preliminares se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza de tres factores (solvente, parte utilizada de la planta y tipo de bacteria; Gram positiva y Gram negativa) para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre éstos. Posteriormente se realizó la prueba de Tukey para determinar las diferencias estadísticas entre las medias de los factores.

4. MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN LOS BIOENSAYOS

Los microorganismos que se utilizaron fueron: ***Escherichia coli* ATCC 25922**, ***Vibrio cholerae* CDC V12** (El Tor), ***Escherichia coli* Mr** (Multidrogo resistente), ***Yersinia enterocolitica*** y ***Staphylococcus aureus* Mr** (donadas por el Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI de la FES Iztacala), ***Sarcina lutea*** y ***Staphylococcus epidermidis*** (donadas por el Laboratorio de Microbiología de la FES Cuautitlán), ***Enterobacter agglomerans* ATCC 27155**, ***Salmonella typhi* ATCC 19430**, ***Staphylococcus aureus* ATCC 12398**, ***Vibrio cholerae* (CDC V12)** aislada de un caso clínico (esta cepa corresponde al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba, biotipo El Tor), ***Shigella boydii* ATCC 8700**, ***Vibrio cholerae* INDRE 206** aislada de agua contaminada, ***Vibrio cholerae* No.01**, ***Enterobacter aerogenes*** y ***Bacillus subtilis***, (donadas por el Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, INIFAP).

III. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS

1. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MANERA CUALITATIVA

Para determinar la actividad antibacteriana de los extractos hexánicos de hojas e inflorescencias y tallos sobre bacterias Gram negativas y positivas se utilizaron las cepas antes mencionadas (I.4).

2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MANERA CUANTITATIVA. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto hexánico, se utilizó el método de dilución en caldo reportado por Jones *et al* (1987), citado y modificado por Avila (1996) (Apéndice 3). Las concentraciones utilizadas para los bioensayos cuantitativos fueron las siguientes: 0.160, 0.32, 0.64, 1.25 y 2.5 mg/ml. Todos los experimentos se hicieron por duplicado.

IV. ESTUDIO FITOQUÍMICO

1. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Las cromatografías de adsorción en columna abierta y cromatografía de capa fina se realizaron de acuerdo a la metodología descrita en el Apéndice 5.

2. BIOENSAYOS PARA EL FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE TALLOS

A todas las fracciones que se obtuvieron en el proceso de separación del extracto hexánico se les determinaron su actividad antibacteriana. Lo anterior con el objeto de seleccionar y analizar sólo las fracciones que presentaban dicha actividad, para posteriormente tratar de aislar el o los compuestos responsables de la acción antimicrobiana.

La metodología utilizada para evaluar la actividad de las fracciones fue la de difusión en agar (Kirby-Baüer). Los microorganismos utilizados para el fraccionamiento biodirigido fueron: *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* CDC V12 y *Staphylococcus aureus*. Los bioensayos se realizaron por duplicado. Las concentraciones de las fracciones dependieron del rendimiento obtenido a partir del fraccionamiento en la cromatografía de columna.

3. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS

El extracto hexánico de tallos (2 gr) y hojas e inflorescencias (1 gr) se preadsorbieron en celita para fraccionarlos en una cromatografía en columna abierta con 30 gr de sílica gel. Las columnas se eluyeron con mezclas de hexano y acetato de etilo aumentando gradualmente la polaridad (ver Tabla 6 y 8).

4. EQUIPO USADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICAS ESPECTROSCÓPICAS Y ESPECTROMÉTRICAS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono-13 (RMN-¹³C) fueron obtenidos en los equipo Varian Unity VXR-300s, y Eclipse 300 Jeol, los cuales se operaron a una frecuencia de 200 y 300 MHz (RMN-¹H) y 75.44 MHz (RMN-¹³C). Los espectros se obtuvieron en cloroformo deuterado (CDCl₃), los desplazamientos químicos se expresan en unidades de ppm con respecto al tetrametilsilano (TMS) que se usó como referencia interna. Los experimentos DEPT, COSY y HETCOR se realizaron en un aparato Eclipse 300 Jeol. Los espectros en el Infrarrojo se obtuvieron en un aparato de rejilla Perkin-Elmer modelo 599B y en un aparato Nicolet FT-5X, las muestras se corrieron en solución clorofórmica.

RESULTADOS

I. DATOS DE HERBARIO DE *P. trinervia* Cav.

Familia Asteraceae
N.C. <i>Piqueria trinervia</i> Cav.
N.P. "Hierba de San Nicolás"
No. registro 28245 (Herbario IZTA)

TABLA 1. Datos de herbario de *P. trinervia* Cav.
N.C. = Nombre Científico. N.P. = Nombre Popular.

II. EVALUACIÓN PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA RAÍCES, TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS

1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS DE RAÍCES, TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS

Los rendimientos por extracto, por parte de la planta y solvente se muestran en la siguiente tabla:

RENDIMIENTOS						
	Hexano		Diclorometano		Metanol	
	(gr)	%	(gr)	%	(gr)	%
Raíces	1.00	1.03	0.20	0.20	2.42	4.05
Tallos	2.42	4.84	4.60	1.08	1.98	3.69
Hojas e inflorescencias	1.10	0.63	2.20	1.27	10.02	16.70

TABLA 2. Rendimiento de los extractos de raíces, tallos y hojas e inflorescencias.

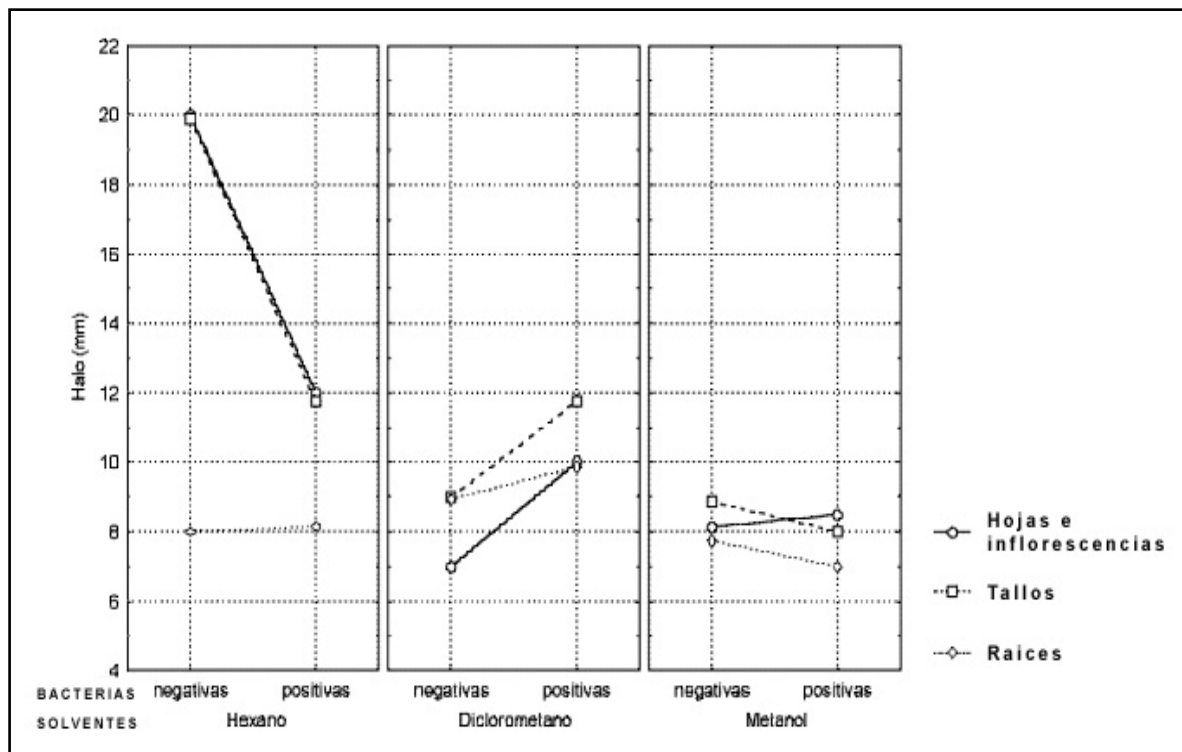
2. BIOENSAYOS PRELIMINARES DE RAÍCES, TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS

Los resultados se muestran en la Tabla 3. Los datos obtenidos en este bioensayo mostraron que todos los extractos presentaron actividad antibacteriana; y de estos el extracto hexánico de tallos fue el que obtuvo los valores más altos de halos de inhibición, siendo las bacterias Gram negativas las más sensibles.

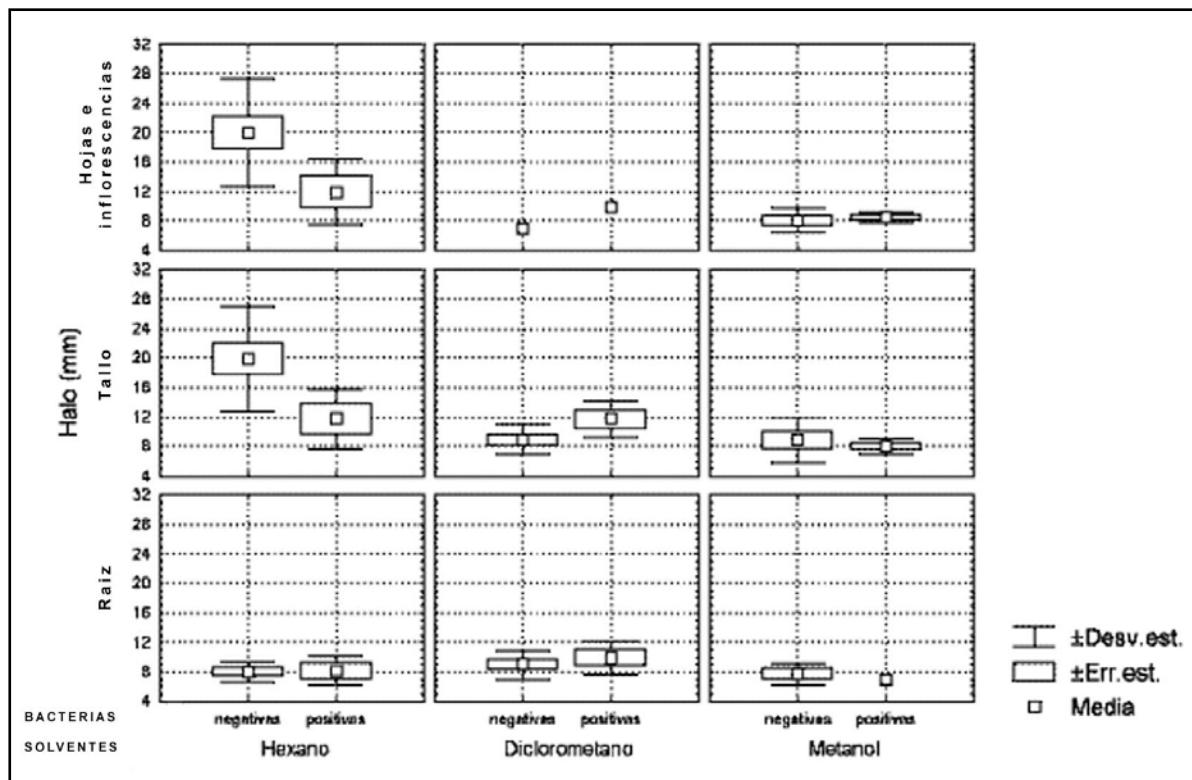
BACTERIA	C+	Hojas e Inflorescencias Hexano	Tallos Hexano	Raíces Hexano	Hojas e Inflorescencias CH₂Cl₂	Tallos CH₂Cl₂	Raíces CH₂Cl₂	Hojas e Inflorescencias MeOH	Tallos MeOH	Raíces MeOH
<i>B. subtilis</i>	16.0±0.5	7.0±0.5	7.0±0.5	7.0±0.5	-	11.0±0.5	9.0±0.5	-	7.0±0.5	-
<i>S. aureus</i>	19.0±0.5	14.0±0.5	17.0±0.5	10.5±0.5	-	12.0±0.5	12.0±0.5	9.0±0.5	9.0±0.5	7.0±0.5
<i>S. aureus Mr</i>	10.0±0.5	17.0±0.5	11.0±0.5	-	10.0±0.5	15.0±0.5	11.5±0.5	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	15.5±0.5	10.0±0.5	12.0±0.5	7.0±0.5	-	9.0±0.5	7.0±0.5	8.0±0.5	8.0±0.5	-
<i>S. lutea</i>	31.0±0.5	10.0±0.5	9.0±0.5	10.0±0.5	-	12.0±0.5	13.0±0.5	-	-	-
<i>E. aerogenes</i>	18.0±0.5	9.0±0.5	14.0±0.5	-	-	-	-	7.0±0.5	7.0±0.5	7.0±0.5
<i>E. agglomerans</i>	18.0±0.5	-	10.0±0.5	-	-	-	-	-	-	7.0±0.5
<i>E. coli</i>	18.5±0.5	>25.0	>25.0	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli Mr</i>	18.0±0.5	>25.0	>25.0	7.0±0.5	-	7.0±0.5	7.0±0.5	7.0±0.5	7.0±0.5	-
<i>S. boydii</i>	19.0±0.5	15.0±0.5	17.0±0.5	9.0±0.5	-	10.0±0.5	10.0±0.5	10.0±0.5	11.0±0.5	-
<i>V. cholerae cc</i>	23.0±0.5	>25.0	>25.0	-	-	7.0±0.5	9.0±0.5	7.0±0.5	8.0±0.5	7.0±0.5
<i>V. cholerae CDC V12</i>	24.5±0.5	>25.0	>25.0	-	-	8.0±0.5	9.0±0.5	11.0±0.5	15.0±0.5	-
<i>V. cholerae INDRE</i>	28.0±0.5	>25.0	>25.0	7.0±0.5	7.0±0.5	11.0±0.5	8.5±0.5	8.0±0.5	7.0±0.5	-
<i>V. cholerae No.01</i>	23.0±0.5	>25.0	>25.0	-	-	8.0±0.5	8.0±0.5	-	-	-

TABLA 3. Actividad antibacteriana de los extractos hexánico, de diclorometano y metanólico. Halos de inhibición en mm. Se utilizó una concentración de 2 mg por sensidisco. Este bioensayo se hizo por triplicado. No hubo inhibición del crecimiento (-). Hubo confluencia en los halos de inhibición de tal manera que no fue posible medirlos (>).

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza factorial (Gráficas 1 y 2), se encontró que de los tres factores estudiados (parte de la planta, solvente y tipo de bacteria) la parte de la planta que tuvo un efecto sobre el diámetro del halo de inhibición fueron los tallos ($F=3.01$, $P=0.04$), el solvente adecuado para extraer los compuestos activos fue el hexano ($F=3.84$, $P=0.0006$) y las bacterias más sensibles fueron las Gram negativas ($F=3.84$, $P=0.0263$). El resto de los factores e interacciones no tuvieron un efecto estadísticamente significativo ($P>0.05$). Cabe hacer notar que aunque el extracto hexánico de hojas e inflorescencias presentó menor actividad, ésta no es diferente desde el punto de vista estadístico que la del extracto hexánico de tallos. Sin embargo, si existen diferencias entre ellos en los resultados obtenidos en los bioensayos y por lo tanto es posible que la composición química de ambos extractos sea diferente y es por esto que no se mezclaron estos extractos y se estudiaron de manera separada.



GRÁFICA 1. Análisis de varianza de tres factores. Los factores comparados fueron: parte de la planta, solvente y tipo de bacteria (Gram positiva y Gram negativa). Esta gráfica muestra las tendencias de los factores analizados.



GRÁFICA 2. Desviación estándar, error estándar y media del análisis de varianza de parte de la planta, solvente y tipo de bacteria.

III. EXTRACTOS DE TALLOS

1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS

El rendimiento de los extractos se muestra en la Tabla 4, en este caso se observó que el extracto hexánico obtuvo el porcentaje más alto de rendimiento (4.84%) siguiendo el extracto metanólico (3.69%) y el porcentaje más bajo fue para el extracto de diclorometano (0.63%).

Extracto	Rendimiento (gr)	%
Hexánico	2.42	4.84
Diclorometano	0.45	0.63
Metanólico	1.98	3.69

TABLA 4. Rendimientos obtenidos de los diferentes extractos de tallos (el extracto hexánico está referido a 50 g de planta, el de diclorometano a 71 g de planta seca y el extracto metanólico a 53 g de planta seca).

2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE TALLOS

A. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MANERA CUALITATIVA

Los resultados obtenidos en los bioensayos se muestran en la Tabla 5.

BACTERIA	C+	Hexano	CH ₂ Cl ₂	MeOH
<i>B. subtilis</i>	20±0.5	7±0.5	11±0.5	7±0.5
<i>S. aureus</i>	23±0.5	17±0.5	12±0.5	9±0.5
<i>S. aureus Mr</i>	10±0.5	11±0.5	15±0.5	7±0.5
<i>S. epidermidis</i>	17±0.5	12±0.5	7±0.5	8±0.5
<i>S. lutea</i>	28±0.5	9±0.5	12±0.5	-
<i>E. aerogenes</i>	25±0.5	14±0.5	-	7±0.5
<i>E. agglomerans</i>	22±0.5	10±0.5	-	-
<i>E. coli</i>	25±0.5	>25	-	-
<i>E. coli Mr</i>	20±0.5	>25	7±0.5	7±0.5
<i>S. boydii</i>	15±0.5	17±0.5	10±0.5	11±0.5
<i>S. typhi</i>	30±0.5	>25	-	-
<i>V. cholerae cc</i>	25±0.5	>25	7±0.5	8±0.5
<i>V. cholerae CDC V12</i>	25±0.5	>25	8±0.5	15±0.5
<i>V. cholerae INDRE</i>	25±0.5	>25	8±0.5	7±0.5
<i>V. cholerae No.01</i>	25±0.5	>25	8±0.5	7±0.5
<i>Y. enterocolitica</i>	25±0.5	11±0.5	-	7±0.5

TABLA 5. Actividad antibacteriana de los extractos metanólico, hexánico y de diclorometano de tallos. Halos de inhibición en mm. Se utilizó una concentración de 2 mg por sensidisco. Este bioensayo se hizo por triplicado. No hubo inhibición del crecimiento (-). Hubo confluencia en los halos de inhibición de tal manera que no fue posible medirlos (<).

De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 5, el extracto hexánico fue activo sobre dos bacterias Gram negativas: *Vibrio cholerae* (cuatro cepas), *S. boydii*; y dos bacterias Gram Positivas: *B. subtilis* y *S. aureus*.

B. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MANERA CUANTITATIVA. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Los resultados se muestran en la Tabla 6.

[] µg/ml	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. boydii</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>V. cholerae</i> CDC V12
160	-	-	-	-	-	-
320	-	-	-	-	CIM	CIM
640	-	-	CIM	CIM	CBM	CBM
1250	CIM	CIM	CBM	CBM		
2500	CBM	CBM				

TABLA 6. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y bactericida media (CBM) del extracto hexánico de tallos. [] = Concentración.

Estos resultados pueden compararse con los rangos de CIM y CBM obtenidos del cloramfenicol de acuerdo a Uetrecht y Walmsley (1998) en la Tabla 7:

BACTERIA	CIM (µg/ml)	CBM (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.0 – 5.0	2.0 – 10.0
<i>Vibrio cholerae</i> (cuatro cepas)	2.0	4.0
<i>Salmonella</i>	0.75 – 5.0	1.5 – 10.0
<i>Escherichia coli</i>	3.0 – 50.0	6 – 100.0
<i>Shigella</i>	2.5 – 6.0	5.0 – 12.0

TABLA 7. Rangos de CBM y CMI del cloramfenicol.

