



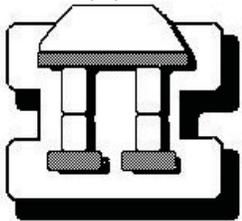
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Actividad Antibacteriana del Extracto
Hexánico de *Hippocratea excelsa* HBK.**

Tesis que para obtener
el Título de Biólogo
P r e s e n t a
Elena Plácido Jurado

Asesor: Dr. Fernando Calzada Bermejo



México, D.F.

2005



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.

Jurado Asignado:

Presidente: Dra. Beatriz Vázquez Cruz.

Vocal: Dr. Fernando Calzada Bermejo.

Secretario: Biol. Soledad Chino Vargas.

1er suplente: M en C. David Segura Cobos.

2do Suplente: M en C. Alma Delia Alanís Ríos.

Sitio donde se desarrollo el tema:

Unidad de Investigación Medica
En Farmacología de Productos
Naturales del Hospital de Pediatría.
Centro Médico Siglo XXI

Asesor: Dr. Fernando Calzada Bermejo. _____

Asesor Técnico: M en C. Alma Delia Alanís Ríos. _____

Sustentante: Elena Plácido Jurado. _____

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores "IZTACALA" de la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado a lo largo de mi carrera, por darme la oportunidad de ser una profesionista y así permitirme ser digna y orgullosa hija de este campus.

Al consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través del proyecto CONACYT 38030-M.

A la Unidad de Investigación Médica en Farmacología en Productos Naturales del IMSS en el Hospital de Pediatría donde realice este trabajo de Tesis.

A la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del IMSS por la donación de las bacterias utilizadas en este trabajo.

Al Dr. Fernando Calzada Bermejo, por aceptarme y ayudarme a realizar y terminar este trabajo, por darme fortaleza en momentos difíciles, por creer en mi y ayudarme a llegar a mi meta, GRACIAS DOC.

A la Dra. Mariana Meckes Fisher, Jefa de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales.

A la M en C. Alma Delia Alanís Ríos, por su apoyo y asesoramiento en la realización de esta tesis.

A la M en C. Abigail Aguilar Contreras, Jefa del Herbario IMSSM CMNS-XXI por su apoyo para la identificación del ejemplar de *Hippocratea excelsa* HBK.

A la Biologa Edith Lopez Villafranco, Jefa del Herbario IZTA, a la M. en C. Gloria Garduño Solórzano y a la Biologa Gabriela Jiménez Arreola, por su apoyo para la obtención del ejemplar de herbario de las partes aéreas de *Hippocratea excelsa* HBK.

D E D I C A T O R I A S

A D I O S

Gracias, Por darme la vida, el valor y la fortaleza de salir adelante cada día, para llegar a lograr mis sueños y poderlos compartir con mis padres, mi hija, mi esposo y mis hermanas. Y sobre todo por demostrar tu existencia en mi hija.

A M I F R I D I T A H E R M O S A :

Corazón, hemos logrado una meta juntas, por que tú eres mi razón de ser, por ti he salido adelante y por que quiero que te sientas orgullosa de mi. Eres lo mejor que ha pasado en mi vida. Me has enseñado que lo sencillo de la vida es lo más importante para poder disfrutarla. Hijita mía te quiero mucho.

A m i M A M I :

Mami, Gracias por estar a mi lado siempre, enseñándome a salir adelante, por cuidarme y apoyarme en todas mis etapas de vida, por demostrarme tu amor, tu fortaleza, tu bondad, tu nobleza y tu sabiduría del como ves la vida, gracias a ti he sabido ser mamá y ser una mujer. Mami eres EXCEPCIONAL.

A m i P A P I

Papi, Gracias por hacer mi vida feliz, por enseñarme y educarme, por ser un Papá responsable y honesto, por ser un ejemplo de valores y superación. Por apoyarme, escucharme y ayudarme a superar y demostrándome siempre que no estoy sola, que cuento contigo. Gracias a tus ejemplos que me han permitido llegar hasta aquí. Te Quiero Mucho.

A M i A L V A R I T O :

Amor, Gracias por estar conmigo toda la carrera; apoyándome, aprendiendo juntos, por ayudarme y enseñarme. Por ser mi amigo y por creer siempre en mi; Alcanzar esta meta es gracias a ti por ser paciente y permitirme desarrollarme. Ahora estas conmigo toda mi vida y le doy gracias a Dios que ha sido. Te Amo.

A m i s H E R M A N A S .

Celia, Tita y Tony. Gracias, Por enseñarme y ayudarme a seguir sus pasos como profesionistas, por superar todo juntas, por todo su apoyo, por protegerme y cuidarme, por estar conmigo siempre que las necesito y darme ánimos de no dejarme caer. Las Quiero Mucho

DEDICATORIA

A mi Prima Laura Rubí y Fam. Ramírez Plácido Rubick, Gracias por estar siempre conmigo, por demostrarme tu apoyo y tu cariño, por ser mi incondicional, por pasar siempre momentos muy agradables y felices, por compartir tus sueños y por que quiero que lleguen tú y Rodrigo muy alto. Gracias a tu familia por todo su apoyo y cariño.

A mi prima Liliana y Fam., Plácido Barragán. Lili, Gracias por apoyarme y darme ánimos de seguir adelante, por todos tus consejos, por alegrarte siempre por mis logros, por pasar momentos bonitos y porque siempre la pasamos bien, sobre todo por demostrarme tu cariño, aprecio y comprensión. Gracias por todo su apoyo y cariño a tu familia y a ti.

A mis Amiguitos

A mis adorables SPICE Adriana, Myriam, Melly, Gustavo, Saúl, Israel, Pigi y Edy². Gracias por compartir conmigo todos los momentos padrísimos durante la carrera. Por aguantarnos y tenernos paciencia, por ayudarnos a salir adelante, por ser honestos y demostrarme su amistad en todo momento por superar adversidades. Todos ustedes me han demostrado su amistad de muchas maneras y por eso los considero parte importante de mí. Los Quiero Mucho Colegas.

A mis Compañeras y Amigas del Centro Médico Nacional siglo XXI

Gracias, a Erica, Elizabeth, Martha, Rosi, Tere, Marthita, Toño y Abraham, por su grata compañía en el transcurso de este trabajo. Y en especial a Claudia Vázquez por apoyarme y ayudarme siempre en todas mis dudas, y sobre todo por ser una persona noble y comprensible y por ser una gran amiga. No las olvidaré.

biología



Im posible es solo una palabra que usan los hombres débiles para vivir fácilmente en el mundo que se les dio, sin atreverse a explorar el poder que tienen para cambiarlo.

Im posible no es un hecho, es una opinión.
Im posible no es una declaración, es un reto.
Im posible es potencia. Im posible es temporal.



CONTENIDO

Lista de cuadros	I
Lista de esquemas	I
Lista de figuras	I
Lista de tablas	I
Lista de gráficas	II
Lista de espectros	II
Lista de abreviaturas	III
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Medicina tradicional	3
1.2 Generalidades de las diarreas	5
1.3 Generalidades de algunas bacterias causantes de diarrea de la familia Enterobacteriaceae	7
1.3.1 Género <i>Escherichia</i>	8
1.3.2 Género <i>Shigella</i>	9
1.3.3 Género <i>Salmonella</i>	11
1.4 Género <i>Vibrio</i>	13
1.5 Algunos fármacos utilizados para el tratamiento de las diarreas infecciosas	14
2. GENERALIDADES DE <i>Hippocratea excelsa</i> HBK	20
2.1 Fitoquímica y farmacología	24
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	27

5. OBJETIVO GENERAL	28
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS	29
6.1 Material vegetal	29
6.2 Preparación del extracto héxanico de la raíz de <i>Hippocratea excelsa</i> HBK	29
6.3 Ensayo biológico	30
6.4 Métodos cromatográficos	31
6.5 Fraccionamiento del extracto hexanico de <i>Hippocratea excelsa</i> HBK	31
6.6 Separación y purificación de la fracción F12E	32
7. RESULTADOS	33
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
9. CONCLUSIONES	41
10. BIBLIOGRAFÍA	42
11. APÉNDICE	47

Lista de cuadros

Cuadro 1. Resumen del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto hexánico de <i>Hippocratea excelsa</i> HBK _____	32
Cuadro 2. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción primaria F12E _____	32

Lista de esquemas

Esquemas 1. Obtención del extracto hexánico de <i>Hippocratea excelsa</i> HBK _____	29
---	----

Lista de figuras

Figura 1. Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de diarreas infecciosas provocadas por bacterias Gram-negativas _____	15
Figura 2. <i>Hippocratea excelsa</i> HBK _____	22
Figura 3. Corteza de la raíz de <i>Hippocratea excelsa</i> HBK _____	23
Figura 4. Compuestos aislados de <i>Hippocratea excelsa</i> HBK _____	24

Lista de tablas

Tabla 1. Especies del género de <i>Hippocratea</i> que crecen en México _____	20
Tabla 2. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto hexánico y fracciones primarias F1E/F14E derivadas de la raíz de <i>Hippocratea excelsa</i> HBK _____	33
Tabla 3. Resultados de la actividad antibacteriana de la fracción primaria F12E y _____	34
fracciones secundarias FS1E/FS8E derivadas de la raíz de <i>Hippocratea excelsa</i> HBK	

Lista de graficas

Gráfica 1. Resultados de los porcentajes de inhibición del extracto hexánico y fármacos control	36
Gráfica 2. Resultados de los porcentajes de inhibición del extracto y fracciones activas F1E y F7E	36
Gráfica 3. Resultados de los porcentajes de inhibición de las fracciones F12E, FS1E, FS8E y cloranfenicol	39

Lista de Espectros

Espectro A-1. Espectro en el IR del escualeno	48
Espectro A-2. Espectro de RMN- ¹ H a 500MHz del escualeno	49
Espectro A-3. Espectro de RMN- ¹³ C a 500MHz del escualeno	50
Espectro A-4. Espectro de RMN- ¹ H a 300MHz de los ésteres metílicos	51
Espectro A-5. Espectro de IE del hexadecanoato de metilo	52
Espectro A-6. Espectro de IE heptadecanoato de metilo	53
Espectro A-7. Espectro de IE octadecanoato de metilo	54
Espectro A-8. Espectro de IE pentaicosanoato de metilo	55
Espectro A-9. Espectro de IE hexaeicosanoato de metilo	56
Espectro A-10. Espectro de RMN- ¹ H a 500 MHz del β-sitosterol	57
Espectro A-11. Espectro IR en el β-sitosterol	58

Lista de abreviaturas

AcOEt	acetato de etilo
β	beta
c/u	cada uno
$^{\circ}$ C	grados centígrados
cm	centímetros
CCA	cromatografía en columna abierta
CCF	cromatografía en capa fina
CHCl ₃	cloroformo
CMN	Centro médico Nacional
<i>E</i>	<i>Escherichia</i>
EM	Espectro de masas
EMB	agar eosina-azul de metileno
g	gramo
h	hora
HE	agar Hektoen
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
IR	infrarojo
Kg	kilogramo
L	litro
m	metro
M en C	Maestra en Ciencias
mg	miligramo
mm	milímetro
μ g	microgramo
μ m	micrómetro
ml	mililitro
MeOH	metanol
min	minutos
MH	agar Muller Hinton
nm	nanómetros
<i>S</i>	<i>Shigella</i>
UFC	unidades formadoras de colonias
U.V	ultravioleta
UIMFPN	Unidad de Investigación Médica en Farmacología en Productos Nataturales
RMN-H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN-C ¹³	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
%	porcentaje

RESUMEN

Se realizó la determinación de la actividad antibacteriana del extracto hexánico y fracciones derivadas de la corteza de *Hippocratea excelsa* HBK. A partir de esta, se preparó el extracto orgánico, empleando hexano como disolvente de extracción. El extracto resultante se sometió al ensayo de actividad antibacteriana a concentración de 8 mg/ml, encontrándose porcentajes de inhibición superiores al 59 % contra las cepas de *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Salmonella sp* y *V. cholerae*.

El fraccionamiento del extracto hexánico mediante CCA permitió obtener 14 fracciones primarias, de estas las fracciones F1E y F7E mostraron la mayor actividad antibacteriana. En el caso de la fracción F1E, obtuvo el primer lugar de inhibición contra las cepas *E. coli* -1, *S. sonnei* -1, *S. flexneri* -1 y *Salmonella* -1 con porcentajes de inhibición dentro del rango de 36 al 52 %.

La fracción F7E mostró el primer lugar solo para las cepas de *Salmonella* -2 y *Vibrio cholerae* con porcentaje de inhibiciones de crecimiento bacteriano del 33 y 39 %, respectivamente.

En el caso de la fracción F2E fue posible establecer mediante el análisis de espectros de IR, RMN-¹H, RMN-³C y EM que se trataba del escualeno. El porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano del escualeno contra las cepas usadas fue del 14 al 37 %.

En el caso de la fracción F4E fue posible establecer mediante el análisis de los espectros de IR, RMN-¹H, RMN-³C y un experimento de cromatografía de gases acoplada a masas CG-EM que se trataba de una mezcla de 5 ésteres metílicos de ácidos grasos: hexadecanoato de metilo, heptadecanoato de metilo, octadecanoato de metilo, pentaecosanoato de metilo, y hexaeicosanoato de metilo, los porcentajes de inhibición de la mezcla de ésteres metílicos contra las cepas usadas fue del 14 al 35 %.

La separación de la fracción F12E se hizo mediante CCA obteniéndose un total de ocho fracciones secundarias, de estas las más activas fueron FS1E y FS8E. La fracción FS8E obtuvo el primer lugar de inhibición contra ocho de las cepas usadas, con inhibiciones de crecimiento del 46 al 95 %. La fracción FS1E mostró el mismo porcentaje de inhibición que las fracciones FS2E y FS8E

para *E. coli* ATCC 25922 (49 %), *Shigella flexneri* -1 (60 %) y *Salmonella sp* -2 (46 %). Adicionalmente, fue la mejor contra *E. coli* -1 (58 %).

De la fracción FS6E se identificó el β -sitosterol mediante el análisis de sus espectros IR, RMN-¹H, RMN-¹³C y EM, el efecto de inhibición del compuesto para siete cepas fue del 2 al 19%.

La actividad antibacteriana mostrada tanto en fracciones y compuestos aislados puede explicar en parte el uso que se hace de la raíz de *Hippocratea excelsa* en el tratamiento de la diarrea o disentería en las prácticas médicas alternativas de México.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Medicina tradicional

Desde la aparición del hombre sobre la tierra, siempre ha tenido necesidad de prevenir, tratar, controlar y/o curar sus enfermedades, para ello ha recurrido a los medios que están a su alcance entre ellos a los vegetales. El hombre ha confirmado su dependencia al reino vegetal y las ligas que lo unen a él, pues los vegetales han sido parte fundamental como proveedores de un gran número de especies con propiedades medicinales (Barcenás, 2001).

La práctica de la medicina tradicional dio inicio en el momento mismo en que el hombre hizo uso de alguna parte de un vegetal, animal o mineral para tratar sus padecimientos. En principio al azar, posteriormente con un conocimiento empírico del efecto medicinal en ocasiones con consecuencias fatales (Barcenás, 2001).

La extraordinaria riqueza florística (26 500 especies de las cuales aproximadamente 9 500 son endémicas), ubica a México en el cuarto lugar mundial en biodiversidad. Actualmente se han registrado en México alrededor de 4 000 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. Sin embargo, se calcula que en México y en el mundo, el estudio químico y farmacológico sólo se ha llevado a cabo en 5% de estas especies (Natura, 2004).

En la actualidad el interés por las plantas se manifiesta por ser una fuente muy rica de productos bioactivos, que en ocasiones son usados como prototipo para la obtención de fármacos. Adicionalmente, la industria farmacéutica ha encontrado materia prima para el comercio en productos farmacéuticos que contienen plantas, bajo la forma de tinturas, extractos y principios activos entre otros (Natura, 2004).

El objetivo de la investigación moderna de analizar y estudiar los efectos terapéuticos de las plantas, tiene como fin aumentar la confianza en los vegetales. Además, precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades para agrupar las plantas de efectos similares, elegir las más eficaces y darlas a conocer tomando en cuenta su efecto terapéutico. Como resultado de los pocos estudios sobre las plantas medicinales de uso tradicional, se han obtenido moléculas, que poseen acción curativa sobre algunas enfermedades como diarrea, disentería, cáncer, paludismo entre otros (Gómez, 2000).

Es de destacar que para el tratamiento de trastornos gastrointestinales que incluyen a la diarrea y la disentería, en la medicina tradicional mexicana se usan una gran variedad de especies vegetales, sin embargo como ya se ha mencionado son escasos los conocimientos acerca de los valores terapéuticos y farmacológicos que tienen estas plantas (Aguilar *et al.*, 1994). En México la diarrea es un problema serio de salud y una de las primeras 20 causas de enfermedad en la población (SS, 2001). Es por esto el interés de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales (UIMFPN) del IMSS, en demostrar algunas propiedades biológicas asociadas con el control de la diarrea (actividades antibacteriana, antiprotozoaria, antisecretora y antipropulsiva) de algunas especies vegetales selectas de la medicina tradicional mexicana (Calzada *et al.*, 1998). Con el fin de explicar las propiedades antidiarreicas que se le atribuyen a algunas de estas plantas. Recientemente la UIMFPN realizó la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro*, de 54 extractos derivados de 26 especies vegetales, contra ocho aislados de bacterias causantes de diarrea y disentería en la población mexicana: *Escherichia coli* (1 aislado), *Shigella sonnei* (2 aislados), *Shigella flexneri* (2 aislados), *Salmonella sp* (2 aislados) y *Vibrio cholerae* (1 aislado). En este estudio se encontró que las plantas más activas eran *Caesalpinia pulcherrima*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Cocos nucifera*, *Geranium mexicanum*, *Punica granatum* e *Hippocratea excelsa* (Alanís *et al.*, 2005), esta última objeto de la presente tesis.

1.2 Generalidades de las diarreas

Las diarreas en los países en desarrollo son causa importante de mortalidad y morbilidad en menores de cinco años. El número de muertes en la ciudad de México por enfermedades infecciosas intestinales en el año de 1998 fue de 855 por cada 1000 000 habitantes. La diarrea afecta a todos los grupos de edad; sin embargo, se observa con mayor frecuencia en los extremos de la vida, menores de cinco años y mayores de 65 años, convirtiéndolos en los grupos más vulnerables a este síntoma (Barcenás, 2001).