IV. EXTRACTOS DE HOJAS E INFLORESCENCIAS

1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS

Se prepararon extractos de diferentes polaridades con las hojas e inflorescencias de la planta. El rendimiento de los extractos se muestra en la Tabla 8. Se observa que el extracto metanólico obtuvo el porcentaje más alto de rendimiento (16.70%) siguiendo el extracto de diclorometano (1.27%) y el porcentaje más bajo fue para el extracto de hexánico (0.63%).

Extracto	Rendimiento (gr)	%
Hexánico	1.10	0.63
Diclorometano	2.20	1.27
Metanólico	10.02	16.70

TABLA 8. Rendimientos obtenidos de los diferentes extractos de hojas e inflorescencias (el extracto hexánico está referido a 50 g de planta, el de diclorometano a 70 g de planta seca y el extracto metanólico a 50 g de planta seca).

2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS E INFLORESCENCIAS

A. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MANERA CUALITATIVA

Los resultados obtenidos en los bioensayos se muestran en la Tabla 9.

BACTERIA	C+	Hexano	CH₂Cl₂	MeOH
<i>B. subtilis</i>	20±0.5	7±0.5	-	-
<i>S. aureus</i>	23±0.5	14±0.5	-	9±0.5
<i>S. aureus Mr</i>	10±0.5	17±0.5	10±0.5	-
<i>S. epidermidis</i>	17±0.5	10±0.5	-	8±0.5
<i>S. lutea</i>	28±0.5	10±0.5	-	-
<i>E. aerogenes</i>	25±0.5	9±0.5	-	7±0.5
<i>E. agglomerans</i>	22±0.5	-	-	-
<i>E. coli</i>	25±0.5	>25	-	-
<i>E. coli Mr</i>	20±0.5	>25	-	7±0.5
<i>S. boydii</i>	15±0.5	15±0.5	-	10±0.5
<i>S. typhi</i>	30±0.5	>25	-	-
<i>V. cholerae cc</i>	25±0.5	>25	-	-
<i>V. cholerae CDC V12</i>	25±0.5	>25	-	7±0.5
<i>V. cholerae INDRE</i>	25±0.5	>25	-	11±0.5
<i>V. cholerae No.01</i>	25±0.5	>25	7±0.5	8±0.5
<i>Y. enterocolitica</i>	25±0.5	9±0.5	-	7±0.5

TABLA 9. Actividad antibacteriana de los extractos metanólico, hexánico y de diclorometano de hojas e inflorescencias. Halos de inhibición en mm. Se utilizó una concentración de 2 mg por sensidisco. Este bioensayo se hizo por triplicado. No hubo inhibición del crecimiento (-). Hubo confluencia en los halos de inhibición de tal manera que no fue posible medirlos (>).

El extracto hexánico fue el que presentó la mayor actividad antibacteriana, siendo activo principalmente frente a bacterias Gram negativas y mostrando halos de inhibición más pequeños frente a bacterias Gram positivas. De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 9, el extracto hexánico fue activo sobre la mayoría de las cepas evaluadas, es notoria la actividad sobre: *Vibrio cholerae* (cuatro cepas), *S. typhi* y *E. coli* (dos cepas).

B. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MANERA CUANTITATIVA. CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Una vez que se determinó cuales extractos presentaron actividad antibacteriana, se obtuvo la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida media (CBM) de los extractos activos. Los resultados se muestran en la Tabla 10. Para el caso de *V. cholerae* CDC V12 hubo la necesidad de reducir las concentraciones utilizadas debido a su gran sensibilidad a este extracto.

[] mg/ml	<i>S.</i> <i>aureus</i> Mr	<i>E.</i> <i>coli</i>	<i>S.</i> <i>typhi</i>	<i>V.</i> <i>cholerae</i> CDC V12
0.02	-	-	-	-
0.04	-	-	-	-
0.08	-	-	-	CIM
0.16	-	-	CIM	CBM
0.32	CIM	-	CBM	
0.64	CBM	CIM		
1.25		CBM		
2.50				

TABLA 10. Concentración inhibitoria mínima (CIM) y bactericida media (CBM) del extracto hexánico de hojas e inflorescencias. [] = Concentración. (-) No hubo inhibición del crecimiento.

V. ESTUDIO FITOQUIMICO

1. AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS

El extracto hexánico de tallos fue el que presentó los valores más altos de halos de inhibición, por lo tanto, se procedió a separar los componentes de esta mezcla y así tratar de aislar el o los compuestos activos. Para desarrollar el sistema cromatográfico se seleccionó la fase móvil y la fase estacionaria más adecuada para la separación mediante cromatografía de columna seca (ver Apéndice 4). Se obtuvieron un total de 233 fracciones (Tabla 11). El fraccionamiento fue verificado mediante cromatografía de capa fina.

Eluyente	Proporción (100%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso (g)
Hexano	100	1-40	1-2	0.55
			3-6	0.01
			7-9	0.01
			10-32	0.09
			33-40	0.03
Hexano-AcOEt	90:10	41-113	41-42	0.24
			43-46	0.05
			47-64	0.11
			64-84	0.29
			85-113	0.09
Hexano-AcOEt	85:15	114-139	114-128	0.11
			129-139	0.01
Hexano-AcOEt	80:20-75:25	140-160		0.10
Hexano-AcOEt	70:30	161-192		0.09
Hexano-AcOEt	60:40	193-206		0.16
Hexano-AcOEt - AcOEt	50:50	207-232		0.23
	100			
MeOH	100	233		0.14

TABLA 11. Fraccionamiento del extracto hexánico de tallos.

También se separó mediante cromatografía de columna abierta el extracto de hexánico de hojas e inflorescencias. Se procedió de la misma manera que para el extracto hexánico de tallos. Se recolectaron 166 fracciones y se agruparon las fracciones similares (Tabla 12). El fraccionamiento fue verificado mediante cromatografía de capa fina.

Eluyente	Proporción (100%)	Fracciones recolectadas	Fracciones combinadas	Peso (g)
Hexano	100	1-18	1	0.36
			2	0.03
			3-4	0.01
			5-10	0.07
			11-21	0.06
Hexano-AcOEt	95:5-90:10	20-61	22-26	0.35
			27-52	0.58
			53-59	0.21
Hexano-AcOEt	85:15-80:20	63-87	60-79	0.06
			80-95	0.22
Hexano-AcOEt	70:30	88-111	96-108	0.10
			109-117	0.06
Hexano-AcOEt	60:40	112-134	118-119	0.12
			120-140	0.14
Hexano-AcOEt	50:50	136-150	141-145	0.02
AcOEt	100	155-165	146	0.02
MeOH	100	166	166	0.21

TABLA 12. Fraccionamiento del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.

2. BIOENSAYOS PARA EL FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE TALLOS

Debido a los bajos rendimientos de cada una de las fracciones obtenidas del extracto hexánico de tallos, se evaluaron diferentes concentraciones por sensidisco. Las concentraciones de las fracciones que se aplicaron a cada sensidisco se muestran en la Tabla 13. Para evaluar la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas a partir del extracto hexánico de hojas e inflorescencias se utilizó como concentración 1 mg por sensidisco.

No. de fracción	Concentración por sensidisco (µg)
1	100
3	10
7	10
10	10
33	100
41	10
43	100
47	100
65	10
84	100
114	10
129	100
140	10
161	100
193	100
207	100
233	10

TABLA 13. Concentraciones de las diferentes fracciones obtenidas del extracto hexánico de tallos.

Se evaluaron todas las fracciones obtenidas del extracto hexánico de tallos sobre *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* CDC V12 y *Staphylococcus aureus*. De las 17 fracciones obtenidas sólo las fracciones 1, 3, 7 y 129 tuvieron actividad antibacteriana sobre *S. boydii* y *S. aureus*, además las fracciones 47 y 140 tuvieron actividad sólo sobre *S. aureus*. Es interesante hacer notar que ninguna de las fracciones tuvo actividad antibacteriana sobre *V. cholerae* CDC V12. En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos del bioensayo de las fracciones del extracto hexánico de tallos.

FRACCIÓN	<i>S. aureus</i>	<i>S. boydii</i>	<i>V. cholerae</i> CDC V12
Cloramfenicol	15±5	19±5	25±5
1	7±5	9±5	-
3	4±5	10±5	-
7	10±5	10±5	-
33	-	-	-
41	-	-	-
43	-	-	-
47	10±5	-	-
65	-	-	-
85	-	-	-
114	-	-	-
129	10±5	9±5	-
140	9±5	-	-
161	-	-	-
193	-	-	-
207	-	-	-
233	-	-	-

TABLA 14. Evaluación cualitativa (Kirby-Bauer) de las fracciones de la cromatografía en columna del extracto hexánico de tallos. No hubo inhibición del crecimiento (-).

Los microorganismos que se utilizaron para evaluar las fracciones obtenidas a partir del extracto hexánico de hojas e inflorescencias fueron: *Staphylococcus aureus*, *Shigella boydii* y *Vibrio cholerae* CDC V12. Se evaluaron las 17 fracciones de las cuales sólo la 1, 22, 27, 53, 60, 80 y 96 tuvieron un efecto inhibitorio del crecimiento. En la tabla 15 se muestran los resultados obtenidos.

FRACCIÓN	<i>S. aureus</i>	<i>S. boydii</i>	<i>V. cholerae</i> CDC V12
Cloramfenicol	17±5	18±5	25±5
1	8±5	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
5	-	-	-
11	-	-	-
22	-	-	9±5
27	-	9±5	9±5
53	-	8±5	11±5
60	-	8±5	9±5
80	9±5	10±5	11±5
96	8±5	9±5	11±5
109	-	8±5	7±5
118	-	7±5	7±5
120	-	-	7±5
141	-	8±5	7±5
146	-	-	7±5
166	-	-	-

TABLA 15. Evaluación cualitativa (Kirby-Baüer) de las fracciones de la cromatografía en columna del extracto hexánico de hojas e inflorescencias. No hubo inhibición del crecimiento (-).

3. ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICOS DE TALLOS Y HOJAS E INFLORESCENCIAS

A. PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE TALLOS

FRACCIÓN	Color	Olor	Forma o Consistencia
1	Blanco	Sin olor	Cerosa
3	Verde claro	Sin olor	Grasosa
7	Amarillo claro	Sin olor	polvo
47	Crema	A esencia	Cerosa
129	Amarillo claro	Sin olor	Aceitosa
140	Amarillo anaranjado	Aceite rancio	Aceitosa

TABLA 16. Propiedades organolépticas de las fracciones del extracto hexánico de tallos.

B. ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO HEXÁNICICO DE TALLOS

Las fracciones fueron analizadas mediante experimentos de RMN-¹H y en cada espectro (Apéndice 6, Nos. 5-10) se observa que las fracciones están compuestas principalmente de ceras debido a que sólo se observan las señales correspondientes a metilos (0.87 ppm) y metilenos (1.25 ppm) de ceras.

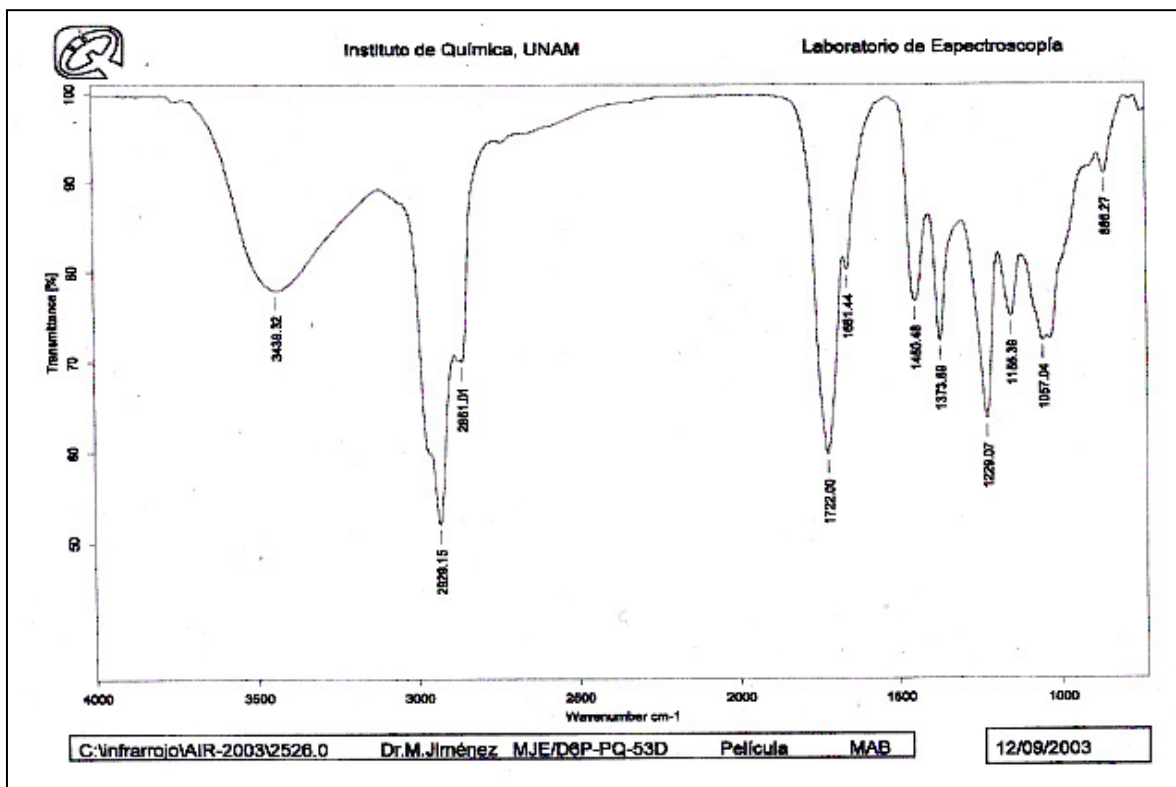
C. PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO DE HOJAS E INFLORESCENCIAS

FRACCIÓN	Color	Olor	Forma o Consistencia
1	Blanco	Sin olor	Polvo
22	Amarillo claro	A esencia	Grasosa
27	Amarillo fuerte	A esencia picante	Grasosa
53	Amarillo fuerte	Dulce	Grasosa
60	-	-	-
80	Amarillo fuerte	Aceite rancio	Siruposo
96	Amarillo fuerte	Aceite mineral	Siruposo Grasoso

TABLA 17. Propiedades organolépticas de las fracciones del extracto hexánico de hojas e inflorescencias. (-) material insuficiente para determinar.

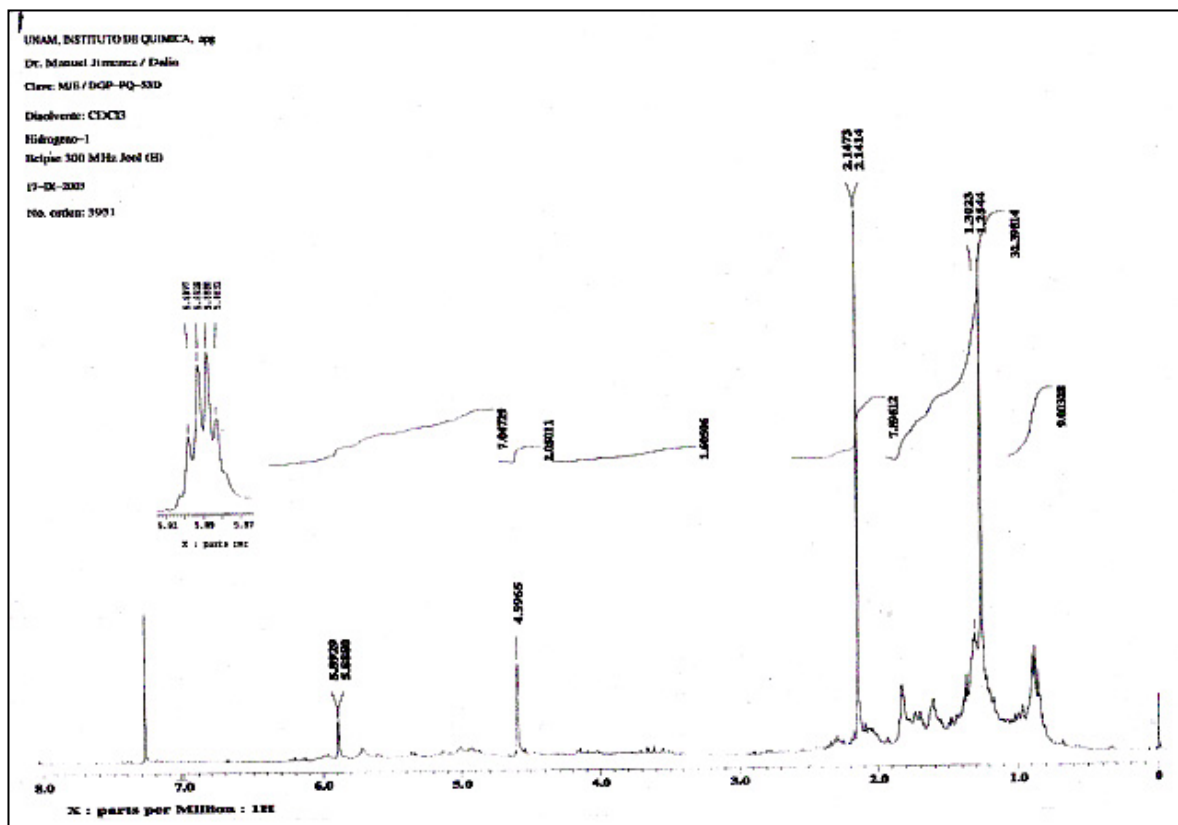
D. ANALISIS DE LAS FRACCIONES DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE HOJAS E INFLORESCENCIAS

En cuanto a las fracciones activas obtenidas de las hojas e inflorescencias, en general se observa en los espectros de RMN-¹H las señales correspondientes a metilos y metilenos de ceras (Ver Apéndice 6).