La diarrea es un síntoma que puede ser consecuencia de muchas enfermedades. Consiste en el aumento del volumen, fluidez, frecuencia de las deposiciones y/o una disminución de la consistencia de las deposiciones que se hacen normalmente, en relación con el patrón habitual de un individuo (MidVision, 1997).

Las diarreas generalmente son causadas por infecciones en los intestinos, los casos leves desaparecen en pocos días, los severos pueden causar deshidratación y muerte del individuo (Mograbi, 1984).

En las diarreas se produce pérdida de agua y de electrolitos como el sodio, potasio, magnesio, aniones orgánicos y cloro. El transporte pasivo y los canales del sodio se anulan en presencia de infecciones, la deshidratación consecuente lleva al colapso circulatorio, más precozmente en niños, ancianos y en personas debilitadas (Barcenás, 2001).

Varios son los factores más frecuentes como causas de diarrea entre ellos se incluyen los virus (*Rotavirus*), las bacterias (*Escherichia*, *Shigella* y *Campylobacter*, entre otros), los parásitos (*Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*), farmacológicos (fármacos diuréticos y antimicrobianos) y sicosomáticas (estrés) (Merck, 1999).

Las diarreas producidas por virus suelen ser líquidas, abundantes, no suelen contener moco ni sangre y en ocasiones se asocian a vómito y fiebre. Las diarreas producidas por bacterias, son más

densas, normalmente tienen moco y sangre, los vómitos son menos frecuentes y en ellas es más constante la fiebre (MidVision, 1997).

Las bacterias actúan por dos mecanismos el proceso de adherencia, en la que las bacterias se unen a la membrana celular del enterocito por medio de fimbrias pudiendo así multiplicarse, invadir, degenerar y matar posteriormente a la célula. El proceso adhesivo puede deberse a bacterias de los géneros *Escherichia*, *Salmonella* y *Shigella*, que colonizan casi como regla el intestino grueso y la porción distal del íleo, producen heces sanguinolentas, dolor abdominal, pujo y tenesmo.

La diarrea puede llegar a complicarse a disentería que se caracteriza por deposiciones diarreicas acuosas de pequeño volumen, dolores abdominales intensos acompañadas de sangre y moco. Se pueden producir úlceras en las paredes intestinales. Cuando los gérmenes causantes atraviesan la pared intestinal y pasan a la sangre, además se produce fiebre. La disentería puede ser producida por *Entamoeba histolytica* o por bacterias del género *Shigella*; La disentería se propaga por agua y alimentos contaminados (MidVision, 1997).

1.3 Generalidades de algunas bacterias causantes de diarrea de la familia Enterobacteriaceae

Las enterobacterias nombre común de una familia de bacterias Gram-negativas que reciben este nombre porque suelen encontrarse en el intestino de los mamíferos. La familia incluye muchos géneros como *Escherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratilla* y *Proteus* entre otros (Brock. 1993).

Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos cortos que pueden formar cadenas, móviles con flagelos peritricos, o inmóviles, no esporulados, anaerobios o aerobios facultativos, oxidasa negativos, no forman endoesporas, ni son acidorresistentes, crecen en presencia y ausencia de oxígeno; se desarrollan bien sobre peptona, extracto de carne y generalmente sobre medio Mc Conkey muestra algún crecimiento sobre glucosa como única fuente de carbono pero casi siempre requieren vitaminas o aminoácidos; son quimioorganotróficos, su metabolismo es respiratorio y fermentativo la capacidad para fermentar la lactosa y el tiempo empleado en hacerlo sirven para diferenciar los géneros, los que no realizan la fermentación son patógenos, su tamaño oscila entre 0.3 a 2 μm , poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. Son organismos que se encuentran habitando suelo, agua, materia en descomposición y en diversos productos alimenticios. Algunos microorganismos como *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Proteus* son parte de la flora normal del intestino, que en ocasiones pueden causar infecciones serias; otros como *Shigella* y *Salmonella* son patógenos causantes de diarrea y disentería. La familia incluye más de 20 géneros y 100 especies. Desde el punto de vista bioquímico se caracterizan por la capacidad de reducir los nitratos, fermentar la glucosa con producción de ácido o ácido y gas (Mandell, 1991; Jawetz *et al.*, 1987).

Entre las bacterias entéricas hay muchas cepas patógenas para el hombre, los animales y las plantas así como otras de importancia industrial. A pesar que hay una marcada relación genética entre muchas de las bacterias entéricas, como se demuestra por las homologías de DNA y la recombinación genética, se mantienen en géneros separados, sobre todo por razones prácticas. Debido a que estos organismos se cultivan a partir de estados patológicos, es necesario algún medio para su identificación. Por la importancia médica de las bacterias entéricas, se han estudiado una gran cantidad de aislados que han caracterizado y definido una gran cantidad de géneros distintos (Brock, 1993).

1.3.1 Género *Escherichia*

Los microorganismos del género *Escherichia* son habitantes casi universales de las vías intestinales de los humanos y los animales de sangre caliente, *Escherichia* también tiene un papel nutricional en las vías intestinales sintetizando vitaminas en especial, vitamina K.

El género de *Escherichia* generalmente son fimbriados, muchas de las cepas son capsuladas y la mayoría son móviles por flagelos peritricos. Forman colonias circulares, convexas y lisas con bordes definidos, las que crecen en gelatina nutritiva, son opacas o parcialmente translúcidas, lisas y de consistencia homogénea. Estas bacterias crecen abundantemente en los medios nutritivos ordinarios, el crecimiento se produce a una temperatura que oscila entre 10 y 46 ° C siendo el nivel óptimo de 37 ° C (Freeman, 1989).

Suelen emplearse como indicadores de contaminación fecal en los suministros de agua, es responsable tanto de infecciones oportunistas como de infecciones en las que actúa como patógeno principal y en general eso sucede cuando la resistencia del huésped es baja, puede también ser la causa de las infecciones de las vías urinarias infecciones sépticas a veces como meningitis y diarrea, en personas mayores o cuya resistencia esta disminuida por tratamiento quirúrgico o por exposición a radiación ionizante (Freeman, 1989; Brock, 1993).

La enteritis por *Escherichia coli* es una inflamación del intestino delgado producida por esta bacteria, cuyos síntomas son el resultado de toxinas e invasión bacteriana a los intestinos. El período de incubación es de 24 a 72 horas. En los adultos, la infección usualmente no es severa, pero en los niños y bebés, generalmente se requiere hospitalización y en algunos casos es mortal (Jawetz *et al.*, 1987).

Ciertos tipos de infección por *E. coli* (generalmente causados por la bacteria *Escherichiacoli* 0157:H7) se asocian con el síndrome hemolítico urémico, una enfermedad aguda que se caracteriza por la destrucción de los glóbulos rojos sanguíneos, una drástica reducción de las plaquetas y una súbita insuficiencia renal aguda.

La infección en vías urinarias en mujeres jóvenes, los síntomas y signos consisten en micción fuerte, disuria y hematuria (Unm, 2000).

1.3.2 Género *Shigella*

Shigella es comúnmente patógena para el hombre, su hábitat natural está limitado a las vías intestinales del hombre y otros mamíferos en los cuales produce una grave gastroenteritis llamada disentería bacilar. *Shigella* es el prototipo de los gérmenes invasores, es mas frecuente en niños de uno a cinco años de edad. Se transmite en los alimentos y a través del agua y es capaz de invadir las células del epitelio intestinal (Jawetz *et al.*, 1987).

Todas las especies del género *Shigella* son bastoncillos gramnegativos delgados, son inmóviles, no fermentan lactosa, son anaerobios facultativos, pero crecen mejor en medio aerobio crecen en medios como Mc Conkey, agar eosina-azul de metileno (EMB) y en agar Hektoen (HE), donde las colonias son transparentes, convexas circulares con bordes nítidos alcanzan un diámetro de cerca de 2 mm en 24 hrs. Todas las *shigellas* fermentan glucosa, con excepción de *Shigella sonnei*, no fermentan la lactosa, forman ácido a partir de los carbohidratos, pero rara vez producen gas (Jawetz *et al.*, 1987).

Las infecciones por *Shigella* se limitan casi siempre al tubo gastrointestinal; el proceso patológico esencial consiste en invasión al epitelio mucoso; la formación de microabscesos en la pared del intestino grueso y el íleon terminal produce necrosis de la mucosa, ulceración superficial de la misma hemorragia y formación de una pseudomembrana en la zona ulcerada. Todas las *shigellas* liberan un lipopolisacárido tóxico, esta endotoxina contribuye probablemente a la irritación de la pared intestinal (Jawetz *et al.*, 1987).

El espectro de la enfermedad clínica causada por *Shigella* varía de infección asintomática a disentería grave o manifestaciones tóxicas. En la shigellosis los pacientes presentan diarrea, con fiebre baja, el vómito es infrecuente. La forma disenteriforme incluye una fase inicial de diarrea líquida, fiebre elevada y malestar general, la cual es seguida en las siguientes 24 h por tenesmo, dolor abdominal y evacuaciones mucosanguinolientas, en infecciones graves, el paciente desarrolla cianosis, hipotermia y colapso circulatorio (Mandell, 1991).

La gastroenteritis por *shigella* es una infección aguda del revestimiento del intestino delgado causada por 1 de 4 cepas de la bacteria *Shigella*. Los brotes de la enfermedad han sido asociados con medidas sanitarias deficientes, suministros de agua inadecuados, alimentos contaminados, dedos, excremento e infestación por moscas (Jawetz *et al.*, 1987).

Los síntomas neurológicos pueden desarrollarse en los niños y no son comunes en los adultos. Hasta en el 40% de los niños con enteritis por *Shigella* severa se pueden presentar convulsiones (convulsiones febriles), dolor de cabeza, letargo, confusión y rigidez en el cuello semejante a la meningitis (Umm, 2000).

1.3.3 Género *Salmonella*

Salmonella suele ser patógena para los humanos y los animales de sangre caliente. En los humanos, se adquieren por vía bucal. Se transmiten desde los animales y los productos de éstos hacia el hombre, en el cual producen enfermedades como enteritis y la fiebre tifoidea (Jawetz *et al.*, 1987)

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos Gram-negativos no esporulados de 1 a 3 µm de largo por 0.6 µm de ancho, la longitud de las diversas especies varía, en su mayoría presenta movilidad por flagelos peritricos. Las colonias son circulares de 2 a 3 mm de diámetro con borde ligeramente ondulado, convexo aplanadas, de color gris blanquecino, brillo poco transparente, de pared rígida y delgada, son aerobias y anaerobias facultativas su temperatura más favorable de crecimiento es de 37 ° C y se les puede matar a 55 ° C (Pantoja, 2000). Estos microorganismos crecen con facilidad en medios sencillos, pero casi nunca fermentan la lactosa o la sacarosa, forman ácido y a veces gas a partir de glucosa y manosa, suelen producir H₂S. Sobreviven a la congelación en el agua durante periodos prolongados, son resistentes a ciertos productos químicos que inhiben a otras bacterias intestinales (Jawetz *et al.*, 1987). La infección por este género causa gastroenteritis aguda, fiebre entérica, septicemia, infección localizada e infección asintomática. La gastroenteritis aguda es generalmente secundaria a la ingestión de alimentos contaminados y es autolimitada, se caracteriza por náusea, fiebre, vómito, diarrea, dolor abdominal y malestar general. Las heces son escasas o parecidas al síndrome disentérico con moco pus y sangre. En infecciones graves, el paciente desarrolla cianosis, hipotermia y colapso circulatorio (Mandell, 1991).

La enterocolitis por *Salmonella* es una infección en el revestimiento del intestino delgado causado por la bacteria *Salmonella*. puede fluctuar entre una enfermedad diarreica leve a una severa. La infección se adquiere por la ingestión de alimentos o agua contaminados. El período de incubación de esta infección es de 8 a 48 horas después de la exposición y el trastorno agudo dura entre 1 y 2 semanas. En algunos pacientes que han estado bajo tratamiento, la bacteria se alberga en la materia

fecal durante meses. Existe un estado de portador en quienes tienen la bacteria durante un año o más, luego de la infección inicial. Los factores de riesgo son: consumo de alimentos inadecuadamente almacenados o preparados (especialmente mala cocción de pavo, pollo y huevos), poseer mascotas como iguanas, tortugas, lagartos y culebras (reptiles portadores de *Salmonella*) (Umm, 2000).

En la fiebre tifoidea las salmonellas ingeridas llegan al intestino delgado, desde el cual entran en los vasos linfáticos y a continuación en la sangre. Se transportan en ella hasta muchos órganos. Los microorganismos se multiplican en el tejido linfático intestinal y se excretan por el excremento. Después de un periodo de incubación de 10 a 14 días sobreviene fiebre, malestar general, cefalalgia, estreñimiento, bradicardia y mialgias. La fiebre se incrementa hasta alcanzar un punto muy elevado y aumentan de tamaño el bazo e hígado, el tratamiento con cloranfenicol o ampicilina ha reducido la mortalidad a menos de 1%, las cepas ocasionales resistentes a otros fármacos han reaccionado a la combinación de trimetoprima y sulfametoxazol (Jawetz *et al.*, 1987).

1.4 Género *Vibrio*

El grupo *Vibrio* está colocado junto a las bacterias entéricas debido a que contiene bacilos rectos que se parecen a las bacterias intestinales Gram-negativas (Brock, 1993). Los vibriones se encuentran distribuidos con amplitud en los ambientes marinos, son causa importante de enteritis. *Vibrio cholerae* produce una enterotoxina que produce cólera, padecimiento caracterizado por diarrea acuosa profusa que puede producir con rapidez deshidratación y muerte (Jawetz *et al.*, 1987).

Las bacterias del género *Vibrio*, son bacilos curvos o rectos, poseen un flagelo polar, no forman esporas, una diferencia clave entre el grupo *Vibrio* y las bacterias entéricas es que los miembros del primero son oxidasa positivos y los miembros del segundo son oxidasa negativos, produce colonias convexas, lisas y redondas que son opacas y granuladas bajo luz transmitidas, crecen a un PH muy elevado de 8.5 a 9.5 y los destruye la acidez rápidamente, crecen en condiciones aerobias y anaerobias,

en una cantidad de medios simples y a un intervalo amplio de temperatura, desde 18 a 37 ° C. Causan diarrea acuosa abundante y deshidratación (Barcenás, 2001; Jawetz *et al.*, 1987).

Vibrio cholerae es un microorganismo acuático que produce el cólera. El organismo se transmite casi en exclusiva por medio del agua. Los síntomas del cólera son la diarrea y la pérdida de líquidos y sales minerales en las heces. El cuadro inducido por este microorganismo se caracteriza por un inicio de evacuaciones abundantes y líquidas, sin dolor abdominal, sed intensa, calambres musculares, y en ocasiones fallo circulatorio. A las 24 h el paciente se deshidrata y puede evolucionar a un estado de shock y muerte si no hay reposición adecuada de líquidos y electrolitos. Las heces generalmente son claras, sin olor, con moco y semejan agua de arroz (Freeman, 1989).

Los microorganismos de cólera no llegan a la sangre, sino que quedan localizados en el tubo intestinal. En el mismo se multiplican, invaden el epitelio superficial y liberan toxina del cólera y quizá mucinasas y endotoxina. La toxina del cólera se absorbe sobre los ganglios de las células epiteliales y estimula la hipersecreción de agua y cloruro en todas partes del intestino delgado, a la vez que inhibe la absorción de sodio. Como resultado hay fuga de líquido y electrolitos con diarrea. Las tetraciclinas administradas por vía bucal tienden a reducir las evacuaciones (Jawetz *et al.*, 1987).

1.5 Algunos fármacos utilizados para el tratamiento de las diarreas infecciosas

Para el tratamiento de las diarreas infecciosas provocadas por bacterias se han utilizado una gran variedad de fármacos que incluyen la ampicilina (1), la trimetoprima (2), la doxiciclina (3), el sulfametoxazol (4), la eritromicina (5) y el cloranfenicol (6), entre otros (Figura 1). Estos fármacos son útiles para controlar la infección, sin embargo el uso indiscriminado de algunos ha provocado la aparición de cepas resistentes, inducen efectos colaterales indeseables como alergias, aplaziás a médula ósea, trastornos gastrointestinales, fiebre, hepatotoxicidad, anemias entre otros (Aguilar,1998) (Figura 1).

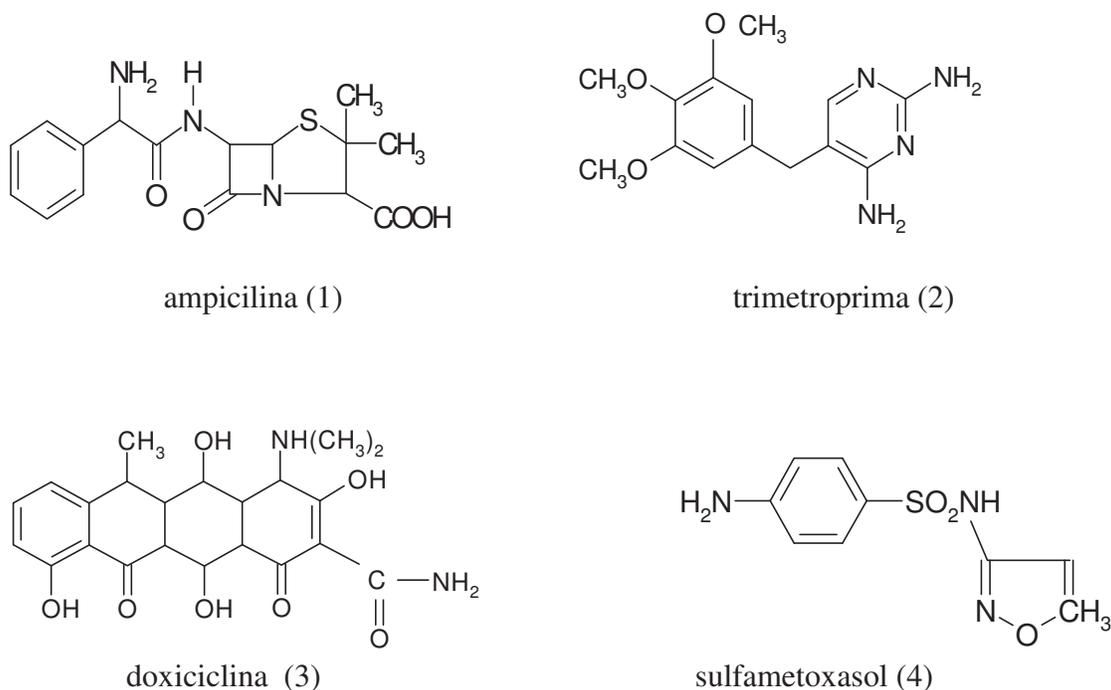


Figura 1. Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de diarreas infecciosas provocadas por bacterias Gram-negativas

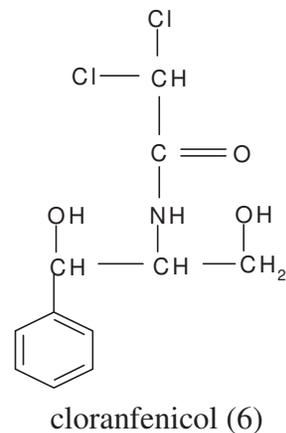
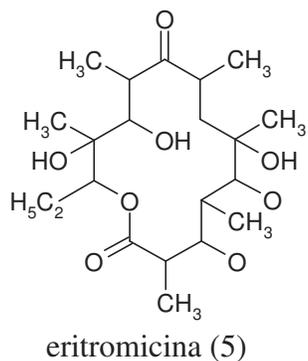


Figura 1. Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de diarreas infecciosas provocadas por bacterias Gram-negativas (continuación)

Los fármacos pueden lesionar de forma selectiva la membrana celular en algunas especies de bacterias; también pueden bloquear la síntesis de proteínas bacterianas. Algunos de los fármacos empleados interfieren con la síntesis de peptidoglicanos, el principal componente de la pared celular (Goodman *et al.*, 1995).