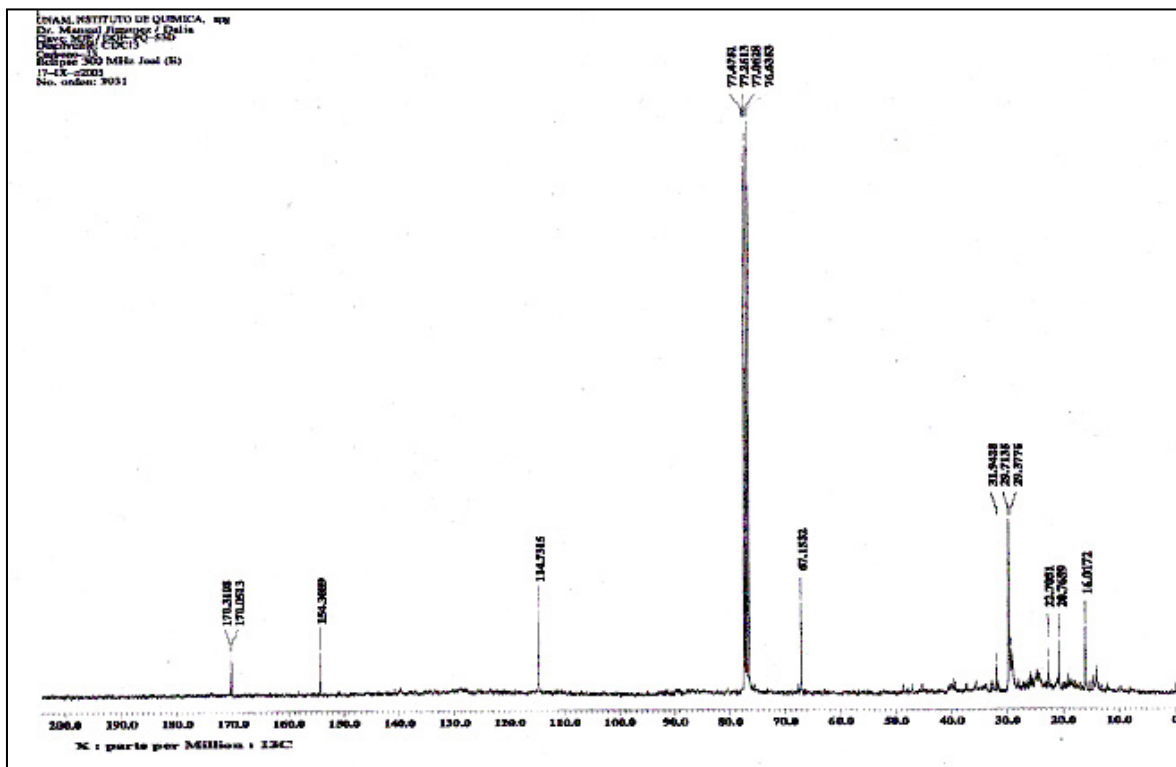
ESPECTRO 1. Infrarrojo (IR) de la fracción 53 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.

Una de las fracciones activas fue la 53, en este caso el espectro infrarrojo (No. 1) de la fracción mostró bandas características de 1720 que corresponden al carbonilo de ceras a 1661.4 una banda que pertenece al grupo C=C y a 3439 la señal que corresponde al grupo OH.



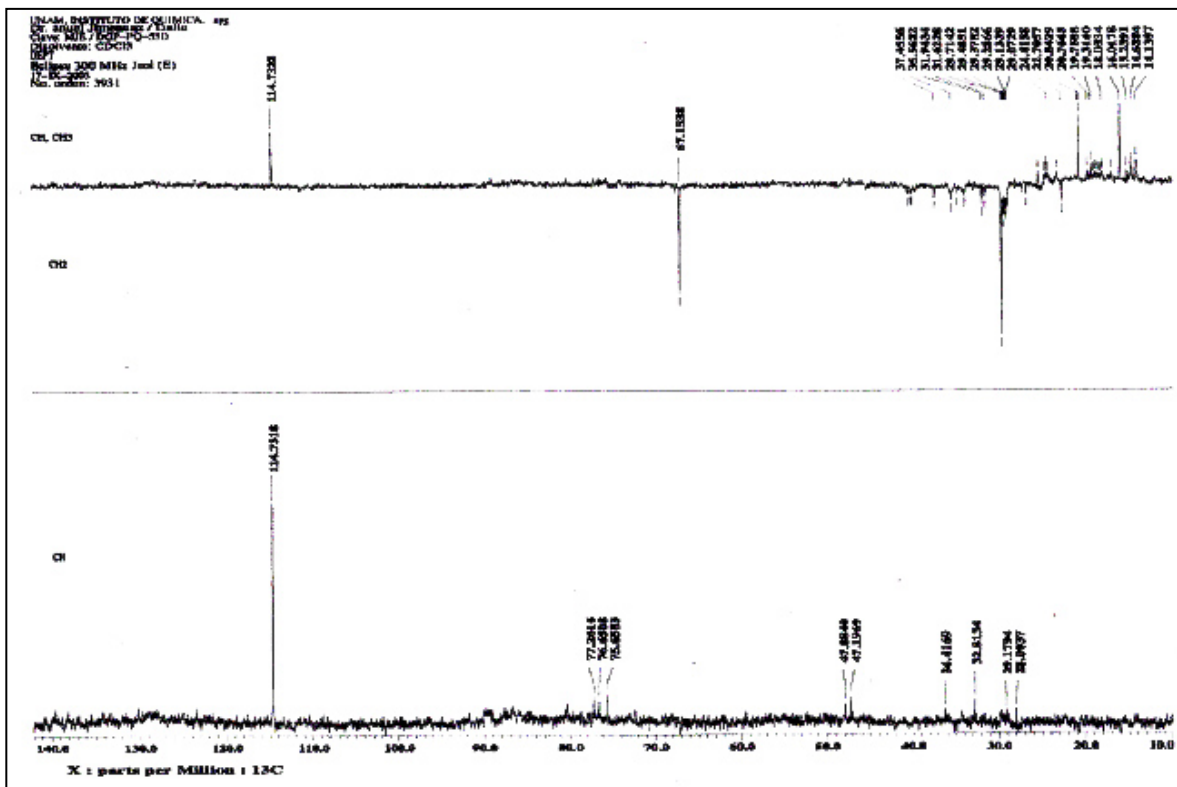
ESPECTRO 2. RMN-¹H de la fracción 53 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.

El espectro de RMN-¹H (No. 2) mostró señales de metilos y metilenos de ceras entre 0.8 y 2.41 ppm; además se observa una señal de doble de doble en 5.8 ppm que corresponde a un protón vinílico y otra en 4.59 ppm que corresponde a un protón de base alcohol.



ESPECTRO 3. RMN-¹³C de la fracción 53 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.

En el espectro de RMN-¹³C (No. 3) se observan señales correspondientes a metilos y metilenos de ceras entre 14 y 32 ppm además del carbono carbonílico en 170.3 ppm; a 154.3 ppm se observa una señal correspondiente a un carbono cuaternario con hibridación sp². En 114 ppm se observa una señal que corresponde a un metino víniclo; en 67.15 un metileno vecino a un oxígeno y que corresponde al metileno base de del éster. En 22.70 y 20.76 ppm se observan las señales de dos carbonos metílicos que por su desplazamiento químico corresponden a dos metilos vecinos de un doble enlace. Por otra parte, en el espectro de RMN-¹³C de esta fracción también se observan los metilos y metilenos de hidrocarburos, probablemente de la cera.



ESPECTRO 4. Experimento DEPT de la fracción 53 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.

El espectro DEPT (No. 4) de la fracción 53 presentó las siguientes señales principales: a 114.73 ppm se observa un metino vinílico; a 67.15 ppm una señal de un metileno correspondiente al CH₂ base del éster. En 29.71 y 29.37 ppm se observa dos señales intensas correspondientes a dos CH₂ que se asignan a los metilenos de ceras. Por otra parte, se observa una señal en 16.01 ppm, 14.6 ppm y 14.13 ppm de los metilos de las ceras y en 22.70 y 20.70 ppm de dos metilos unidos a un grupo vinílico.

De acuerdo a este análisis la fracción 53 está compuesta por una mezcla de ceras y una de ellas formada por la esterificación del alcohol 3-metil-2-buten-1-ol con un ácido graso, puesto que en el espectro 1 se observa similitud en las señales de los desplazamientos químicos y la multiplicidad del protón vinílico, los protones metílicos y del metileno base de alcohol que pudieran pertenecer a este alcohol hemiterpénico, los desplazamientos químicos en RMN-¹H, con los que se observan en el espectro de RMN-¹H reportados por Pourchert y Behnke (1993) (Espectro No.21).

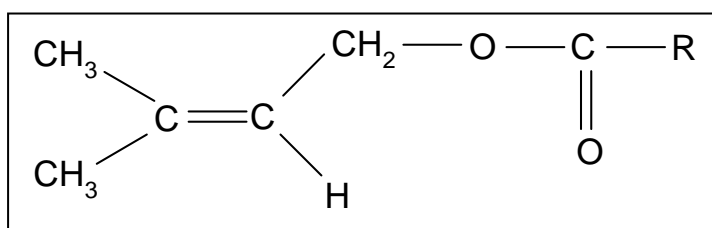


FIGURA 5. Éster del 3-metil-2-buten-1-ol.

E. PROPIEDADES FÍSICAS DEL 3-metil-2-buten-1-ol
(Chapman and Hall, 1982-2004. Dictionary of Natural Products. CD-ROM v.12:1).

Sinónimos:

Prenol. Isoprenol. Alcohol isopentenil. Alcohol prenil.

Peso molecular:

86.133

Porcentaje de composición:

C – 69.72%; H – 11.70%; O – 18.58%

Uso e importancia:

Ingrediente para saborizantes

Punto de ebullición:

137-138°C

Fórmula molecular:

C₅H₁₀O

Masa exacta:

86.073165

Fuente biológica:

Constituyente de ylang-ylang y aceite de lúpulo (*Humulus lupulus*)

Descripción física:

Aceite

Peligros y toxicidad:

Irritante de la piel. DL₅₀ (ratas vía oral) 810 mg/kg. DL₅₀ (conejo vía cutánea) 3900 mg/kg.

F. DERIVADOS DEL 3-metil-2-buten-1-ol
(Chapman and Hall, 1982-2004. Dictionary of Natural Products. CD-ROM
v.12:1).

Derivado	Sinónimos
O-β-D-Glucopiranosida	Prenil glucósido
O-[α-L-Arabinopiranosil-(1→6)-β-D-Glucopiranosida]	
O-[β-D-Apiofuranosil-(1→6)-β-D-Glucopiranosida]	
Ac	Acetato isopentenil
3,5-Dinitrobenzoil	
3,4-Dihidroxi-E-cinamoil	3-Metil-2-butenil cafeato
3,4-Dihidroxi-Z-cinamoil	
4-Hidroxi-3-metoxi-E-cinamoil	
Metil éter	1-Metoxi-3-metil-2-butenol
Etil éter	1-Etoxi-3-metil-2-butenol

DISCUSIÓN

El rendimiento del extracto metanólico de hojas e inflorescencias presentó el porcentaje de sólidos más alto (16.70%) en comparación con el resto de los extractos, debido a que las plantas en general presentan compuestos polares como los glicósidos, glicósidos fenólicos, flavonoides y ácidos orgánicos. Sin embargo, este extracto no tuvo actividad antibacteriana significativa en comparación con los resultados obtenidos del extracto hexánico de tallos y hojas e inflorescencias, de los cuales se obtuvo un porcentaje de sólidos de 4.84% y 1.1% respectivamente, lo que indica que los compuestos activos son no polares y que además está en pequeñas proporciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los bioensayos preliminares los extractos hexánicos de tallos y hojas e inflorescencias son los más activos sobre todas las cepas de bacterias que se utilizaron. Todas las cepas presentaron halos de inhibición muy grandes, tomando en cuenta que estos extractos son mezclas de muchos compuestos. Además es muy notorio que ambos extractos inhibieron el crecimiento de cepas de bacterias multidrogoresistentes, sobre todo en la cepa de *Escherichia coli* Mr.

Los resultados obtenidos en CIM y CBM para ambos extractos sobre *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* CDC V12, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus aureus* Mr muestran que son muy similares lo que indica la presencia de una mezcla de los compuestos activos y que éstos tal vez se encuentren en trazas, ya que la planta los produce en pequeñas cantidades.

En los resultados obtenidos del fraccionamiento del extracto de tallos sobre las cepas utilizadas, se observa que sólo 5 fracciones tuvieron actividad sobre *S. boydii* y *S. aureus* y sólo 2 fracciones más fueron activas sobre *S. aureus*. Sin embargo, ninguna de las fracciones fue activa sobre *V. cholerae* CDC V12. En el caso de las fracciones del extracto hexánico de las hojas e inflorescencias 9 fracciones fueron activas sobre *S. boydii* y *V. cholerae* CDC V12.

Las fracciones obtenidas del extracto de tallos y hojas e inflorescencias evaluadas en los bioensayos probablemente mostraron sinergismo entre éstas, ya que al evaluar estos extractos sobre las cepas bacterianas se obtuvieron halos de inhibición del crecimiento muy grandes y al separar el extracto no se obtuvieron los mismos resultados, los halos de inhibición disminuyeron, lo que indica que el o los compuestos activos al ser separados disminuyen su actividad inhibitoria del crecimiento.

De acuerdo al análisis espectroscópico de IR, RMN-¹H, ¹³C y DEPT de la fracción 53 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias, que fue una de las más activas y que se aisló en mayor cantidad, se observan las señales correspondientes a los protones y carbonos del alcohol 3-metil-2-buten-1-ol indicando que posiblemente la mezcla esté compuesta por ceras y este alcohol esterificado con un ácido graso. Esto es muy posible debido a que las ceras poseen una polaridad muy baja, es decir son no polares, y en las extracciones directas con solventes no polares, también se extraen lípidos no volátiles junto con los esterios isoprenoides (Dey y Harborne, 1991).

En las cutículas de las plantas, las ceras están formadas de compuestos alifáticos de cadenas muy largas, en las ceras están mezclados terpenos y metabolitos secundarios menores, tales como esterios y flavonoides. Las propiedades químicas y físicas de las ceras epicuticulares son vitales para la vida de la planta, ya que evitan la pérdida de agua, la protegen contra rayos UV y reducen la retención de agua en la superficie para minimizar la deposición de polvo, polen y contaminantes en la superficie de la planta, además de que juegan un papel vital en la defensa de las plantas contra bacterias, hongos e insectos (Kurnst *et al.*, 2003).

El alcohol 3-metil-2-buten-1-ol presenta toxicidad al causar irritación en la piel, su DL₅₀ (ratas vía oral) es de 810 mg/kg y la DL₅₀ en conejo vía cutánea es de 3900 mg/kg (Chapman and Hall, 1984-2004). Probablemente el efecto antimicrobiano se deba a su toxicidad celular.

Los trastornos gastrointestinales de origen bacteriano son causados generalmente por bacterias Gram negativas y la mayoría de estos incluyen diarreas y deshidratación. Algunas de las cepas responsables de estos padecimientos son *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* y *Salmonella typhi* y ésta última es la responsable de las fiebres entéricas o tifoideas, salmonelosis, diarreas y vómitos (Brooks *et al.*, 2002; Evans y Evans, 2000; Finkelstein, 2000; Foster, 2000; Giannella, 2000; Hale y Keusch, 2000).

La disentería es causada por bacterias Gram negativas pertenecientes al género *Shigella* causantes de diarrea bacilar que producen lesiones en íleon y colon causando una intensa inflamación acompañada de sangre, pus en las heces y fiebres (Mims *et al.*, 1993).

Staphylococcus aureus causa lesiones superficiales de la piel y en ocasiones da lugar a padecimientos superficiales menores, incluyendo la formación de pústulas o infecciones en los folículos pilosos, forúnculos, sepsis cutánea causando pus y formación de abscesos. *Staphylococcus epidermidis* está presente en la piel, en la boca, oído externo, orificios nasales y en la uretra; generalmente no causa infecciones, pero puede tomar ventaja cuando el hospedero está inmunodeprimido (Foster, 2000; Newell, 2002).

Los resultados obtenidos en los bioensayos de los extractos hexánicos de hojas e inflorescencias y tallos obtenidos de *Piqueria trinervia* indican que éstos son muy eficaces para el tratamiento de padecimientos relacionados con trastornos gastrointestinales de origen bacteriano y para el tratamiento de heridas e infecciones en la piel y oídos, lo cual justifica el uso que la gente le da a esta planta.

El efecto sinérgico obtenido de la asociación de compuestos antimicrobianos en los extractos de plantas contra bacterias resistentes puede llevar a nuevas opciones para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Este efecto podría permitir el uso de los extractos en particular cuando ya no hay opciones terapéuticas con antibióticos comerciales (Nascimento *et al.*, 2000).

La seguridad de los compuestos de origen vegetal se investiga en muy pocas ocasiones, particularmente con respecto a los de uso a largo plazo y a la interacción con medicamentos. En su lugar, mucha de la investigación actual parece enfocarse sólo en el aislamiento y caracterización de principios bioactivos. Sin embargo, debería estar muy claro ahora que los constituyentes químicos aislados de extractos de plantas en raras ocasiones tienen el mismo efecto como el de las mezclas complejas de moléculas bioactivas de extractos presentes en toda la planta, o en alguna parte de ella.

Es importante hacer notar que la actividad de una planta utilizada para el tratamiento de alguna enfermedad varía aún en plantas que crecieron en el mismo lugar, las diferencias en las cantidades y razón de constituyentes químicos y por lo tanto de actividad biológica, la planta crecerá dependiendo de las condiciones ecológicas, el tiempo de cosecha, almacenamiento y el procesamiento y el proceso de extracción introducirán una variabilidad posterior (Borchers *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

Los tallos de *Piqueria trinervia* fueron la parte más activa de la planta, su actividad fue principalmente sobre bacterias Gram negativas. Sin embargo, las hojas e inflorescencias también mostraron actividad antibacteriana importante contra bacterias Gram negativas.

Las bacterias más sensibles al extracto hexánico de tallos fueron *Vibrio cholerae* (cuatro cepas), *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* (dos cepas, una de ellas Mr), *Shigella boydii* y *Staphylococcus aureus* (dos cepas, una de ellas Mr).

Las bacterias sensibles al extracto hexánico de hojas e inflorescencias fueron *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* (dos cepas, una de ellas Mr), *Vibrio cholerae* (cuatro cepas) y *Staphylococcus aureus* Mr.

Los resultados cuantitativos de CIM y CBM para el extracto de tallos indican que las concentraciones requeridas para inhibir la viabilidad de bacterias Gram positivas es relativamente alta, (entre 1.25 y 2.5 mg/ml) y las concentraciones requeridas para bacterias Gram negativas son concentraciones más bajas (entre 0.32 y 1.25 mg/ml).

Los resultados obtenidos en CIM y CBM para el extracto de hojas e inflorescencias las concentraciones para bacterias Gram positivas y Gram negativas en general, deben ser altas (entre 0.64 mg/ml y 2.5 mg/ml). Sin embargo para el caso de *Vibrio cholerae* CDC V12 las concentraciones para tratarla son menores a 0.160 mg/ml.

Las fracciones obtenidas del extracto de tallos evaluada sobre *S. boydii* y *S. aureus* son las mismas, a diferencia de *V. cholerae* CDC V12 donde ninguna mostró actividad indicando un probable sinergismo entre éstas, ya que al separar el extracto no se obtuvieron los mismos resultados en la inhibición de crecimiento que en los bioensayos con el extracto completo.

Las fracciones obtenidas del extracto de hojas e inflorescencias se observa que *Staphylococcus aureus* Mr no es sensible a ninguna de las fracciones ya que éstas sólo disminuyeron el número de bacterias, más no las mataron. En el caso de *Shigella* y *Vibrio*, las fracciones presentaron una actividad inhibitoria del crecimiento las mismas fracciones.

Los resultados obtenidos en los espectros de IR, RMN-¹H, ¹³C y DEPT de la fracción 53 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias, indican la presencia de ceras y de un éster del alcohol 3-metil-2-buten-1-ol.

Con todos estos resultados obtenidos en los diferentes bioensayos y análisis, los usos etnobotánicos de *Piqueria trinervia* quedan justificados.

PERSPECTIVAS

Piqueria trinervia ha sido estudiada en las áreas de la biología, etnobotánica y en varios aspectos de química, sin embargo, aún no ha sido estudiada completamente en las áreas de la genética, fisiología celular, bioquímica, farmacología, ecología, entre otras. Además, no se tienen reportes de ninguna de las demás especies que representan a este género. Lo que lleva a proponer estudios químicos, biológicos y etnobotánicos más detallados de todas las especies del género para establecer si éstas presentan las mismas actividades biológicas que *P. trinervia*.