Muchos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de moléculas bacterianas intracelulares como el ADN, el ARN, los ribosomas o las proteínas. Las sulfonamidas son antibióticos sintéticos que interfieren la síntesis de proteínas. La síntesis de ácidos nucleicos puede ser detenida por los antibióticos que inhiben las enzimas que realizan el ensamblaje de los polímeros por ejemplo, la ADN polimerasa o ARN polimerasa. Las quinolonas son antibióticos que inhiben la síntesis de una enzima que realiza el proceso de enrollado y desenrollado de los cromosomas; este proceso es fundamental para la replicación y transcripción del ADN en ARN. Algunos fármacos antibacterianos actúan sobre el ARN mensajero, alterando su mensaje genético. Así, al realizarse el proceso de traducción del ARN defectuoso, las proteínas producidas no son funcionales. Las tetraciclinas compiten con alguno de los componentes del ARN impidiendo la

síntesis proteica; los aminoglucósidos producen una alteración del proceso de lectura del mensaje genético, produciéndose proteínas defectuosas; el cloranfenicol impide la unión de aminoácidos en la formación de las proteínas; la puromicina interrumpe la formación de la cadena proteica, liberándose una proteína incompleta (Goodman *et al.*, 1995).

Uno de los principales mecanismos de defensa es la inactivación del antibiótico. Éste es el mecanismo de defensa más frecuente frente a las penicilinas y el cloranfenicol. Otras formas de resistencia consisten en mutaciones que cambian la enzima bacteriana contra la que se dirige el antibiótico, de manera que éste no pueda ya inhibirla. Éste es el mecanismo más habitual frente a los compuestos que inhiben la síntesis de proteínas, como las tetraciclinas (Goodman *et al.*, 1995).

Todas las formas de resistencia se transmiten a través de los genes de la bacteria a su progenie. Además, los genes que producen resistencia también pueden transmitirse de unas bacterias a otras a través de plásmidos, que son fragmentos cromosómicos que contienen sólo una pequeña cantidad de genes (entre éstos, el gen de la resistencia). Así, algunas bacterias se unen a otras de la misma especie de forma transitoria, transmitiéndose los plásmidos. Si una bacteria recibe dos plásmidos portadores de genes de resistencia a diferentes antibióticos, estos genes se pueden unir en un único plásmido. La resistencia combinada puede así ser transmitida a una nueva bacteria, en la que puede unirse a otra forma de resistencia. Se generan así plásmidos que son portadores de resistencia a diferentes clases de antibióticos. Existen además plásmidos que pueden ser transmitidos entre especies diferentes de bacterias, permitiendo la transferencia de resistencias a múltiples antibióticos entre especies bacterianas muy dispares (Goodman *et al.*, 1995).

El espectro antibacteriano de trimetoprima es semejante al sulfametoaxol aunque es más potente, de 20 a 100 veces mayor, casi todos los microorganismos Gram-negativos son sensibles

a trimetoprima, pero puede surgir resistencia si se utiliza en forma independiente. La actividad antimicrobiana a trimetoprima es consecuencia de su acción en dos fases de la vía enzimática en la síntesis del ácido tetrahidrofólico, la trimetoprima evita la reducción del dihidrofolato en tetrahidrofolato. Trimetoprima es un bloqueador altamente selectivo de la dihidrofolato reductasa de microorganismos inferiores y se necesita 100 000 veces más fármaco para inhibir la reductasa humana (Goodman *et al.*, 1995).

Los microorganismos resistentes a trimetoprima puede ser por mutación. La resistencia por parte de bacterias Gram-negativas suele ser explicada por la presencia de un plasmido que codifica alteraciones en la dihidrofolato reductasa (Goodman *et al.*, 1995)

Trimetoprima se absorbe con mayor rapidez, en término de dos horas se alcanzan cifras máximas del fármaco en sangre en casi todos los enfermos. La vida media es de 11 y 10 hr. Se distribuye y concentra rápidamente en tejidos y en promedio el 40% queda ligado a proteínas plasmáticas. El fármaco penetra fácilmente en líquido cefalorraquídeo y también en bilis. Aproximadamente 60% de trimetoprima administrado se excreta en la orina en término de 24 h (Goodman *et al.*, 1995).

El cloranfenicol inhibe la síntesis proteínica en bacterias, penetra fácilmente a las bacterias por difusión facilitada. El cloranfenicol bloquea la síntesis proteica de mitocondrias en células de mamíferos. Más del 95% de las cepas de bacterias Gram-negativas es inhibida in vitro por 8.0 µg/ml o menos del cloranfenicol (Goodman *et al.*, 1995).

Las Enterobacteriaceae muestran sensibilidad variable al cloranfenicol, el 95% de las cepas de *E. coli* es bloqueado por 12.5 µg/ml del antibiótico, se ha observado que 84% de *Vibrio cholerae* es inhibido por 6.3 µg/ml al igual que 90% de *Shigella*. La resistencia de las bacterias Gram-negativas a este medicamento casi siempre se debe a un plásmido adquirido por conjugación y esto ocurre por la presencia de una acetiltransferasa específica que inactiva al antibiótico. La resistencia al cloranfenicol por lo común depende de la acetilación del fármaco, pero también se han descrito disminución de la permeabilidad de los microorganismos a él y la mutación a insensibilidad ribosómica (Goodman et al., 1995).

El cloranfenicol se distribuye en las lipasas pancreáticas en el duodeno efectúan la hidrólisis rápida y casi completa de la ligadura éster del palmitato de cloranfenicol. Este se absorbe en vías gastrointestinales y alcanza cifras máximas de 10 a 13 µg/ml en término de dos horas o tres horas de consumir una dosis de 1 g. El cloranfenicol se distribuye satisfactoriamente en líquidos corporales y con facilidad alcanza cifras terapéuticas en líquido cefalorraquídeo, en el cual sus valores son de 60%, aproximadamente de los correspondientes al plasma. Puede aparecer en bilis, es secretado en la leche materna y atraviesa fácilmente la barrera placentaria. La vía principal de eliminación del antibiótico es por metabolismo hepático hasta llegar a la forma de glucurónido inactivo, este último metabolito y también el propio cloranfenicol son excretados en la orina por excreción y filtración. En un lapso de 24 h, se eliminan también del 75 al 90% de una dosis oral y del 5 a 10% está en la forma biológicamente activa (Goodman et al., 1995).

En el caso del tratamiento de la disentería asociada a *Shigella*, a pesar de que la combinación trimetropima-sulfametoxazol o la ampicilina o el ácido nalidíxico son considerados como los antibióticos de primera elección, aunque la resistencia de *Shigella* a estos antibióticos es tan frecuente que los hace obsoletos. Este hecho plantea un verdadero problema médico pues los que sí pueden ser eficaces son muy caros y/o tienen el potencial de efectos indeseables importantes (Brock, 1993).

En la actualidad hay un gran interés por los agentes antimicrobianos derivados de plantas ya que el uso de técnicas microbianas modernas ha permitido demostrar que los extractos de plantas superiores de diversos géneros y familias poseen una actividad significativa en contra de algunas bacterias. Por lo que la medicina tradicional desempeña un papel muy importante como criterio para la selección de plantas como fuente de agentes antimicrobianos. Los metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas de origen vegetal aislados hasta la fecha incluyen; alcaloides, cumarinas, flavonoides, quinonas, saponinas y terpenos entre otros (Aguilar,1998).