No se conoce el modo de acción antibacteriana del éster del alcohol 3-metil-2-buten-1-ol, por lo que sería un buen tema de trabajo para estudios posteriores.

Se determinó que tanto los extractos hexánicos de tallos y hojas e inflorescencias así como las fracciones obtenidas de ellos, tuvieron actividad antibacteriana sobre la gran mayoría de las cepas bacterianas ensayadas, debido a ello, es necesario estudiarlos más a fondo desde el punto de vista químico farmacológico para determinar la identidad de otros compuestos activos, dosis terapéuticas, estudios de toxicidad, farmacodinamia, farmacocinética, entre otros, con la perspectiva de utilizar alguno de los compuestos obtenidos como droga.

Debido a que esta planta produce metabolitos secundarios de gran interés biológico que se pueden explotar comercialmente, el cultivo de tejidos vegetales, la ingeniería genética y la biología molecular representan técnicas biotecnológicas de gran utilidad para este fin.

APÉNDICE 1

CUANTIFICACIÓN DE SÓLIDOS SOLUBLES (Modificado de González-Peñalosa, 2000).

Los extractos vegetales generalmente son obtenidos macerando el material vegetal con disolventes orgánicos de diversas polaridades. Se debe tomar en cuenta la cantidad de planta que se va a utilizar, para posteriormente determinar la cantidad de sólidos totales en el extracto o rendimiento.

La determinación de sólidos totales para determinar el rendimiento se lleva a cabo quitando el exceso de disolvente mediante la destilación simple o destilación a presión reducida. Los sólidos resultantes se colocan en un recipiente (el cual con anticipación se encuentra a peso constante) y se secan por evaporación a temperatura ambiente hasta alcanzar peso constante, los cuales se determinan en una balanza analítica o semianalítica.

Los cálculos se realizan por diferencia de peso:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Sólidos Totales} \times 100}{\text{Cantidad de material vegetal utilizado}}$$

APÉNDICE 2

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR DE KIRBY-BAÜER (Barry y Thornsberry, 1987; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991).

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos, compuestos puros y de las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas, la metodología es la siguiente:

MEDIO DE CULTIVO

Se utilizará 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 más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral, aumentando el tamaño de las zonas de inhibición, un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

INÓCULO

Con un asa estéril de poliéster se tocarán las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en un tubo con 10 ml de caldo Müller-Hinton y se descarga el material. El tubo de cultivo se incuba a 37°C de 18 a 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml. El estándar 0.5 de MacFarland se prepara añadiendo 0.5 ml de sulfato de bario a 99.5 ml de H₂SO₄ 0.36N. La comparación de la turbidez entre el estándar y el caldo con el organismo en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales o en su defecto en un espectrofotómetro (Spectronic 21 Milton Roy) a 660 nm (Hendrickson, 1987).

Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina hasta igualarla. Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlo se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocular la superficie de una placa de agar Müller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance la temperatura ambiente, es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la

evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se siembra mediante estría en al menos tres direcciones, girando la placa en ángulos de 60° después de cada estría. Se permite que la capa de bacterias se adhiera a la superficie de agar durante un periodo de 5 minutos, después se aplican los sensidiscos con las muestras a las cuales se les evaluará su actividad antibacteriana.

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 utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman No.5. En todos los casos se hacen diluciones para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto. Se utilizan 2 mg de los extractos disueltos en 10µl del disolvente correspondiente a cada extracto.

Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril y deben colocarse por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración de cada extracto a evaluar. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS

En cuanto a la evaluación de las fracciones, los sensidiscos se impregnaron con soluciones valoradas de las muestras hasta llegar a la concentración deseada de sustancia por disco; en este caso, se utilizaron diferentes solventes para solubilizar los compuestos y posteriormente impregnar los discos dejando evaporar el solvente durante 12 horas.

CONTROLES NEGATIVOS

Discos a los que se les agregará 10 µl del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

CONTROL POSITIVO

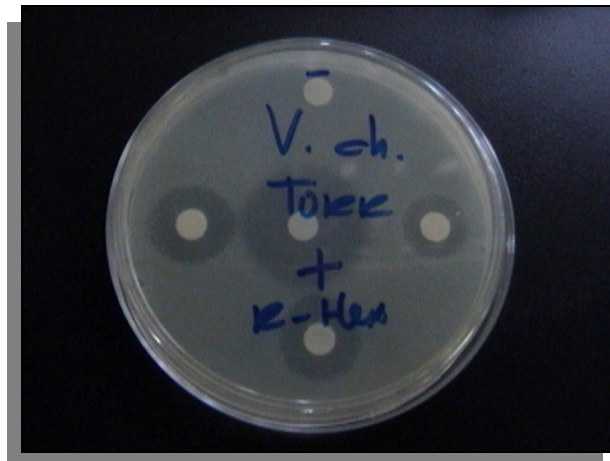
Se evaluará la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 25 µg de cloramfenicol (Barry y Thornsberry, 1987).

INCUBACIÓN

Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad, se les colocará en una incubadora a 37°C sin mayor tensión de CO₂. Es preciso evitar presión de CO₂ debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del 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 disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición. Se incuban siempre placas con discos sin sustancias a evaluar como control negativo.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Las zonas de inhibición se medirán con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hará por triplicado y se reportarán los valores promedio. La siguiente figura es un ejemplo de los resultados que se pueden obtener:



APÉNDICE 3

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE BACTERIAS. DILUCIÓN CUANTITATIVA (Kelley y Post, 1991; Collins, 1969; Alonso-Urmeneta, 1999).

En éstas técnicas, el material que contiene las bacterias se diluye seriadamente y se ponen partes alícuotas de cada dilución en o sobre medios de cultivo convenientes. Se supone que cada colonia que se desarrolla ha crecido a partir de una unidad viable que puede ser un solo organismo o un grupo de unas pocas bacterias.

MATERIAL PARA DILUCIONES

Un cultivo del microorganismo de 12 a 24 hs,
20 tubos estériles con 9 ml de solución salina al 0.9%,
20 cajas petri con agar Müeller Hinton,
Una micropipeta de 100 μ l,
Una caja con puntas para micropipeta estériles,
Una asa de vidrio.

PREPARACIÓN DE DILUCIONES

1. Con la micropipeta transferir una alícuota de 100 μ l del cultivo (de aproximadamente 12 horas de crecimiento) en un tubo con solución salina; agitar bien 25 veces por 7 segundos; desechar la punta de plástico; este será el tubo rotulado 10^6 ; este tubo será utilizado para las pruebas de sensibilidad a antimicrobianos; transferir una alícuota a una caja petri; homogeneizar con la asa de vidrio; esta será la caja rotulada 10^5 .
2. Con otra punta estéril transferir una alícuota de 100 μ l del primer tubo a otro tubo que será rotulado 10^4 ; agitar bien; transferir una alícuota a una caja petri; esta será rotulada 10^3 ; homogeneizar; desechar la punta de plástico.
3. Con otra punta estéril transferir una alícuota de 100 μ l del tubo anterior a otro tubo que será rotulado 10^2 ; agitar; transferir una alícuota a una caja petri; esta será rotulada 10^1 ; homogeneizar; desechar la punta de plástico.
4. Incubar todos los tubos y las cajas petri a 37°C por 24 hs. Todas las siembras en cajas petri se hacen por duplicado.

RECuento DE LAS COLONIAS

El denominador de las fracciones $1/10^6$, $1/10^4$, $1/10^2$ es el factor de dilución. Las colonias se contarán a partir de la caja petri rotulada 10^1 . El número de unidades formadoras de colonia o UFC/ml de muestra original será:

$$\text{Número de UFC/ml} = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{Factor de dilución}}{\text{ml sembrados en la placa}}$$

APÉNDICE 4

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CIM) Y DE LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MEDIA (CBM).

MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN CALDO (Jones *et al.*, citado y modificado por Avila, 1996).

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y DILUCIONES

La solución antimicrobiana de trabajo se prepara diluyendo la droga en 3 ml de caldo de Müeller-Hinton a la mayor concentración final deseada. Las concentraciones utilizadas fueron las siguientes: 0.160, 0.32, 0.64, 1.25 y 2.5 mg/ml. La prueba se realiza en tubos de ensayo de 13 por 100 mm con tapa de rosca o con tapones de algodón. Con una micropipeta se van toman las concentraciones de la droga y se agregan a los tubos de ensayo homogeneizando la solución. Este bioensayo se hizo por duplicado.

INOCULACIÓN E INCUBACIÓN DE LOS TUBOS

Se prepara un inóculo que contenga 10^6 a 10^7 UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utiliza el estándar 0.5 de MacFarland y diluyendo luego 1:200 en caldo). Añadir a cada tubo, 1 ml del inóculo ajustado. Incubar los tubos a 37°C durante 16 a 20 horas.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible representa la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). 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.

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

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

Luego que se ha determinado la CIM, se siembra una cantidad conocida del inóculo (usualmente 0.1 ml) tomado de cada uno de los tubos de caldo que no presentaban turbidez luego de la incubación, en placas de agar Müller-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 presentaban turbidez, los microorganismos permanecían viables o bien, habían 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).

APÉNDICE 5

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA ABIERTA Y CAPA FINA

PREPARACIÓN DEL EXTRACTO

El extracto (2 gr) se diluyó en 100 ml del solvente correspondiente y se preadsorbió en 20 gr de celita (SIGMA 55695) con agitación constante hasta que se evaporó totalmente el solvente y quedó un polvo fino.

PREPARACIÓN DE LA COLUMNA

Se preparó una columna de vidrio PYREX de 3 cm de diámetro, 40 cm de largo y un volumen de 1000 ml. Primero se agregaron 30 gr de sílica gel (tamaño de la partícula 10-40 μ SIGMA S-6503), luego se agregó el extracto y finalmente un trozo pequeño de algodón para evitar que al adicionar el solvente salpique las paredes de la columna. La columna debe realizarse con vacío y evitando que en ningún momento le falte el solvente o mezcla de solventes con el cual se está corriendo la cromatografía.

ELUYENTES

La columna se eluyó con mezclas de Hexano y Acetato de Etilo aumentando gradualmente la polaridad hasta recolectar todas las fracciones resultantes. Al final se adicionó MeOH para obtener las fracciones más polares del extracto.

VERIFICACIÓN DE RESULTADOS

El fraccionamiento fue verificado mediante cromatografía de capa fina (CCF). Se emplearon cromatofolios de aluminio cubiertos con sílica gel UV₂₅₄ Whatman con 250 μ m de espesor para análisis. La CCF permitió verificar el desarrollo de las cromatografías en columna abierta y comprobar la pureza de los compuestos obtenidos. Como agentes cromogénicos se emplearon:

- Una solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado, y para el desarrollo del color fue necesario calentar las placas cromatográficas durante dos minutos a 110°C.
- El revelado con luz UV a 254 y 366 nm (CAMAG Serie 29011).

APÉNDICE 6

ESPECTROS

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, spa

Dr. Manuel Jimenez / Datta

Clave: MIE / DGP-PQ-1-D

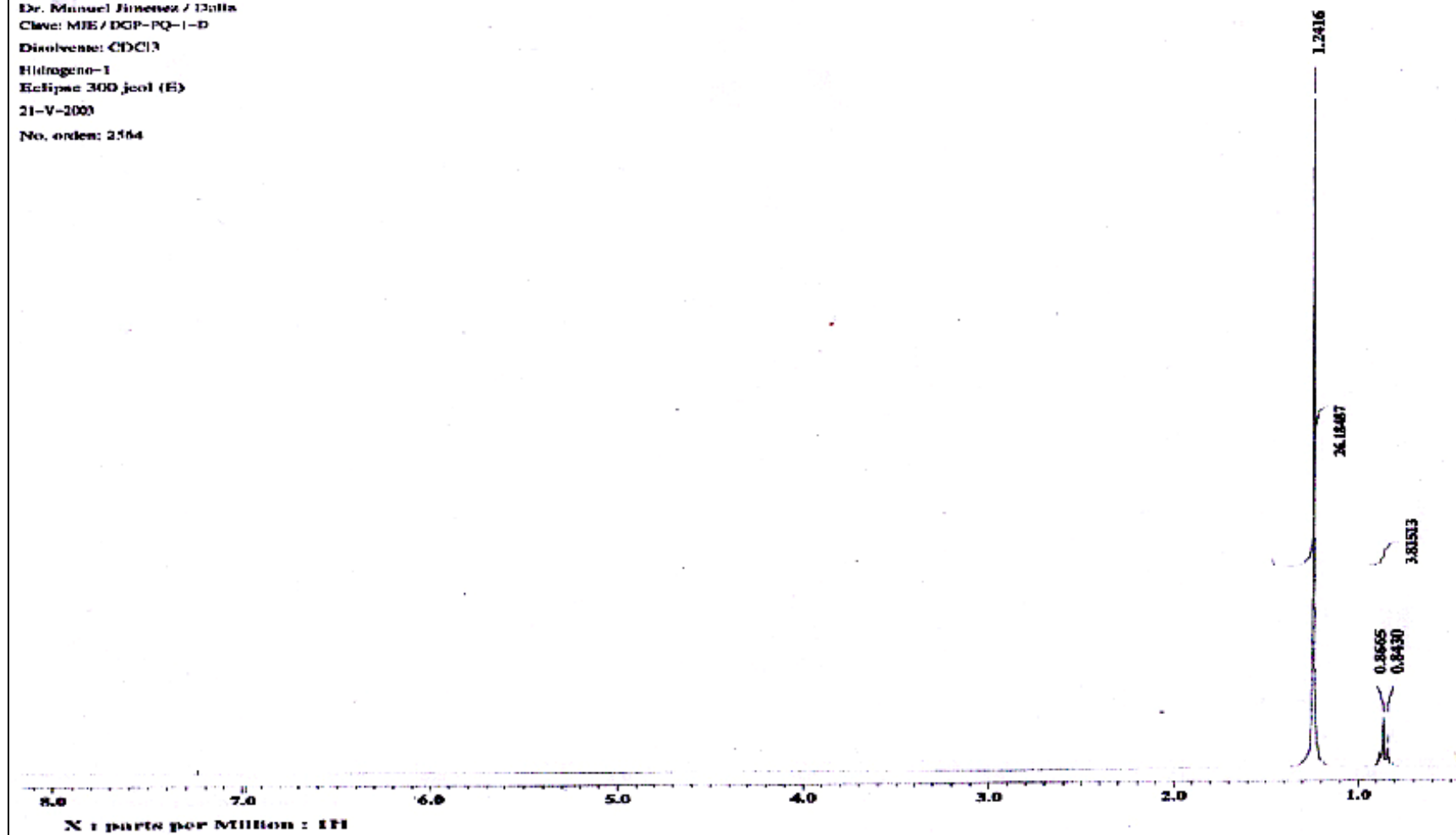
Disolvente: CDCl₃

Hidrogeno-1

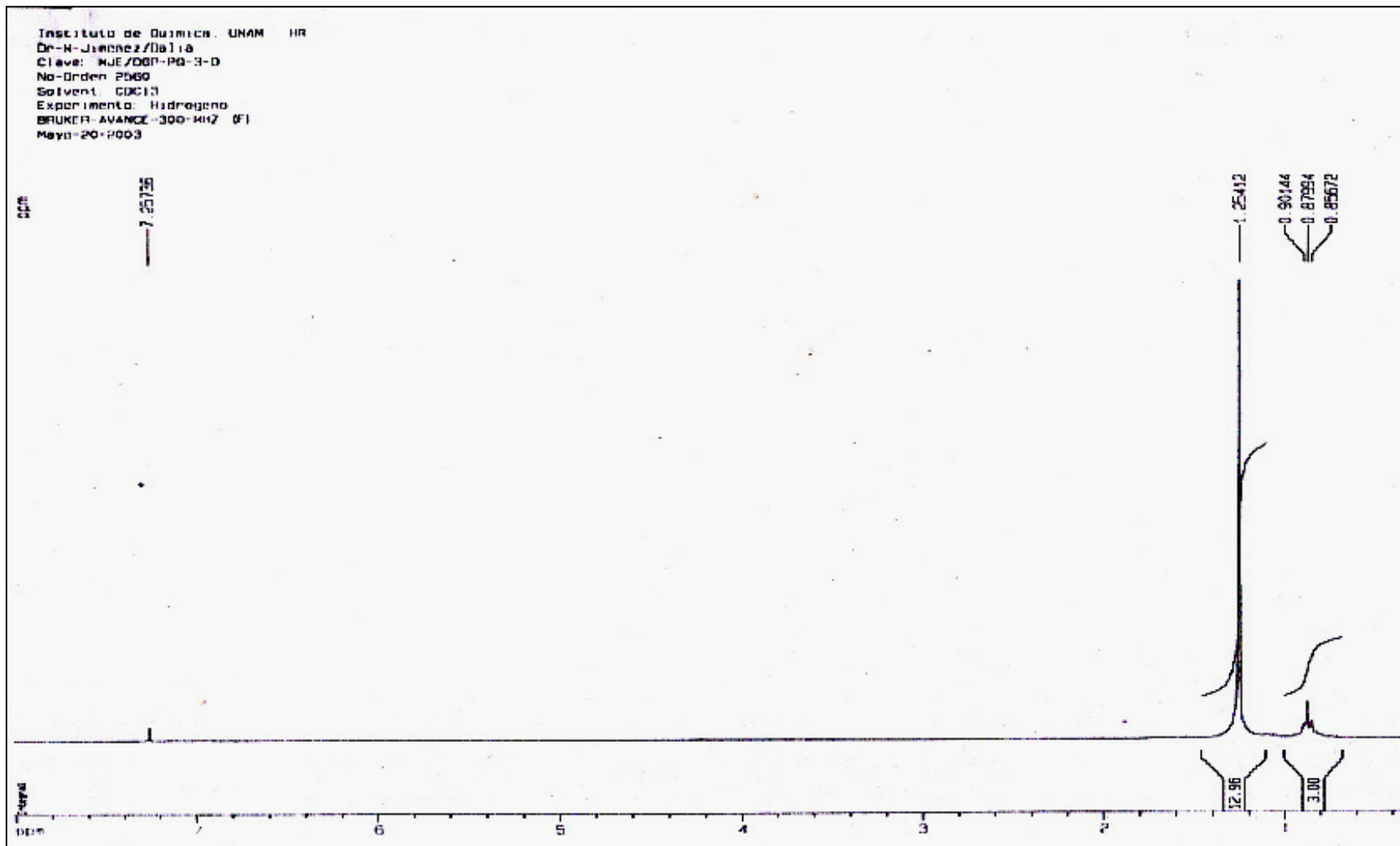
Eclipse 300 jeol (E)

21-V-2003

No. orden: 2564

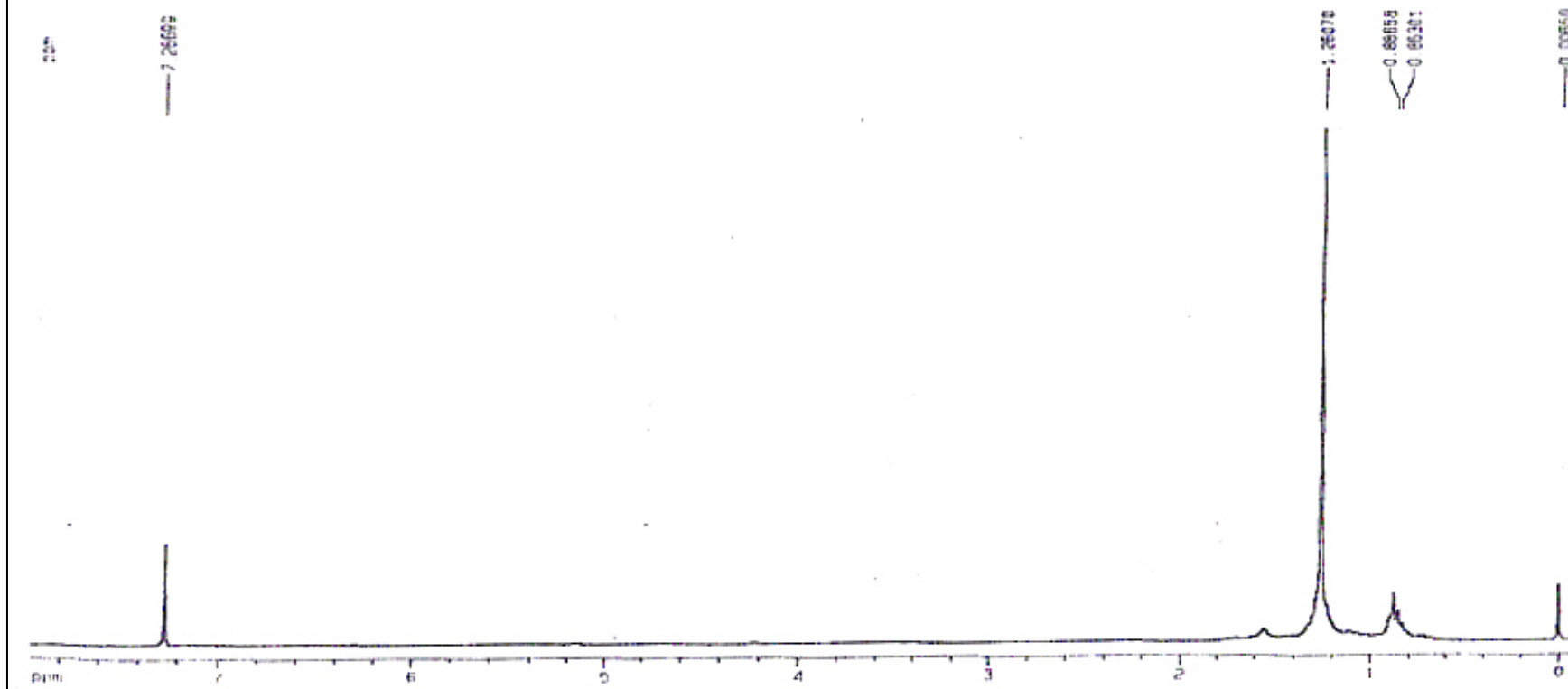


ESPECTRO 5. RMN-1H de la fracción 1 del extracto hexánico de tallos.