2. GENERALIDADES DE *Hippocratea excelsa* HBK

El género de *Hippocratea* comprende 115 especies distribuidas en el Suroeste de los Estados Unidos, México y en la zona tropical de Suramérica. En México, el género de *Hippocratea* es particularmente abundante y se conocen doce especies de las cuales la más utilizada es *Hippocratea excelsa* (Trejo, 1998)

Tabla 1. Especies del género de *Hippocratea* que crecen en México

Nombre científico	Nombre común	Distribución
<i>Hippocratea excelsa</i> HBK	Cancerina, Matapiojo	Guerrero, Durango, Puebla Chiapas, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Edo. de México, Campeche, Quintana Roo, Centroamérica y D.F.
<i>H. utilis</i> Rose	Bejuco colorado	Sinaloa
<i>H. meizantha</i> Blake	-----	Veracruz, Morelos
<i>H. elliptica</i> HBK	-----	Guerrero
<i>H. rovirosaes</i> Standl	-----	Tabasco
<i>H. pauciflora</i> Rose	Matapiojo, hierba del piojo	Tamaulipas, Sinaloa
<i>H. acapulcensis</i> HBK	Bejuco del piojo, pepitas de piojo	Guerrero
<i>H. tabascensis</i> Lundell	Barajilla	Tabasco
<i>H. mexicana</i> Miers	Matapiojo	Guerrero, Mazatlán, Oaxaca
<i>H. seleariana</i> Loes	Matapiojo	Morelos
<i>H. chiapanensis</i> Standl	Matapiojo	Chiapas
<i>H. yucatanensis</i> Standl	Matapiojo	Yucatán

Hippocratea excelsa HBK es una planta perteneciente a la familia Hippocrateaceae, del género *Hippocratea*, de la especie *excelsa*, la cual es conocida popularmente con los nombres populares de “cancerina, matapiojos y bejuco del piojo” (Trejo, 1998).

La planta (Figura 2) es trepadora, leñosa, delgada de hasta 4 m de altura aunque a veces crece como arbusto, su tallo es de 10 cm de diámetro con ramas pecioladas y la

corteza es de color café rojizo. Sus hojas son oblongas elípticas a obovadas, miden de 6 a 12 cm y redondeadas en el ápice de color verde olivo, sus flores son sépalos verdes con pétalos verde amarillento, el fruto es una cápsula, los lóbulos del fruto es verde amarillento unidos hasta la mitad de su longitud, son elípticos capsulares de unos 6 cm, sus semillas son haladas. La época de floración es en primavera, en los meses de abril y mayo se encuentra a los ejemplares con numerosas inflorescencias y el suelo tapizado de pequeñas flores blancas y en los meses de septiembre y octubre algunos frutos. La forma de reproducción es sexual y vegetativa a través de rizomas (Goytia, 1992).

H. excelsa se localiza en los márgenes de los ríos o cañadas en selvas bajas caducifolias con climas cálidos subhúmedos (Goytia, 1992). Se reporta en los estados de Puebla, Chiapas, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Edo de México, Campeche, Quintana Roo y Centroamérica, principalmente en bosques tropicales caducifolios (Trejo, 1998).

En las prácticas médicas alternativas de México se usan las semillas y las hojas como insecticida para matar piojos o ectoparásitos como ácaros y gorgojos que destruyen las cosechas. La corteza se emplea para el tratamiento de las afecciones de la piel, las úlceras gástricas, para combatir el mal olor de pies y padecimientos renales, amenorrea e infecciones uterinas. La población al comprarla en el mercado la prepara con lo que tomen sus dedos la ponen a hervir en un litro de agua, al soltar su color se retira del fuego esperan a que enfríe y lo toman como agua de tiempo (Goytia, 1992). La decocción de la corteza de la raíz es utilizada para el tratamiento de la diarrea, la disentería y el cáncer. La corteza de la raíz es de color café rojizo o rosáceo con abundantes manchas grisáceas, no tiene olor, es de textura lisa, fibrosa y el sabor ligeramente astringente (Calzada *et al.*, 1991), (Figura 3).

Hippocratea excelsa es un recurso natural mexicano utilizado por las comunidades rurales, las propiedades medicinales que presenta la planta ha hecho de su demanda en el mercado nacional sea alta, trayendo como consecuencia que se encuentre en peligro de extinción debido a que la parte utilizada de la planta es la corteza de su raíz principalmente y que para ser llevada al mercado la gente la extrae completa (Goytia, 1992)

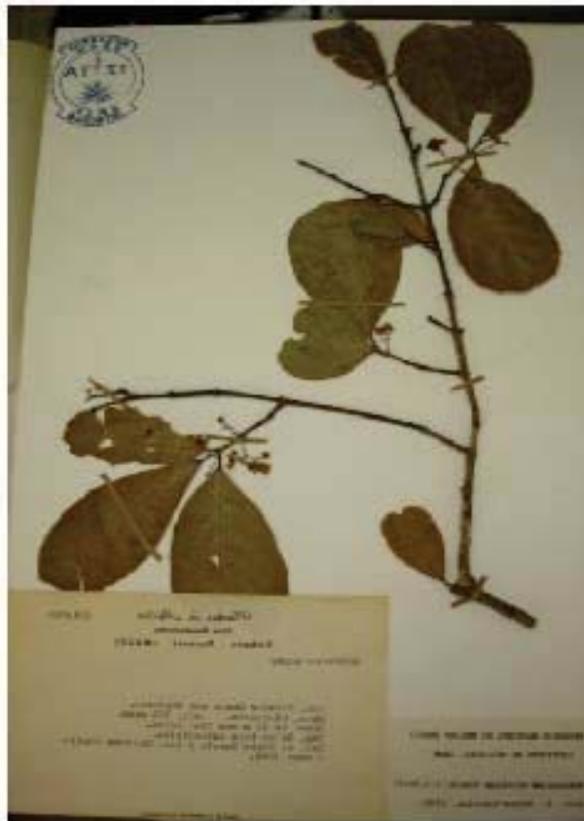


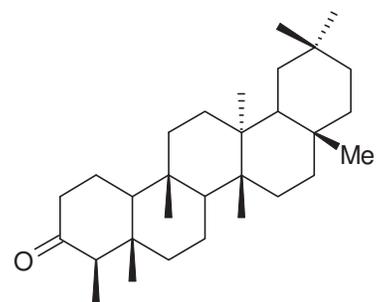
Figura 2. *Hippocratea excelsa* HBK

2.1. Fitoquímica y farmacología

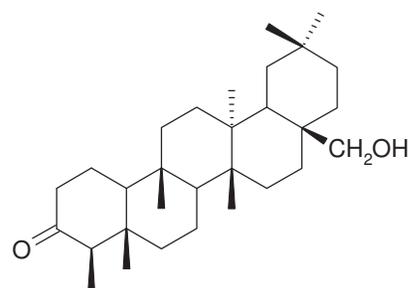
Desde el punto de vista fitoquímico, la especie *H. excelsa* ha sido objeto de cuatro estudios químicos, los tres últimos realizados de forma biodirigida: El primer estudio condujo al aislamiento e identificación de cuatro friedelan-3-onas [friedelina (7), canofilol (8) y ácido canofílico (9)], el transpoliisopreno y el β -sistosterol (10) (Calzada *et al.*, 1991). La segunda y la tercera investigaciones fueron conducidas de manera biodirigida en el primer caso permitió el aislamiento de tres metilenquinonas triterpénicas [tingenona (11), pristemerina (12) y excelsina (13)] y cuatro alcaloides sesquiterpénicos [emarginantina (14) y las hipocrateínas I-III (15-17)] (Calzada, et al., 1989).

El bioensayo empleado fue el de la letalidad a la artemia salina, encontrándose que la tingenona ($DL_{50}=235\text{ppm}$) y la hipocrateína I ($DL_{50}=212\text{ppm}$) eran los activos en este estudio también se demostraron las propiedades citotóxicas de los compuestos tingenona, celastrol, pristemerina y excelsina. (Calzada,et al., 1989; Calzada *et al.*, 1991).

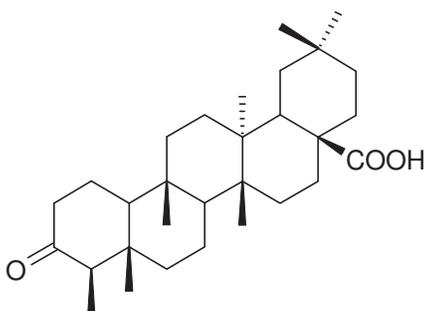
En el segundo caso condujo a la obtención de los terpenoides (7), (8), (9) y el flavan-3ol, (-) –epicatequina (18), los tres últimos (8, 9 y 18) compuestos mostraron efecto gastroprotector (Trejo, 1998). En la cuarta y última investigación se encontró que la metilenquinona, pristimerina fue la responsable de la actividad antialimentaria atribuida a la especie (Cristóbal, 1998).



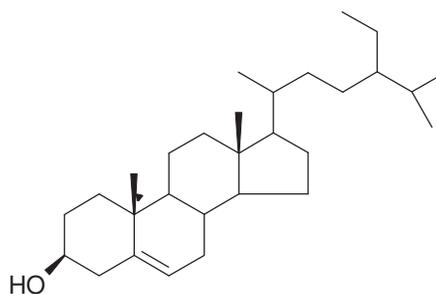
friedelina (7)



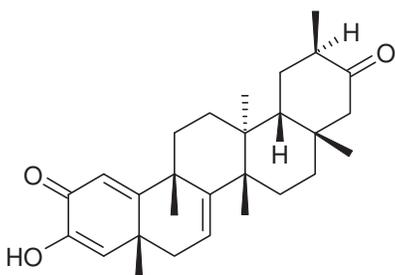
canofilol (8)



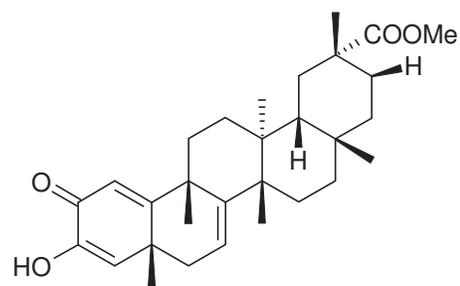
ácido canofilico(9)



β-sitosterol (10)

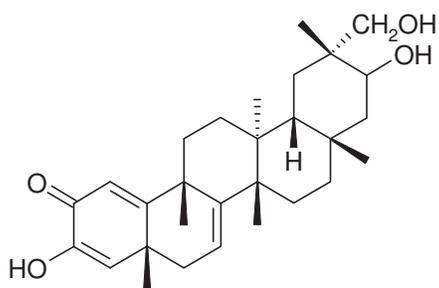


tingenona (11)

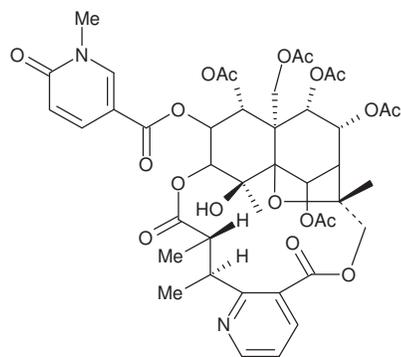


pristemerina (12)

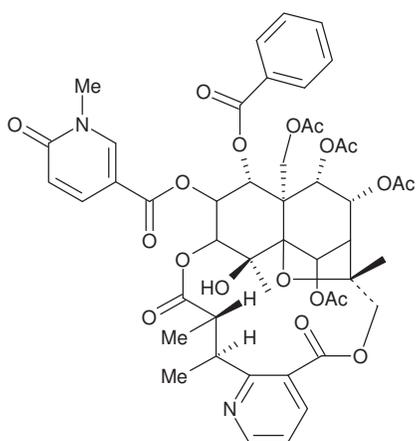
Figura 4. Compuestos aislados de la corteza de la raíz de *Hippocratea excelsa*



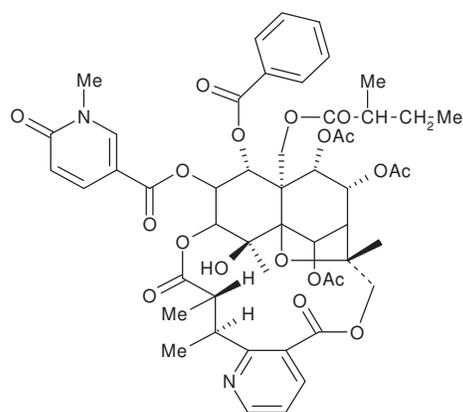
excelsina (13)



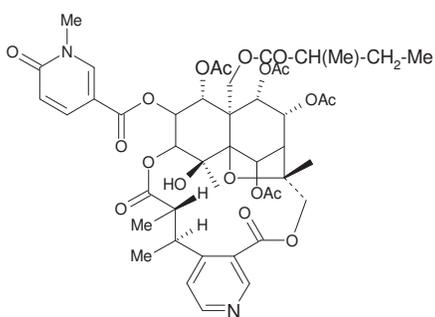
emarginantina (14)



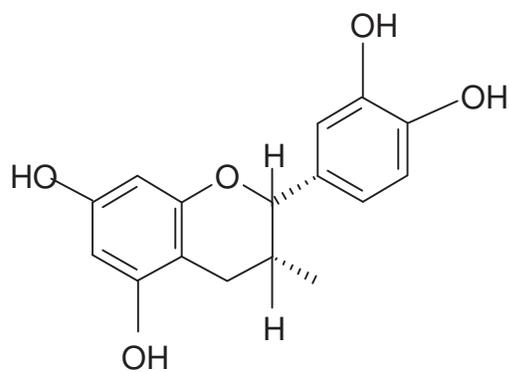
hipocrateína I (15)



hipocrateína II (16)



hipocrateína III (17)



epicatequina (18)

Figura 4. Compuestos aislados de la corteza de la raíz de *Hippocratea excelsa* (continuación)

3. JUSTIFICACIÓN

En México las plantas medicinales son usadas frecuentemente en las prácticas médicas populares como una alternativa para el tratamiento de la diarrea y la disentería. Sin embargo son escasos los estudios químicos y farmacológicos que avalen sus propiedades. En este sentido y con el propósito de aportar información en cuanto a la química y farmacología de la flora medicinal mexicana la presente tesis describe la investigación de la actividad antibacteriana del extracto hexánico y productos derivados de *Hippocratea excelsa* HBK.

4. HIPÓTESIS.

Si en la medicina tradicional se ha utilizado con éxito la corteza de la raíz de *Hippocratea excelsa* para el tratamiento de la diarrea y la disentería, entonces contiene compuestos con propiedades antibacterianas contra agentes etiológicos (*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio*) causantes de estos síntomas.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las propiedades antibacterianas del extracto hexánico y los productos derivados de la corteza de la raíz de *Hippocratea excelsa* HBK.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- ♠ Obtener el extracto hexánico de la corteza de la raíz de *Hippocratea excelsa*.
- ♠ Fraccionar y separar el extracto hexánico de la raíz de *H. excelsa*.
- ♠ Determinar la actividad antibacteriana del extracto y algunos productos obtenidos de la raíz de *H. excelsa*.

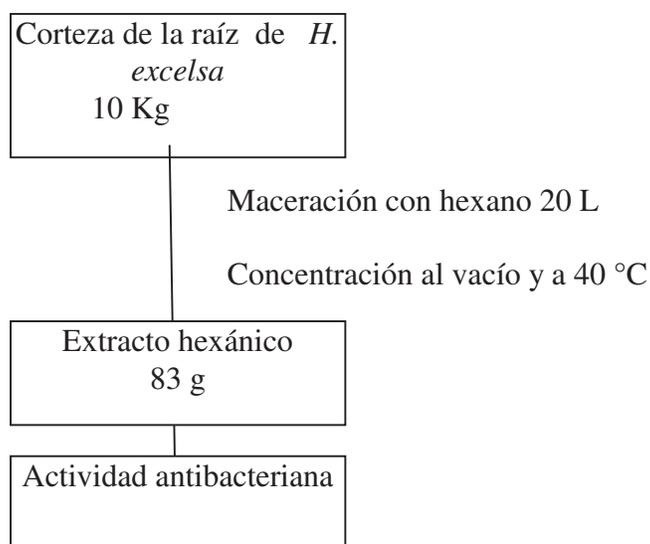
6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material Vegetal

El material vegetal (10 Kg de la corteza de la raíz) se compró en el “Mercado Sonora”, ubicado en el centro de la ciudad de México. Este material fue secado en condiciones ambientales de luz y temperatura. La identificación botánica fue realizada por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras, un ejemplar de referencia (Colección Calzada, Referencia: 14392) se depositó en el Herbario IMSSM del Instituto Mexicano del Seguro Social.

6.2 Preparación del extracto hexánico de la raíz de *Hippocratea excelsa* HBK

El material vegetal (10 Kg de la corteza de la raíz) se molió en un molino Tor-Rey y fue extraído vía maceración utilizando hexano (20 L) como disolvente durante 7 días por dos ocasiones. El extracto obtenido se concentró al vacío a una temperatura de 40° C. Obteniéndose 83 g de un residuo de color naranja al cual se le determinó sus propiedades antibacterianas (Esquema 1).



Esquema 1. Obtención del extracto hexánico de *Hippocratea excelsa* HBK

6.3 Ensayo biológico

El ensayo biológico utilizado para la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto, fracciones y compuestos puros se realizó siguiendo el bioensayo descrito por Gavan y Barry (Alanís *et al.*, 2005).

Para la prueba se emplearon las bacterias: *Escherichia coli* (2 especies), *Shigella flexneri* (2 especies), *Shigella sonnei* (2 especies), *Salmonella sp* (2 especies) y *Vibrio cholerae* (1 especie), las bacterias fueron proporcionadas por la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, CMN SXXI, IMSS.

Para la prueba un inóculo de cada una de las cepas se sembró en tubos de vidrio con agitación constante que contenían 10 ml de medio líquido de caldo Muller-Hinton (MH, Sigma) por 4 h a 37° C, una vez transcurrido el tiempo las suspensiones se ajustaron con MH a una densidad de 0.5 Mc Farland (10^8 UFC/ml); 500 µl de cada uno de los inóculos se colocaron en el replicador de Steer's calibrado para sembrar 10^4 UFC.

El extracto, las fracciones y compuestos puros fueron disueltos con dimetilsulfóxido y ajustados con agar MH a concentraciones de 8, 4, 2 y 1 mg/ml, y posteriormente colocadas en cajas petri. Las cajas conteniendo las muestras se sembraron con el replicador de Steer's y se incubaron durante 24 h a 37 °C, posteriormente se midieron los halos de crecimiento para determinar el porcentaje de inhibición comparando con el control. En caso de ser necesario se realizaron las diluciones pertinentes para obtener concentraciones de 400 µg/ml, 300 µg/ml, 200 µg/ml y 100 µg/ml. La prueba se realizó por duplicado y un mínimo de tres veces. Cada prueba incluyó cloranfenicol (Sigma) y trimetroprima (Sigma) como controles positivos, un control (medio agar MH, DMSO y enterobacterias) y un blanco (medio agar MH y enterobacterias).

6.4 Métodos cromatográficos

La cromatografía en columna abierta (CCA) se realizó sobre gel de sílice (Kieselgel 60 Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (cromatofolios Merck, Al TLC 20 x 20 60F₂₅₄). Se utilizaron varios eluyentes.