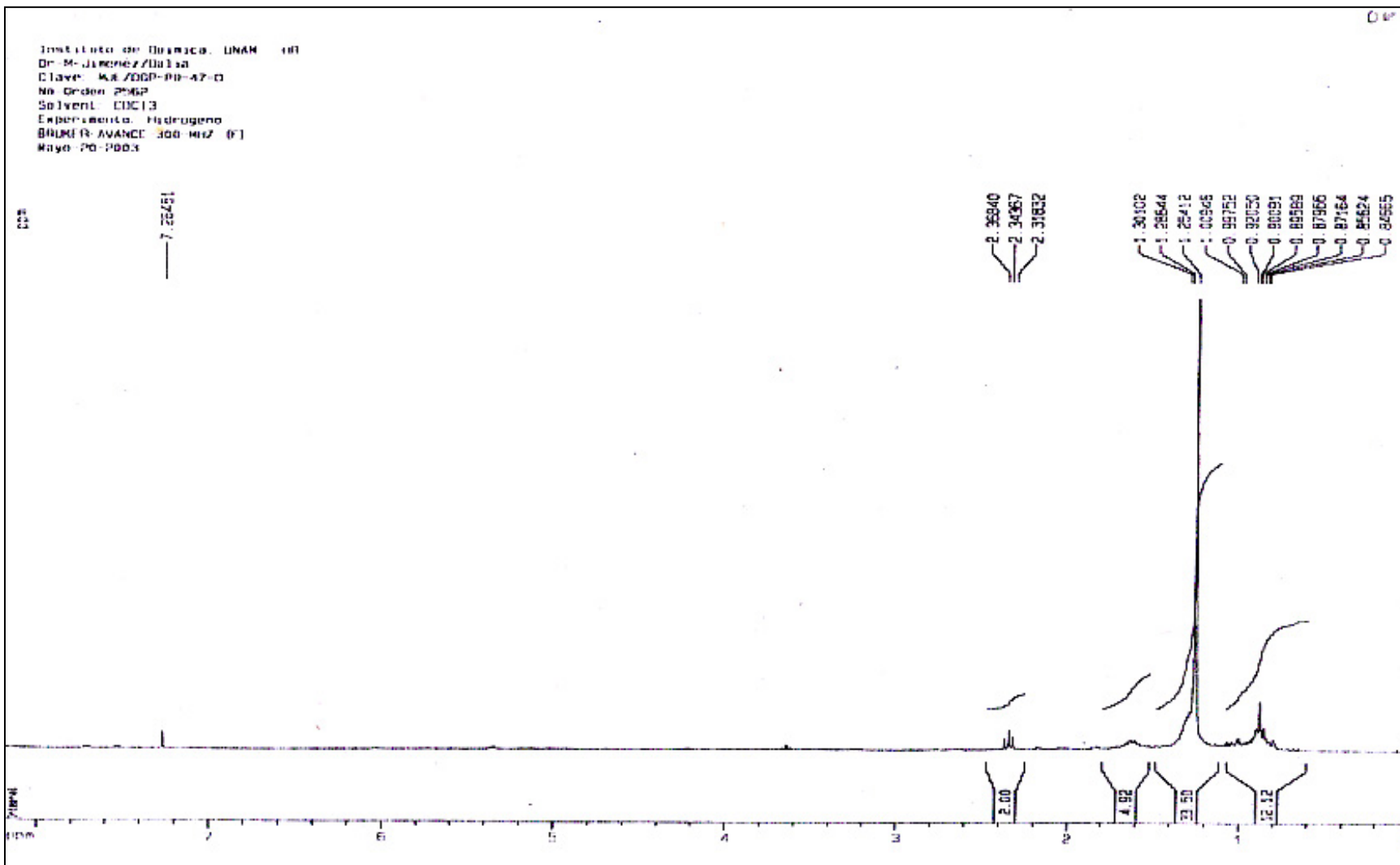


ESPECTRO 6. RMN-1H de la fracción 3 del extracto hexánico de tallos.

Instituto de Quimica UNAM IR
Dr. M. Jimenez/Galicia
Clave: MEX/2003-10-7-0
No. Orden: 2061
Solvent: CDCl3
Experimento: Hidrogeno
Bruker: AVANCE-300-MZ (F1)
Maya: 10-2003

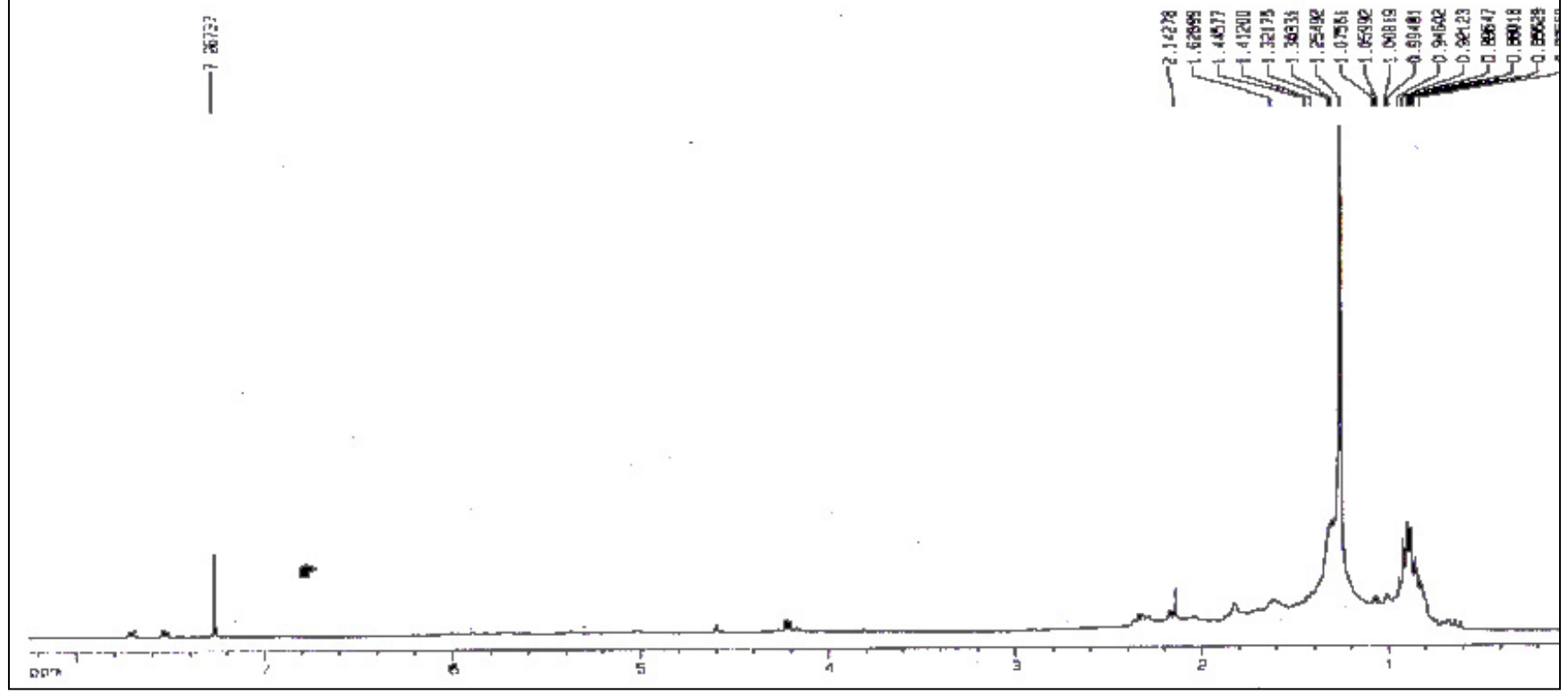


ESPECTRO 7. RMN-1H de la fracción 7 del extracto hexánico de tallos.

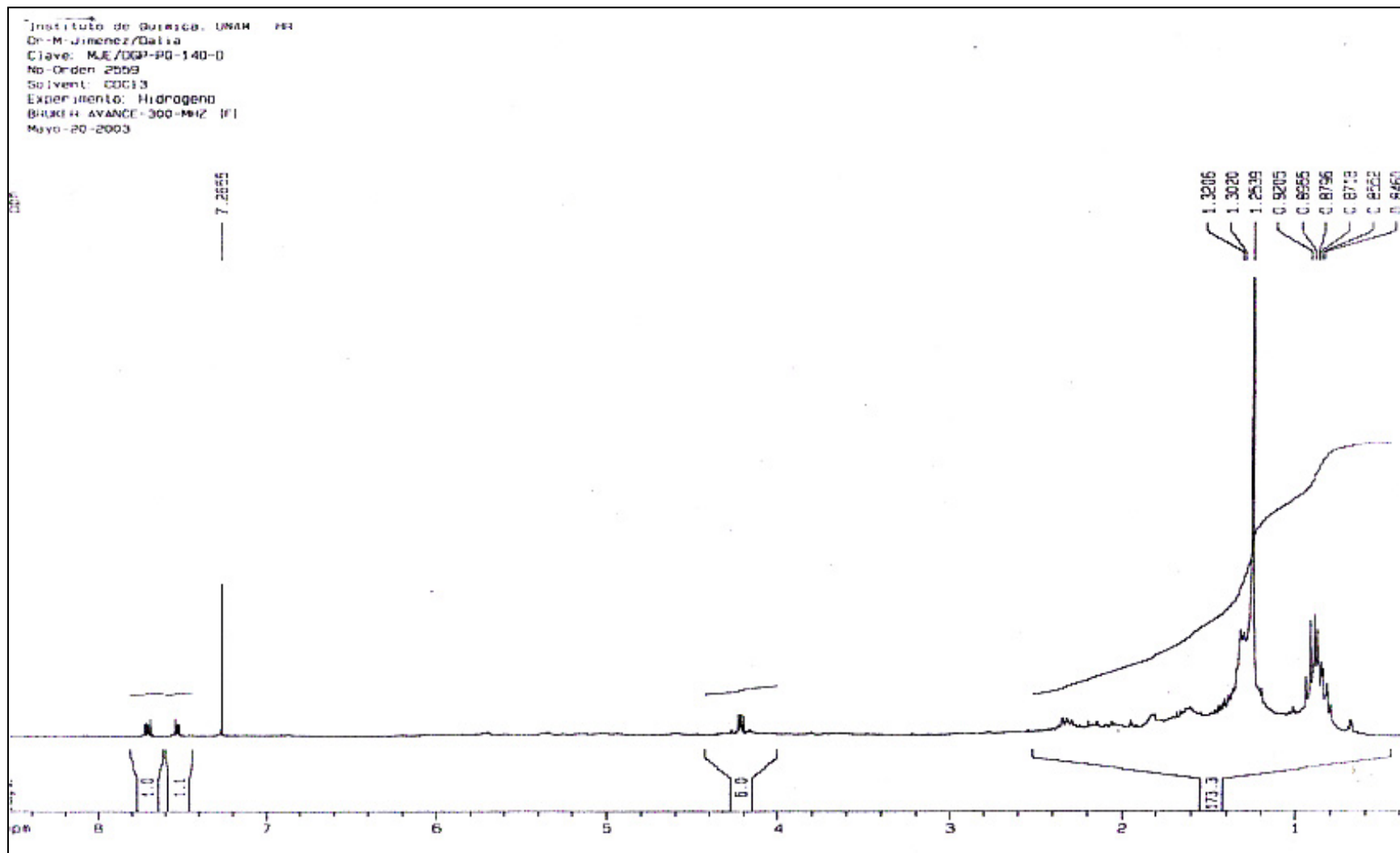


ESPECTRO 8. RMN-1H de la fracción 47 del extracto hexánico de tallos.

INSTITUTO DE QUIMICA UNAM HQ
Dr.-M. Jimenez/Delia
Clave: QUC/USP/99-179-1)
No-orden: 2563
Solvent: DMSO
Experimento: Hidrogeno
PULSOS-AVANCE: 300 MHz M1
Mayo-20-2003

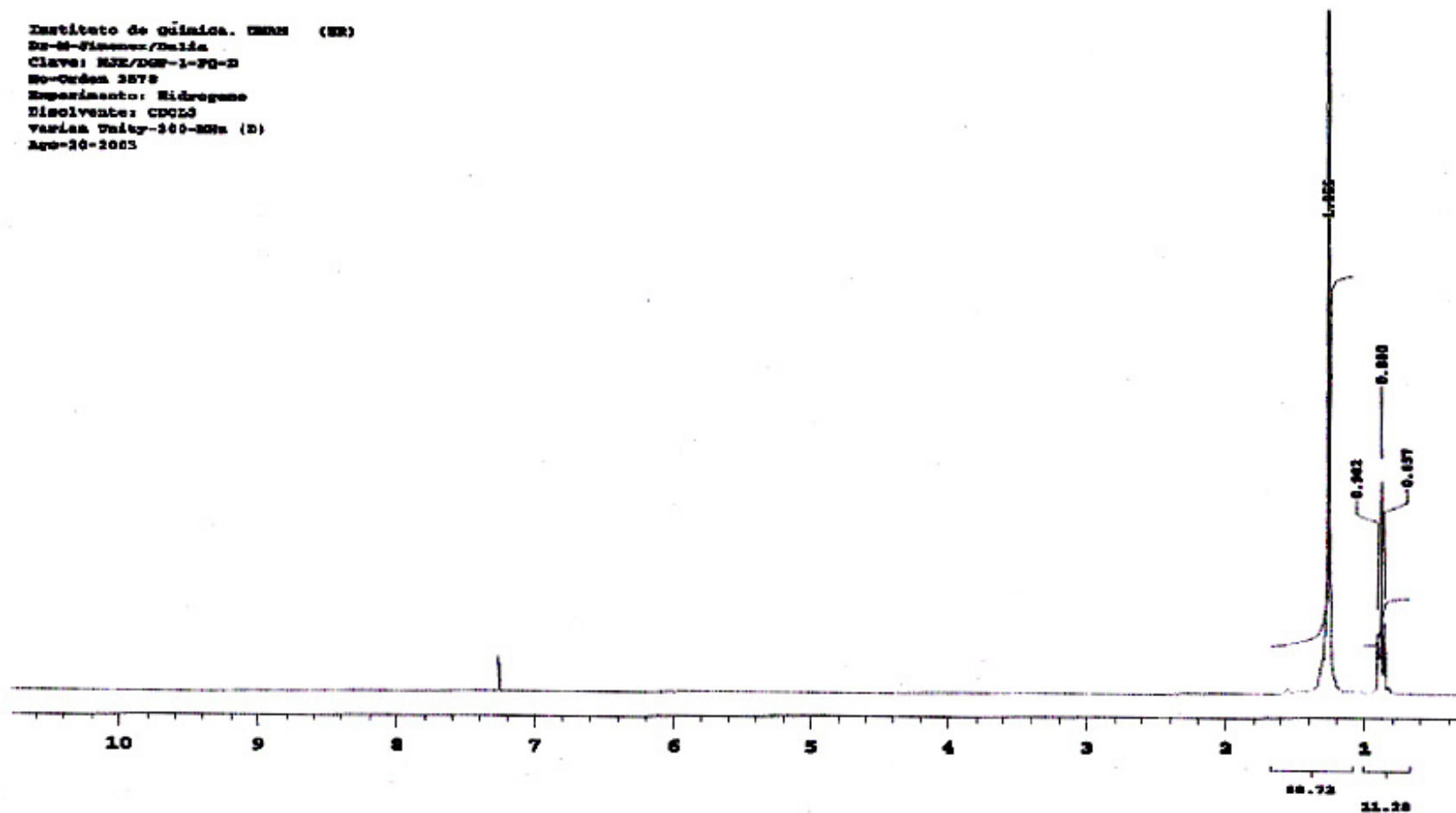


ESPECTRO 9. RMN-1H de la fracción 129 del extracto hexánico de tallos.



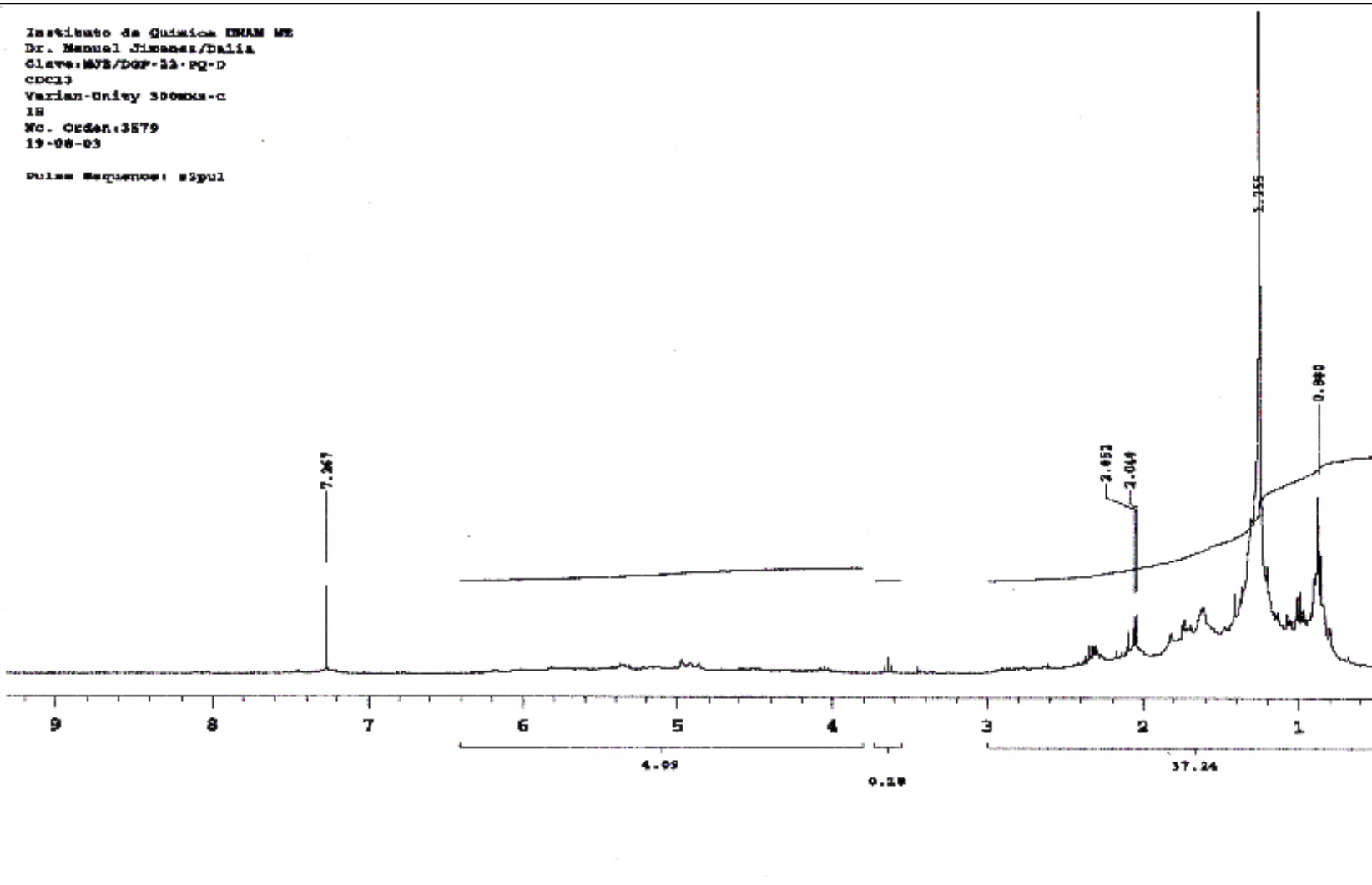
ESPECTRO 10. RMN-1H de la fracción 140 del extracto hexánico de tallos.

Instituto de Química. UNAM (EX)
Dr. G. Jimenez/Dalia
Clave: HSE/DCM-1-PQ-2
No-Orden 3578
Experimento: Hidrogeno
Disolvente: CDCl3
Varian Unity-300-MW (D)
Ago-20-2003



ESPECTRO 11. RMN-1H de la fracción 1 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.

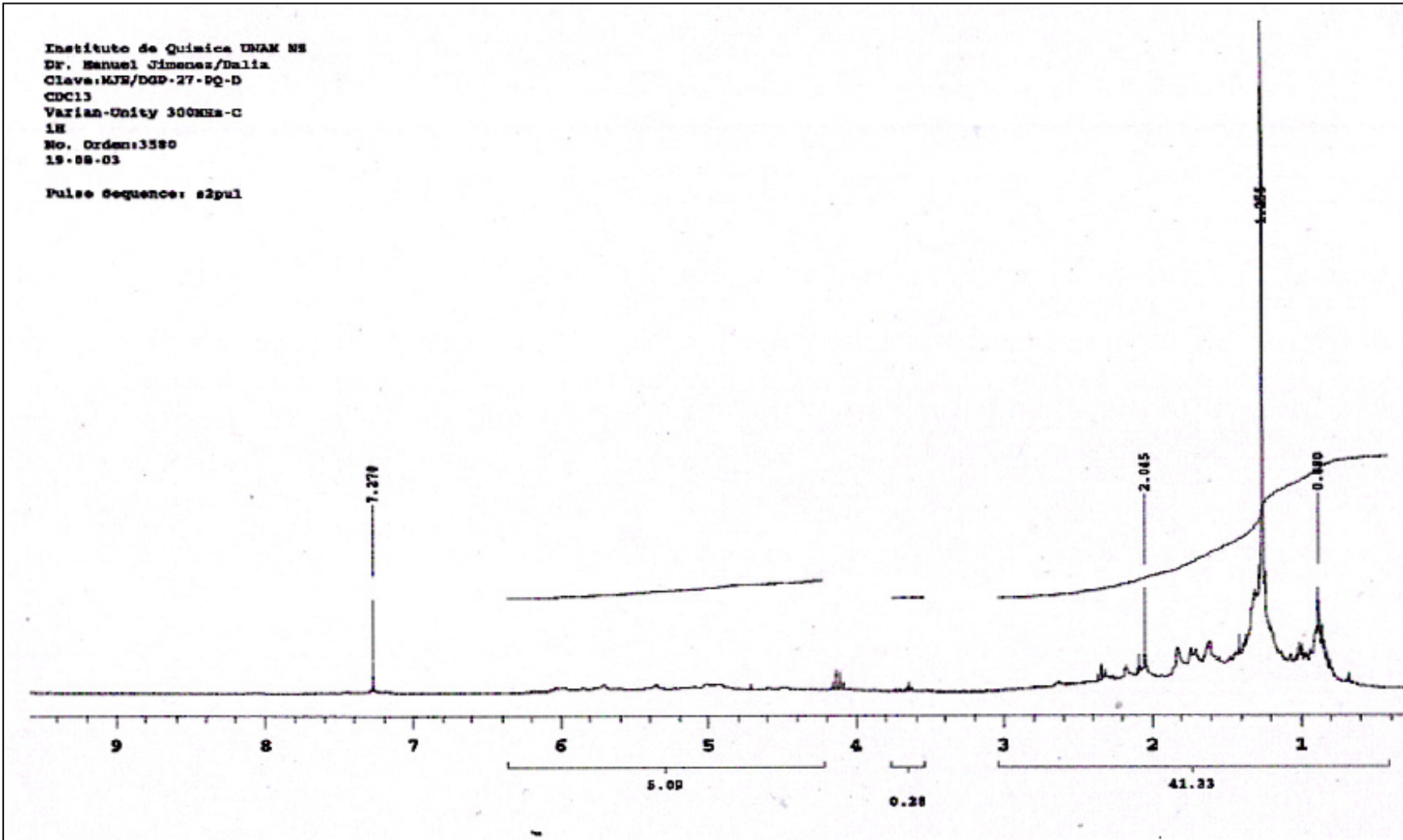
Instituto de Química IQUAM MS
Dr. Manuel Jimenez/Dalia
Clave: MVS/DGP-22-PQ-D
CDCl₃
Varian-Unity 300MHz-c
1H
No. Orden: 3579
19-06-03
Pulse Sequence: zgpg1



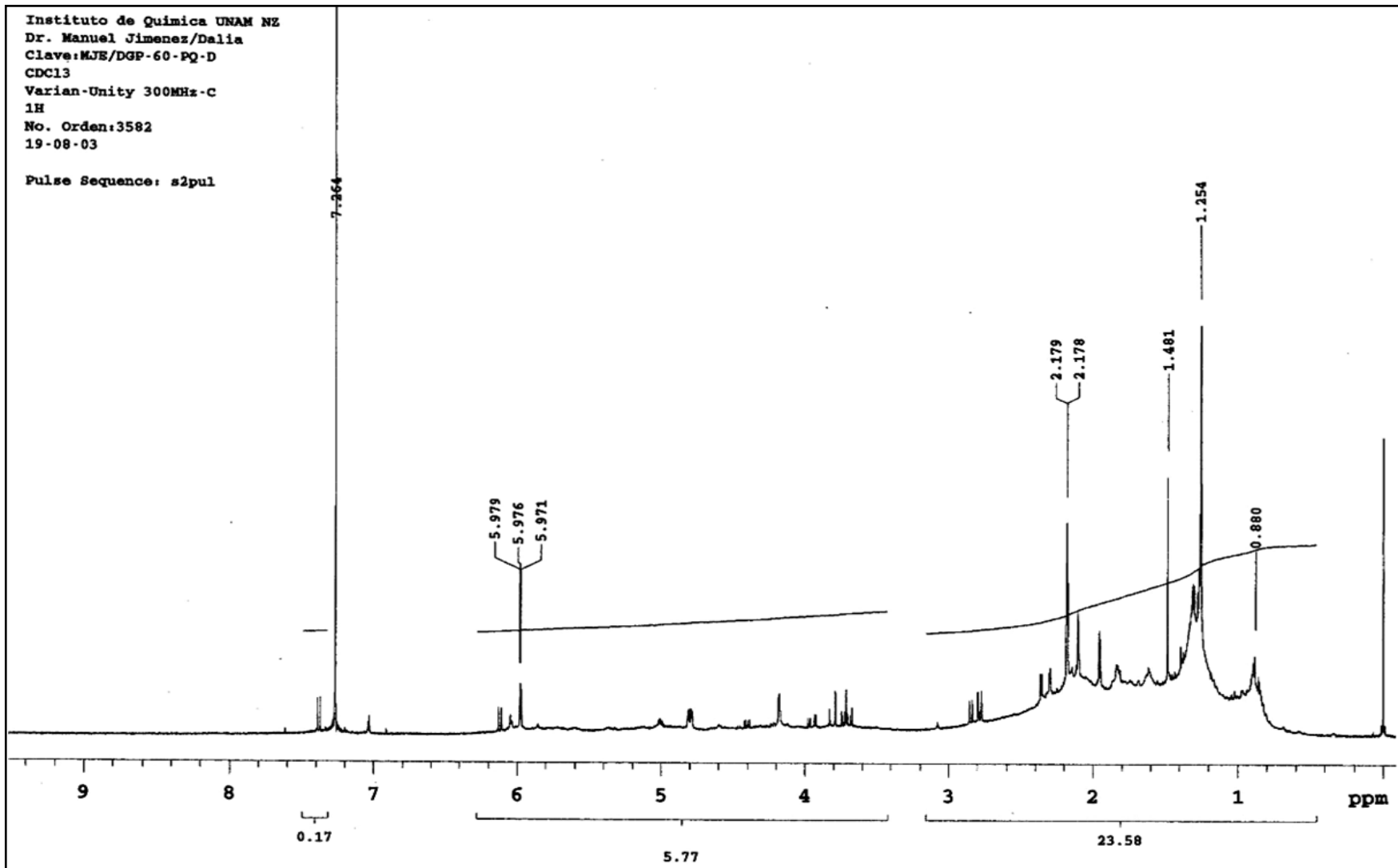
ESPECTRO 12. RMN-1H de la fracción 22 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.

Instituto de Química UNAM NS
Dr. Manuel Jimenez/Dalia
Clave: MJE/DDD-27-PQ-D
CDCl3
Varian-Unity 300MHz-C
1H
No. Orden: 3580
19-08-03

Pulse Sequence: s2pu1



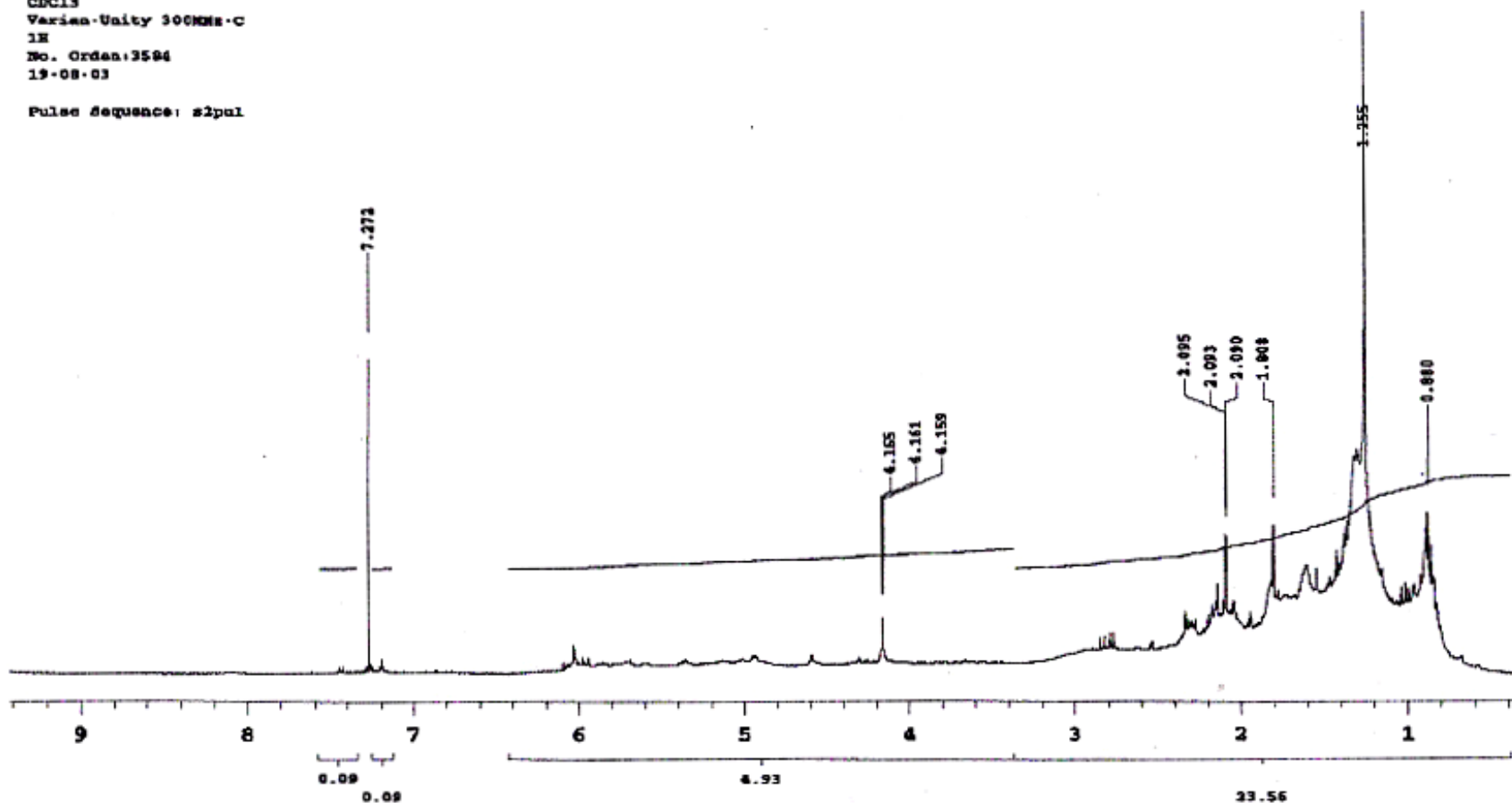
ESPECTRO 13. RMN-1H de la fracción 27 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.



ESPECTRO 14. RMN-1H de la fracción 60 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.

Instituto de Química UNAM MX
Dr. Manuel Jimenez/Dalia
Clave: MJE/009-96-PQ-D
CDCl3
Varian-Unity 300MHz-C
1H
No. Orden: 3584
19-08-03

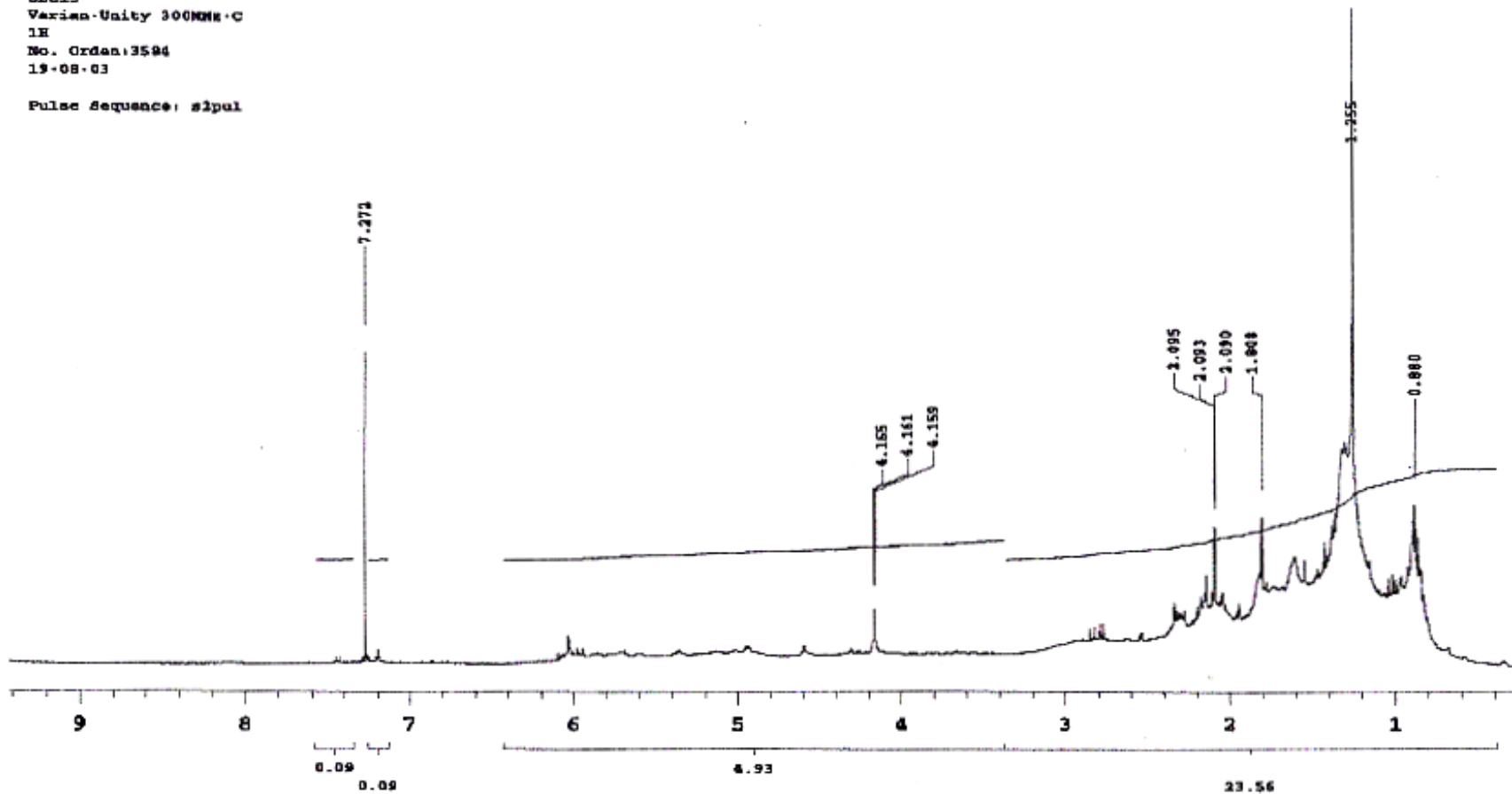
Pulse Sequence: s2pul



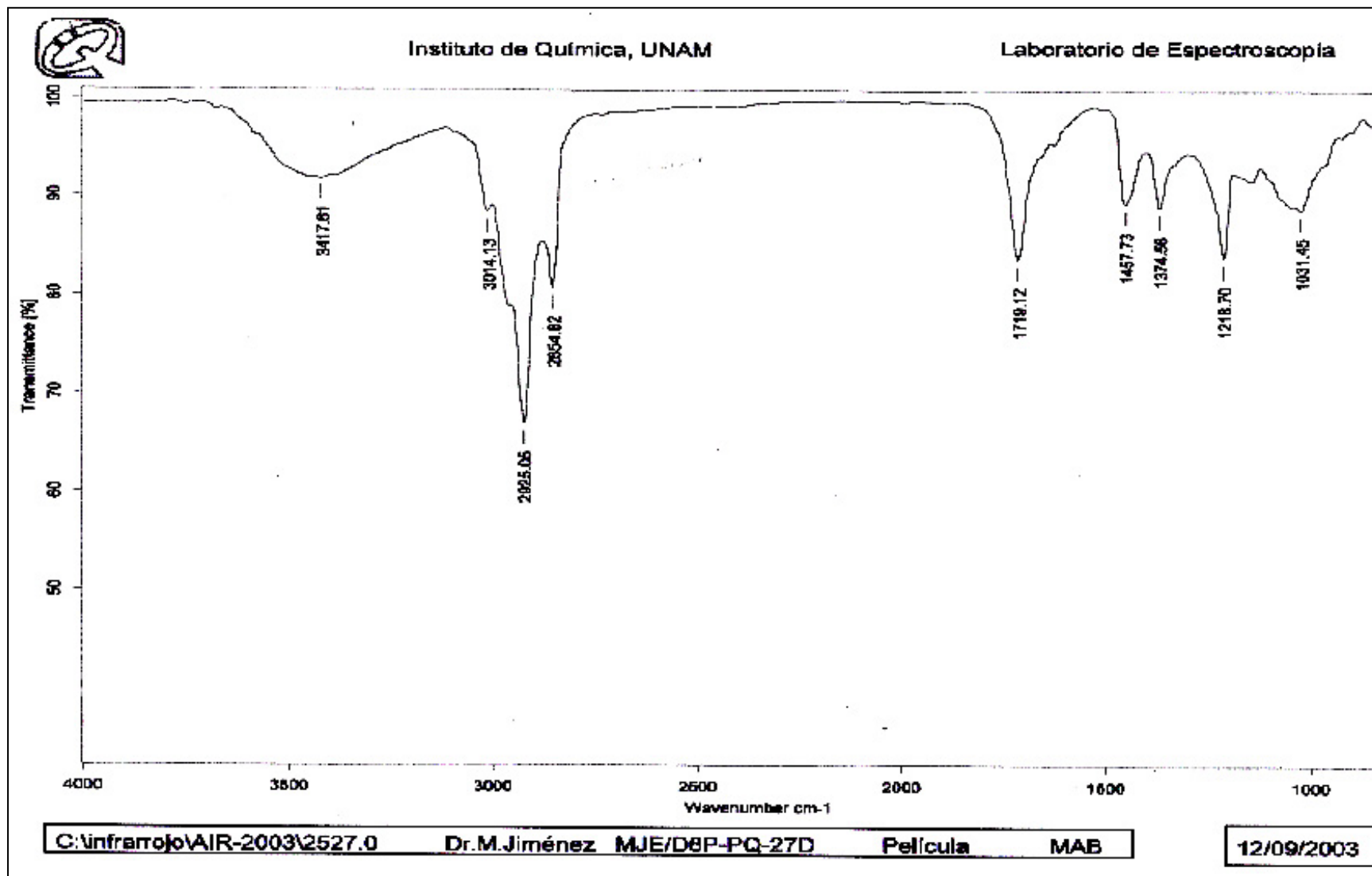
ESPECTRO 15. RMN-1H de la fracción 80 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.

Instituto de Química UNAM DE
Dr. Manuel Jimenez/Dalia
Clave: EJE/DSP-96-PQ-D
CDCl₃
Varian-Unity 300MHz-C
1H
No. Orden: 3594
19-08-03

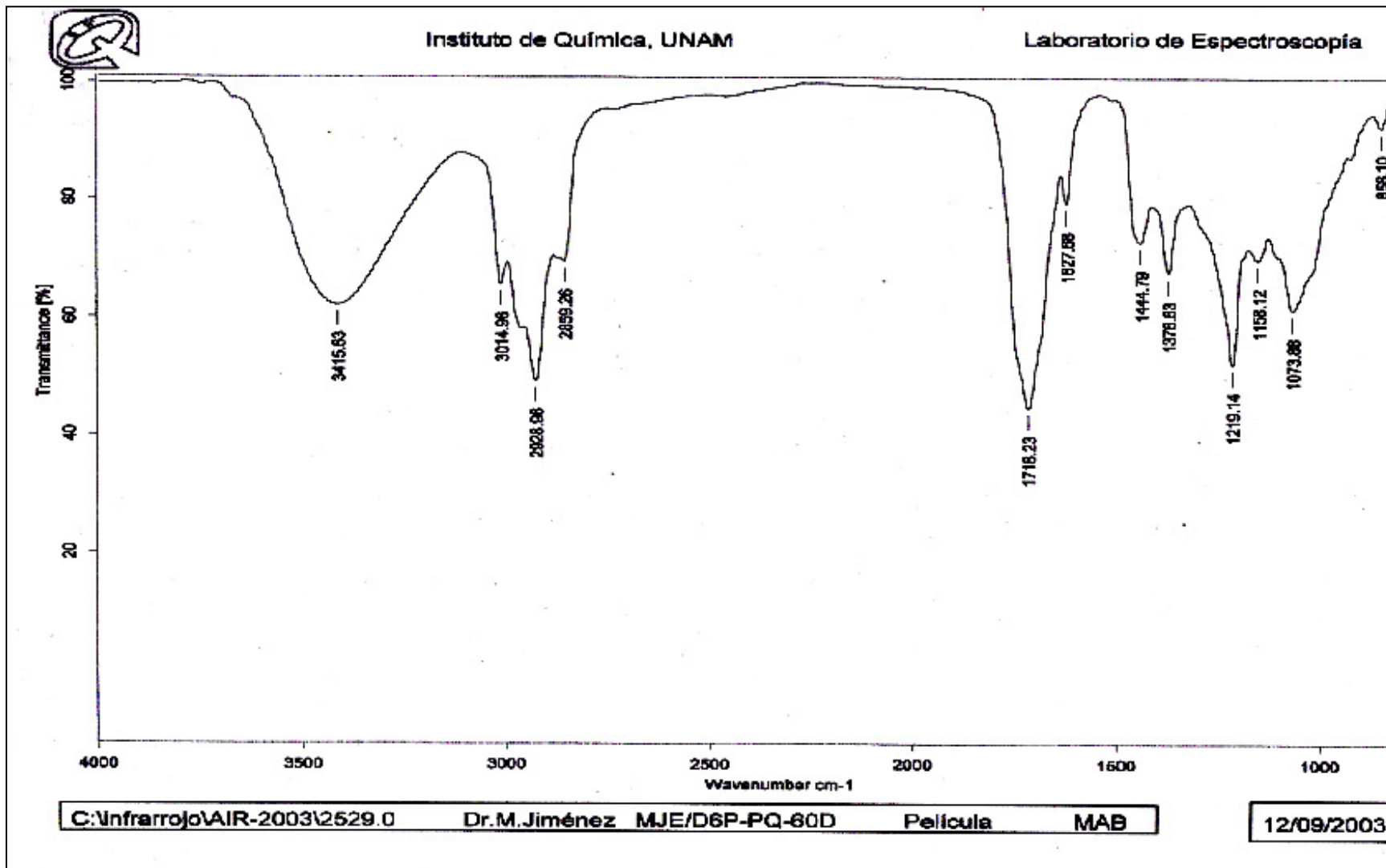
Pulse sequence: sfpul



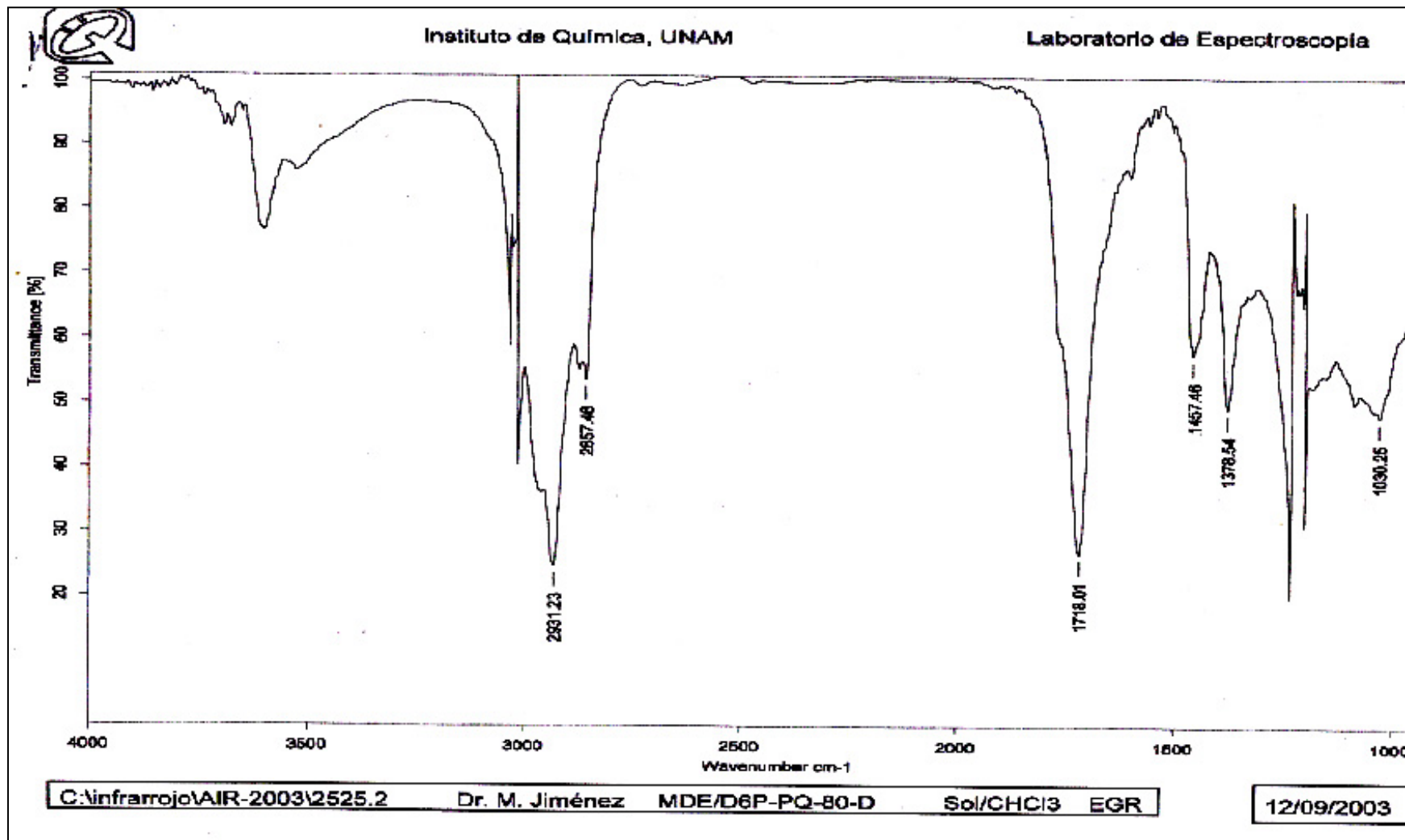
ESPECTRO 16. RMN-1H de la fracción 96 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.



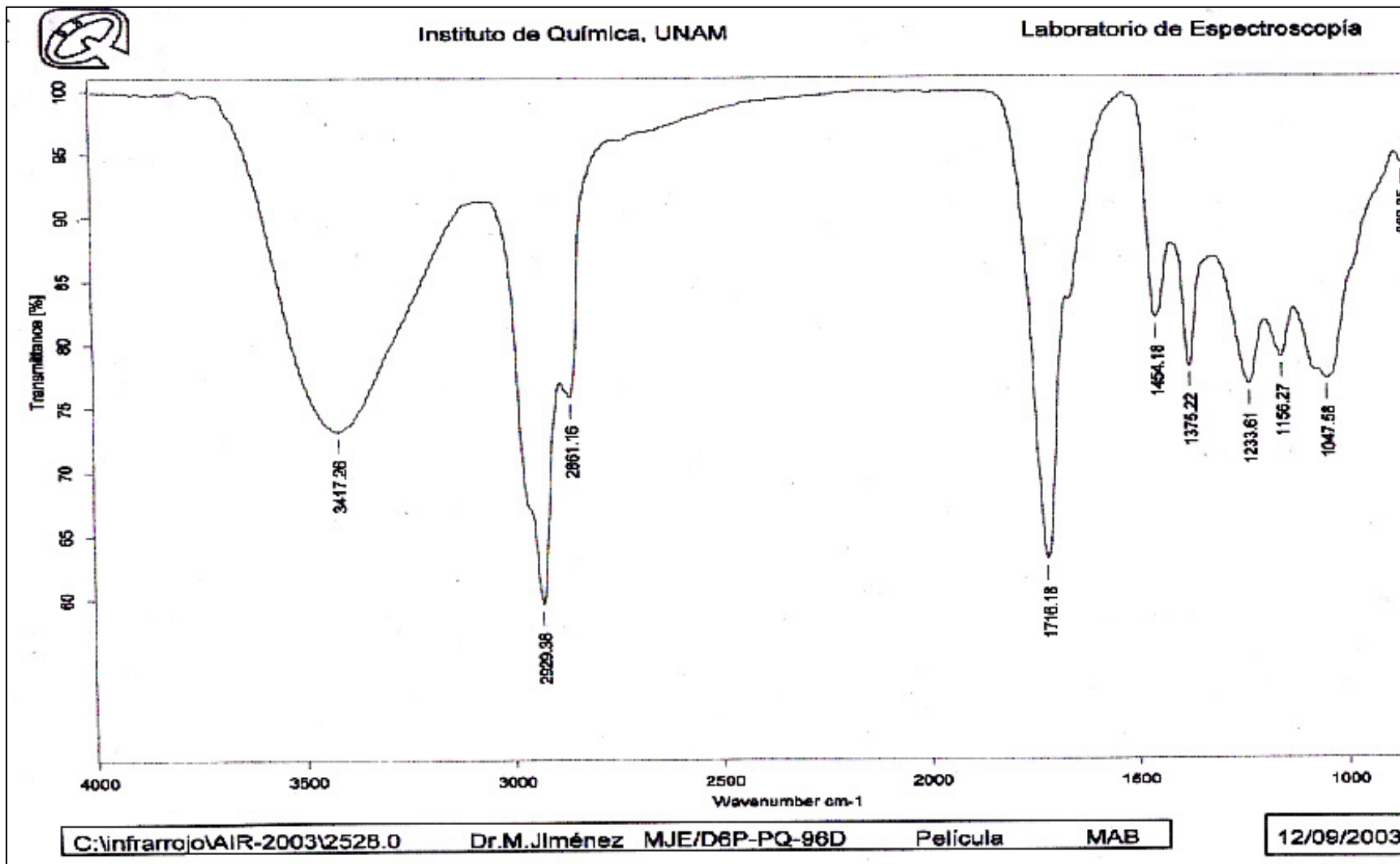
ESPECTRO 17. Infrarrojo (IR) de la fracción 27 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.



ESPECTRO 18. Infrarrojo (IR) de la fracción 60 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.



ESPECTRO 19. Infrarrojo (IR) de la fracción 80 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.



ESPECTRO 20. Infrarrojo (IR) de la fracción 96 del extracto hexánico de hojas e inflorescencias.

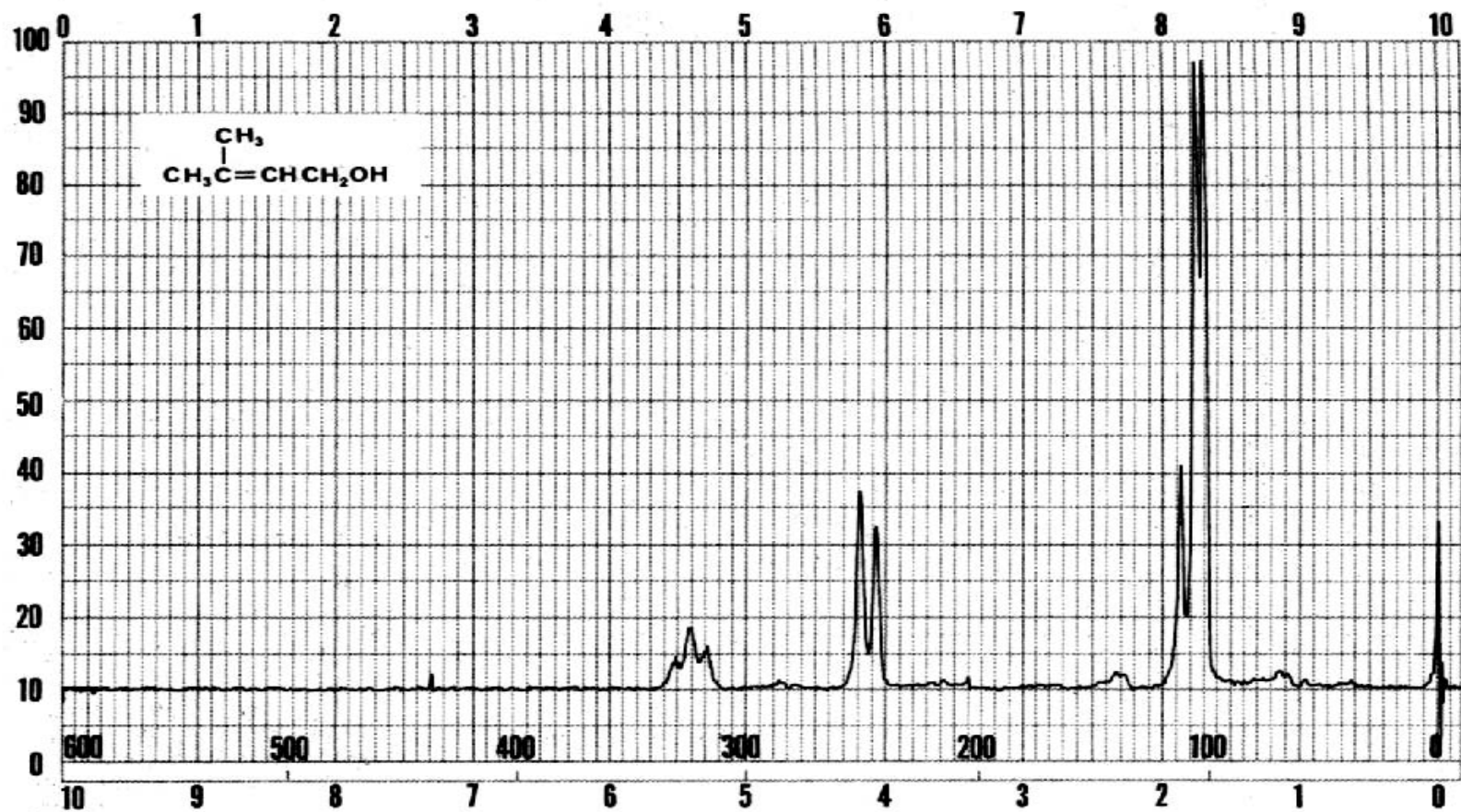
16,235-3

3-Methyl-2-buten-1-ol, 96%

$(\text{CH}_3)_2\text{C}=\text{CHCH}_2\text{OH}$

M.W. 86.13 b.p. 140° n_D^{20} 1.4412 d 0.848

Beil. 1,444



ESPECTRO 21. RMN-¹H de 3-metil-2-buten-1-ol.

BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Urmeneta, B. 1999. **Conservación y mantenimiento de bacterias**. En: Díaz, R., Gamazo, C. y López-Goñi, I. Manual Práctico de Microbiología. 2ª edición. Masson. México. pp: 14-16.
- Argueta, V.A., Cano, A.L. y Rodarte, M.E. 1994. **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana**. Tomo II. Instituto Nacional Indigenista. México.
- Avila, J.G. 1996. **Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha**. Tesis Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. México.
- Avila, J.G. 2002. **Estudio Fitoquímico de *Buddleja perfoliata* y *Buddleja scordioides*. Evaluación de la actividad antibacteriana y fotoprotectora de sus principales metabolitos secundarios**. Tesis Doctorado. Instituto de Química. UNAM. México.
- Barry, A.L. y Thornsberry, C. 1987. **Pruebas de susceptibilidad: Técnicas para pruebas de difusión**. En: Lennette, E.H. (ed). Manual de Microbiología Clínica. 4ª edición. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp: 561-574.
- Béjar, E., Reyes-Chilpa, R. y Jiménez-Estrada, M. 2000. **Bioactive compounds from selected plants used in XVI century Mexican traditional medicine**. In: Atta-ur-Rahman (Ed.). *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier. Amsterdam. pp: 799-844.
- Benítez, G. 1986. **"Árboles y Flores del Ajusco"**. Instituto de Ecología. Museo de Historia Natural de la Ciudad de México.
- Bohlmann, F. y Suwita, A. 1978. **New terpene derivates from *Piqueria trinervia***. *Phytochemistry*. 17(3): 560-561.
- Bohlmann, F. y Zdero, C. 1968. **Isolierung von (-)- α -santalal aus *Piqueria trinervia***. *Tetrahedron Letters*. 9(12): 1533-1535.
- Borchers, A.T., Keen, C.L., Stern, J.S. y Gershwin, M.E. 2000. **Inflammation and native american medicine: the role of botanicals**. *American Journal of Clinical Nutrition*. 72: 339-347.
- Bravo, M. 1959. **Causas Principales de Mortalidad en México, según edad y sexo**. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (Mexico)* 19: 1181-1201.

- Bravo-Hollis, H., 1978. **Las cactáceas de México**. UNAM. México.
- Breedlove, D.E. 1986. **Flora de Chiapas. Listados Florísticos de México**. 4: i-v, pp: 1-246.
- Briskin, D.P. 2000. **Medicinal plants and phytomedicines**. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*. 124: 507-514.
- Brooks, G.F., Butel, J.S. y Morse, S.A. 2002. **Microbiología Médica**. 17ª edición. Manual Moderno. México. pp: 277-283.
- Bye, R. 2003. **Aprovechamiento sustentable de plantas medicinales en la Sierra de Álvarez, San Luis Potosí, México**. UNAM. México.
- Caballero, J. 1990. **El uso de la diversidad vegetal en México: tendencias y perspectivas**. *Medio Ambiente y Desarrollo en México*. Vol. I. Editorial Porrúa. México. pp: 257-288.
- Carson, C.F., Mee, B.J. y Riley, T.V. 2002. **Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46(6): 194-1920.
- Castro, C., Jiménez, M. y González de la Parra, M. 1992. **Inhibitory Effect of Piquerol A on the growth of Epimastigotes of *Trypanosoma cruzi***. *Planta Medica*. 58: 281-282.
- Chapman and Hall, 1982-2004. **Dictionary of Natural Products**. CD-ROM v.12:1.
- Chávez, A. 1979. **Nutrición y Desarrollo Infantil**. 19ª edición. Interamericana. pp: 67-77.
- Claver, F.S., Vendrell, B.E., Minardi, M.R., Morales Suárez-Varela, M.M. y Llopis-González, A. 2000. **Enfermedades parasitarias de origen alimentario más frecuentes en España: incidencia y comparación con las de origen vírico y bacteriano**. *Ars Pharmaceutica*. 41(3): 293-305.
- Collins, C.H. 1969. **Métodos Microbiológicos**. Editorial Acribia. Zaragoza. España. pp: 155-169.
- Comisión de Recursos Naturales y Desarrollo Rural de Xochimilco. Dirección Ejecutiva de Conservación y Restauración de Recursos Naturales. 2002. **El Suelo de Conservación del Distrito Federal. Rasgos biológicos**. Secretaría del Medio Ambiente. México.
- Cordero, C. 1996. **La industria farmacéutica en busca de nuevos elementos: explorar la biodiversidad**. *Biodiversitas*. Año 2. No. 10. CONABIO.

- Cowan, M. 1999. **Plant products as antimicrobial agents.** *Clinical Microbiology Reviews.* 12(4): 564-582.
- Craig, W.J. 1999. **Health-promoting properties of common herbs.** *American Journal of Clinical Nutrition.* 70: 491-499.
- Cruz-Ortega, R., Anaya, A.L., Gavilanes-Ruiz, M., Sánchez-Nieto, S. y Jiménez-Estrada, M. 1990. **Effect of Diacetyl Piquerol on H⁺ -ATPase Activity of Microsomes from *Ipomoea purpurea*.** *Journal of Chemical Ecology.* 16(7): 2253-2261.
- Cruz-Reyes, A., Chavarín, C., Campos-Arias, M.P., Taboada, J. y Jiménez-Estrada, M. 1989. **Actividad Molusquicida del Piquerol A aislado de *Piqueria trinervia* (Compositae) sobre ocho especies de caracoles pulmonados.** *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz (Brasil).* 84: 35-40.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.D., Wood, W.B. y McCarty, M. 1978. **Tratado de Microbiología.** 2^a edición. Salvat Editores, S.A. Barcelona. España. pp: 190-209.
- Dey, P.M. and Harborne, J.B. 1991. **Methods in plant biochemistry.** Vol. 7. Terpenoids. Academic Press. Pp: 43-98.
- Eslava, C.A. 2001. **Compounds in medicinal plants could protect against bacterial diarrheal diseases.** *101st General Meeting of the American Society for Microbiology.* Florida. EEUU.
- Evans, D.J. y Evans, D.G. 2000. ***Escherichia coli* in diarrheal disease.** In: Samuel Baron. Medical Microbiology. Sección I Bacteriology. Capítulo 25. 4^a edición. Graduate School of Biomedical Sciences. University of Texas Medical Branch. USA.
- Finegold, S.M. y Jo Baron, E. 1989. **Métodos para evaluar la efectividad antimicrobiana.** En: Diagnóstico Microbiológico. 7^a edición. Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. pp: 191-210.
- Finkelstein, R.A. 2000. **Cholera, *Vibrio cholerae* 01 and 0139, and other pathogenic vibrios.** In: Samuel Baron. Medical Microbiology. Sección I Bacteriology. Capítulo 24. 4^a edición. Graduate School of Biomedical Sciences. University of Texas Medical Branch. USA.
- Foster, T.J. 2000. ***Staphylococcus*.** In: Samuel Baron. Medical Microbiology. Sección I Bacteriology. Capítulo 12. 4^a edición. Graduate School of Biomedical Sciences. University of Texas Medical Branch. USA.

- Frenk, J., Bobadilla, J.L. y Sepúlveda, J. 1988. **La Transición de la Salud en México: Un Modelo Propio**. *Revista Demos*. No.1. pp: 28-29.
- Galicia, M.V. 1992. "**Listado Florístico del Estado de México y Regiones Circundantes (de los Estados de Hidalgo, Querétaro y Distrito Federal) Basado en las Colecciones de Eizi Matuda**". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Giannella, R.A. 2000. **Salmonella**. In: Samuel Baron. Medical Microbiology. Sección I Bacteriology. Capítulo 21. 4ª edición. Graduate School of Biomedical Sciences. University of Texas Medical Branch. USA.
- González de la Parra, M., Anaya, A.L., Espinosa, F., Jiménez, M. y Castillo, R. 1981. **Allelopathic Potential of *Piqueria trinervia* (Compositae) and piquerol A and B**. *Journal of Chemical Ecology*. 7: 509-515.
- González de la Parra, M., Chávez-Peña, D., Jiménez-Estrada, M. y Ramos-Mando, C. 1991. **Acaricidal Potential of Piquerols A and B against *Boophilus microplus***. *Pesticide Sciences*. 33: 73-80.
- González, M.S. y Peñalosa, C.I. 2000. **Manual de Biomoléculas**. ENEP Iztacala. UNAM. México.
- Hale, T.L. y Keusch, G.T. 2000. **Shigella**. In: Samuel Baron. Medical Microbiology. Sección I Bacteriology. Capítulo 22. 4ª edición. Graduate School of Biomedical Sciences. University of Texas Medical Branch. USA.
- Hamburger, M y Hostettmann, K. 1991. **Bioactivity in Plants: The link between Phytochemistry and Medicine**. *Phytochemistry*. 30(12): 3864-3874.
- Harvey, A. 2000. **Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products**. *Drug Discovery Today*. 5(7): 294-300.
- Heinrich, M., Robles, M., West, J.E., Ortiz de Montellano, B.R. y Rodríguez, E. 1998. **Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae)**. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 38: 539-565.
- Hendrickson, D.A., 1987. **Reactivos y Colorantes**. En: Lennette, E.H. Manual de Microbiología Clínica. 4ª edición. Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Huerta, C. 1997. **La Herbolaria: Mito o Realidad**. *Biodiversitas*. Año 3. No. 12. CONABIO.
- Instituto Nacional de Biodiversidad (INBio). 1997. **Lista de especímenes de *Piqueria trinervia***. Costa Rica.

- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2001. **Estructura de las Defunciones por Países Seleccionados según Principales Causas de Mortalidad General**. Dirección General de Estadística. Dirección de Estadísticas Demográficas y Sociales. México.
- Jiménez-Estrada, M. y Díaz, E. 1998. **Revised Structure of Trinervinol (*Piqueria trinervia Cav.*)**. *Natural Product Letters*. 12(3): 181-190.
- Jiménez-Estrada, M. y González de la Parra, M. 1983. **Nuevo alcohol diterpénico aislado de *Piqueria trinervia Cav.*** *Revista Latinoamericana de Química*. 14: 20-23.
- Jiménez-Estrada, M. y Rodríguez, C. 1990. **Acción tóxica del piquerol A (terpeno) y su derivado sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* y *Spodoptera frugiperda***. Memorias del XXV Congreso de Entomología y II Simposio Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. Oaxaca. México.
- Jiménez-Estrada, M., González de la Parra, M., Meléndez, M., Campos, P. y Soriano-García, M. 1996. **Trinervinol**. *Acta Crystallographica Section C*. 52: 1458-1460.
- Jiménez-Estrada, M., Navarro, A., Flores, M.V., Reyes-Chilpa, R., Hernández, B., Anaya, A.L. y Lotina-Hennsen, B. 1996. **Transformation of terpene piquerol A to hydroquinone and phenolic derivates. Effect of these compounds on weeds**. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*. 44: 2839-2841.
- Kaufman, P.B., Cseke, L.J. Warber, S., Duke, J.A. y Brielmann, H.L. 1999. **Natural products form plants**. CRC Press, Boca Ratón, FL.
- Kelley, S.G., Post, F.J. 1991. **Microbiology Techniques**. Star Publishing Company. Belmont. California. pp: 149-155.
- Koneman, W.E. 1985. **Diagnóstico Microbiológico**. Ed Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
- Kurnst, L. y Samuels, A.L. 2003. **Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax**. *Progress in Lipid Research*. 42: 51-80.
- Levy, S.B. 2002. **Factors impacting on the problem of antibiotic resistance**. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 49: 25-30.
- Lewin, B.M. 2000. **Genes VII**. Oxford University Press.

- Longanga-Otshudi, A., Vercruyssen, A y Foriers, A. 2000. **Contribution to the ethnobotanical, phytochemical and pharmacological studies of traditionally used medicinal plants in the treatment of dysentery and diarrhea in Lomela area, Democratic Republic of Congo (DRC).** *Journal of Ethnopharmacology*. 71: 411-423.
- Lozoya, X. 1999. **La Herbolaria en México.** Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. México. pp: 63.
- Martínez, J.L. and Baquero, F. 2002. **Interactions among strategies associated with bacterial infection: Pathogenicity, Epidemicity and Antibiotic Resistance.** *Clinical Microbiology Reviews*. 15(4): 647-679.
- Martínez, M. 1979. **Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas.** Fondo de Cultura Económica. México. pp: 436.
- Mateos, P. 2003. **Agentes Antimicrobianos y Microorganismos.** Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.
- McVaugh, R. 2000. **Botanical Results of the Sessé & Mociño Expedition (1787-1803) VII. A guide to relevant scientific names of plants.** Hunt Institute for Botanical Documentation. Carneige Mellon University. Pittsburgh, Pennsylvania. EEUU.
- Mendoza, J.L., Jiménez-Estrada, M. y Lotina-Hennsen, B. 1994. **Piquerol A and Diacetyl Piquerol act as energy transfer inhibitors of photosynthesis.** *Pesticide Sciences*. (40): 37-40.
- Mims, C.A., Playfair, J.H.L., Roitt, I.M., Wakelin, D., Williams, R. 1993. **Microbiología Médica.** Mosby Doyma Libros. México.
- Molina, R.A. 1975. **Enumeración de las plantas de Honduras.** *Ceiba*. 19(1): 1-118.
- Narro, J.R., Urbina, M., Castro, R., Palma, J.L. y Palma, Y. 1984. **Evolución reciente de la mortalidad en México.** Comercio Exterior. 34: 847-866.
- Nascimento, G.G.F., Locatelli, J., Freitas, P.C. y Silva, G.I. 2000. **Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistance bacteria.** *Brazilian Journal of Microbiology*. 31: 247-256.
- Newell, J. 2002. **Information on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* bacteria.** Cambridge Springs High School. USA.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). **Resistance to Antimicrobial Agents**. Weekly Epidemiological Record – Releve Epidemiologique Hebdomadaire. 1997; (72) 45: 333-336. World Health Organization – Organisation Mondiale de la Santé, Geneve.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). **Traditional Medicine**. Fact Sheet No. 134. September 1996.
- Pourchet, T. y Behnke, J. 1993. **The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra**. Espectro No. 16,235-3. Aldrich Chemical. Milwaukee. EEUU.
- Reyes, J.M. y Martínez, D. 2002. **El futuro de la vegetación. Elementos**. *Ciencia y Cultura*. No. 47. Vol. 9. pp: 45-49.
- Romo de Vivar, A. 1985. **Productos Naturales de la Flora Mexicana**. Editorial Limusa, S.A. México. pp: 59-66.
- Romo, J.M., Romo de Vivar, A. Quijano, L., Ríos, T. y Díaz, E. 1970. **Los componentes terpenoides de la *Piqueria trinervia* Cav.** *Revista Latinoamericana de Química*. 1:72-81.
- Rouf, A.S.S., Islam, M.S. y Rahman, M.T. 2003. **Evaluation of antidiarrhoeal activity *Rumex maritimus* root**. *Journal of Ethnopharmacology*. 84:307-310.
- Rubio, M., Bunge, A.V. y Jiménez-Estrada, M. 1985. **Estructura electrónica de piquerol A y piquerol B**. *Revista Latinoamericana de Química*. 16(2): 69-72.
- Rzedowski, J. y Rzedowski, G. 1985. **Flora Fanerogámica del Valle de México**. Vol. II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto de Ecología. México. Pp: 467-468.
- Rzedowski, J., 1978. **La vegetación de México**. Limusa. México.
- Saad, I., Díaz, E., Chávez, I., Reyes-Chilpa, R., Rubluo, A. y Jiménez-Estrada, M. 2000. **Antifungal monoterpene production in elicited cell suspension cultures of *Piqueria trinervia***. *Phytochemistry*. (55): 51-57.
- Sangaiah, R y Krishna Rao, G.S. 1981. **Revision of the structure assigned to a monoterpene isolated from *Piqueria trinervia***. *Tetrahedron Letters*. 22(19): 1843-1844.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT-PROCYMAF). 2002. **Especies con usos no maderables en bosques tropicales y subtropicales en los Estados de Durango, Chihuahua, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca**. México.

- Secretaría de Salud del Distrito Federal e Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (SSA-INEGI). **Principales Causas de Mortalidad General 2000. Estimaciones de la población en México 1995-2050**, CONAPO.
- Secretaría de Salud. Boletín Mensual de Epidemiología. 1992. **Principales causas de muerte. Diez causas principales de mortalidad. Población indígena, México, 1990**. INEGI.
- Sena, X., Da Costa, S., Ferri, P.H., Lisboa, O.F., De Freitas, T., Ferreira, A.C., Rodrigues, M.R. 2002. **Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans***. *Revista da Sociedade de Medicina Tropical*. 35(6): 623-627.
- Sepúlveda, J. 1994. **Diarreas y Cólera**. Cuadernos de Salud. SSA. México.
- Sneden, A.T. 2003. **Natural Products as Medicinally Useful Agents**. Facultad de Química. Universidad Commonwealth Virginia.
- Solórzano-Santos, F. y Miranda-Navales, M.G. 1998. **Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos**. *Salud Pública de México*. 40(6): 510-516.
- Soriano-García, M., Jiménez, M., González de la Parra, A., Navarro, A. y Campos, P. 1996. **Acetonide-3-trinervinone**. *Acta Crystallographica Section C*. 52: 1460-1462.
- Soriano-García, M., Jiménez, M., González de la Parra, M., Navarro, A. y Campos, M.P. 1996. **Acetonide-3-trinervinone**. *Acta Crystallographica Section C*. 52: 1460-1462.
- Soriano-García, M., Jiménez, M., González, M., Hernández, A., Schatz, M. y Campana, C. 1983. **Crystal and molecular structure of piquerol A: a potent growth-inhibiting factor**. *Chemistry Letters*. pp: 617-620.
- Strohl, W. R. 2000. **The role of natural products in a modern drug discovery program**. *Drug Discovery Today*. 5(2): 39-41.
- Turner, B.L. 1997. **The Comps of Mexico: A systematic account of the family Asteraceae**. Vol. 1. Eupatorieae. *Phytologia Memoirs*. 11: 1-272.
- Tyler, V.E. 1999. **Phytomedicines: back to the future**. *Journal of Natural Products*. 62: 1589-1592.
- Uetrecht, J y Wamsley, S.L. 1998. **Principles of antimicrobial therapy**. In: Harold Kalant and Walter H.E. (eds). Principles of medical pharmacology. 6th edition. Oxford. USA. Oxford University Press. pp: 650-655.

- Vanden Berghe, D.A. y Vlietinck, A.J. 1991. **Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants.** In: Methods in plant biochemistry. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P.M. Academic Press. New York, USA. pp: 47-71.
- Verpoorte, R. 1998. **Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development.** *Drug Discovery Today.* 3(5): 232-238.
- Walsh, S.E., Maillard, J.Y., Russell, A.D., Catrenich, C.E., Charbonneau, D.L. y Bartolo R.G. 2003. **Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria.** *Journal of Applied Microbiology.* 94: 240-247.
- Wink, M. 1999. **Introduction: biochemistry, role and biotechnology of secondary products.** In M Wink, ed, Biochemistry of Secondary Products Metabolism. CRC Press. Boca Raton, FL. pp: 1-16.
- (WWF) World Wildlife Fund. 1999. **Programa México.** Biographica. México.