Todas las fracciones obtenidas fueron analizadas mediante CCF, con ayuda de una lámpara de luz UV gL-58 a longitudes de onda de 254 y 365 nm y posteriormente revelados con una solución de sulfato cérico amoniacal

6.5 Fraccionamiento del extracto hexánico de *Hippocratea excelsa* HBK

Una parte (80 g) del extracto hexánico se fraccionó mediante CCA empleando gel de sílice (160g) como fase estacionaria. Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de hexano, CHCl₃ y AcOEt en diferentes proporciones. Como resultado de este proceso se obtuvieron 309 fracciones de 200 ml c/u, reuniéndose aquellas que mostraran similitud cromatográfica y así obtener 14 fracciones primarias: F1E (0.33 g), F2E (4.17 g), F3E (7.40 g), F4E (3.39 g), F5E (5.27 g), F6E (1.22 g), F7E (0.20 g), F8E (0.81 g), F9E (1.60 g), F10E (2.31 g), F11E (5.11 g), F12E (4.70 g), F13E (12.03 g), F14E (9.25 g) (Cuadro 1) a las cuales se determinó su actividad antibacteriana.

Cuadro 1. Resumen del fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto hexánico de *Hippocratea excelsa* HBK

Sistema	Proporción %	Fracciones	Clave
Hexano/CHCl ₃	80:20	1-76	F1E, F2E, F3E, F4E
Hexano/CHCl ₃	70:30	77-191	F5E, F6E, F7E, F8E
Hexano/ CHCl ₃	60:40	192-236	F9E, F10E
Hexano/ CHCl ₃	50:50	237-241	F11E, F12E
CHCl ₃ /AcOEt	70:30	242-309	F13E, F14E

6.6 Separación y purificación de la fracción F12E

La separación de la fracción primaria F12E (25 g) se realizó por CCA, empleando como fase estacionaria gel de sílice (162 g). Los eluyentes empleados consistieron en mezclas de CHCl₃, AcOEt y MeOH en diferentes proporciones. Se obtuvieron un total de 172 fracciones de 25 ml c/u, reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica y así obtener ocho fracciones secundarias: FS1E (0.52 g), FS2E (0.70 g), FS3E (1.98 g), FS4E (1.83 g), FS5E (0.60 g), FS6E (17.20 g), FS7E (1.30 g), FS8E (0.32 g) (Cuadro 2) a las cuales se determino su actividad antibacteriana.

Cuadro 2. Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción primaria F12E

Sistema	Proporción %	Fracciones	Clave
CHCl ₃	100	1-20	FS1E, FS2E, FS3E
CHCl ₃ / AcOEt	90:10	21-133	FS4E, FS5E
AcOEt/ MeOH	50:50	134-172	FS6E, FS7E, FS8E

7. RESULTADOS

Los resultados de la actividad antibacteriana del extracto hexánico y fracciones primarias F1E/F14E derivadas del fraccionamiento vía cromatografía en columna se muestra en la tabla 2. El extracto se evaluó a una concentración de 8 mg/ml y las fracciones a 400 µg/ml. Las cepas de bacterias empleadas fueron: *Escherichia coli* -1, *E. coli* ATCC 25922, *Shigella sonnei* -1, *S. sonnei* -2, *Shigella flexneri* -1, *S. flexneri* -2, *Salmonella sp* -1, *S. sp* -2 y *Vibrio cholerae*. Los resultados se expresan como porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano. Cloranfenicol y trímetroprima se usaron como fármacos antibacterianos.

Tabla 2. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto hexánico y fracciones primarias F1E/F14E derivadas de la raíz de *Hippocratea. Excelsa* HBK

Muestra (µg/ml)	% de inhibición de crecimiento bacteriano								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Extracto hexánico (8mg/ml)	74	76	74	74	0	0	63	69	59
F1E (400 µg/ml)	38	33	49	52	50	0	36	17	23
F2E (400 µg/ml)	37	37	33	30	17	26	20	14	23
F3E (400 µg/ml)	11	0	24	18	0	-	25	17	33
F4E (400 µg/ml)	26	26	33	35	17	19	20	14	16
F5E (400 µg/ml)	32	38	20	31	25	4	25	20	9
F6E (400 µg/ml)	28	54	30	0	25	14	35	28	25
F7E (400 µg/ml)	25	17	18	31	33	-	33	33	39
F8E (400 µg/ml)	20	38	20	0	25	4	8	33	9
F9E (400 µg/ml)	28	38	16	0	25	25	25	14	20
F10E (400 µg/ml)	3	38	0	3	0	4	16	14	14
F11E (400 µg/ml)	19	30	13	7	3	0	21	2	3
F12E (400 µg/ml)	32	17	24	38	17	0	17	17	23
F13E (400 µg/ml)	28	50	37	31	18	18	25	8	14
F14E (400 µg/ml)	15	35	16	71	3	0	16	20	14
Cloranfenicol (8mg/ml)	10	15	12	25	13	9	5	0	28
Trimetroprima (8mg/ml)	100	100	51	29	100	100	100	100	100

A= *Escherichia coli* -1 B= *Escherichia coli* ATCC 25922 C= *Shigella sonnei* -1
D= *Shigella sonnei* -2, E= *Shigella flexneri* -1 F= *Shigella flexneri* -2 G= *Salmonella* -1
H= *salmonella* -2 I= *Vibrio cholerae*. -= No se determinó.

Los resultados de la actividad antibacteriana de la fracción primaria F12E y fracciones secundarias FS1E a FS8E derivadas de la separación vía cromatografía en columna abierta, de la fracción F12E se resumen en la tabla 3. Tanto la fracción primaria como las secundarias se evaluaron a una concentración de 400 µg/ml empleando las cepas de bacterias: *Escherichia coli* -1, *E. coli* ATCC 25922, *Shigella sonnei* -1, *S. sonnei* -2, *Shigella flexneri* -1, *S. flexneri* -2, *Salmonella sp* -1, *S. sp* -2 y *Vibrio cholerae*. Los resultados se expresan como % de inhibición de crecimiento bacteriano. El cloranfenicol y la trimetroprima se usaron como, fármacos estándar antibacterianos.

Tabla 3. Resultados de la actividad antibacteriana de la fracción primaria F12E y fracciones secundarias FS1E/FS8E derivados de la raíz de *Hippocratea excelsa* HBK

% de inhibición de crecimiento bacteriano									
Muestra (µg/ml)	A	B	C	D	E	F	G	H	I
F12E (400 µg/ml)	32	17	24	38	17	0	17	17	23
FS1E (400 µg/ml)	58	49	57	47	60	39	54	46	34
FS2E (400 µg/ml)	55	49	57	43	52	34	54	41	29
FS3E (400 µg/ml)	34	45	23	23	52	29	47	30	29
FS4E (400 µg/ml)	24	30	18	12	36	9	24	14	12
FS5E (400 µg/ml)	24	30	18	12	36	9	24	14	12
FS6E (400 µg/ml)	0	19	9	17	3	-	16	2	3
FS7E (400 µg/ml)	6	19	0	2	35	-	24	1	0
FS8E (400 µg/ml)	51	49	60	51	60	50	58	46	95
Cloranfenicol (8mg/ml)	10	15	12	25	13	9	5	0	28
Trimetroprima (8mg/ml)	100	100	51	29	100	100	100	100	100

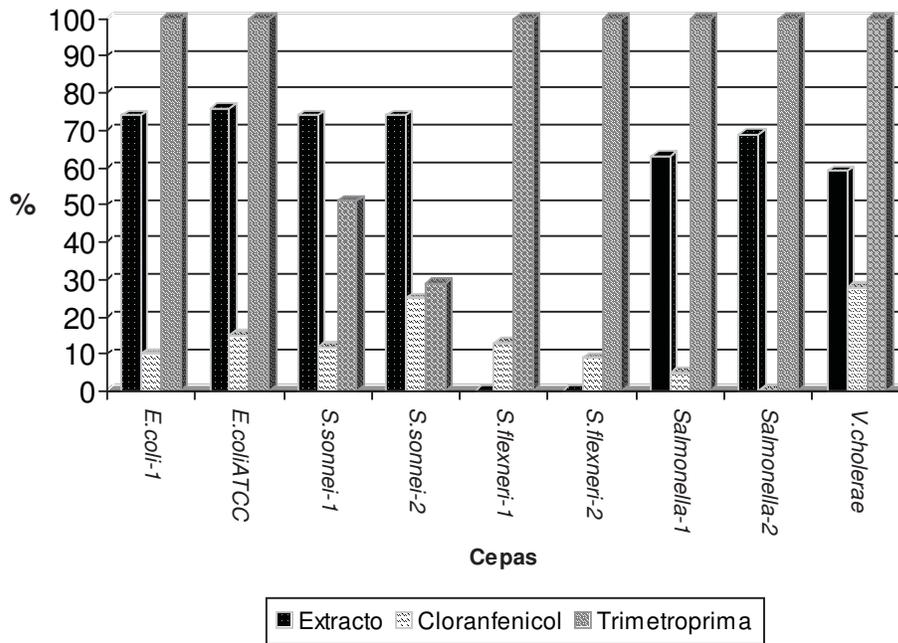
A= *Escherichia coli* -1 B= *Escherichia coli* ATCC 25922, C= *Shigella sonnei* -1 D= *Shigella sonnei* -2 E= *Shigella flexneri* -1 F= *Shigella flexneri* -2, G= *Salmonella* -1 H= *Salmonella* -2 I= *Vibrio cholerae* -= No se determinó.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

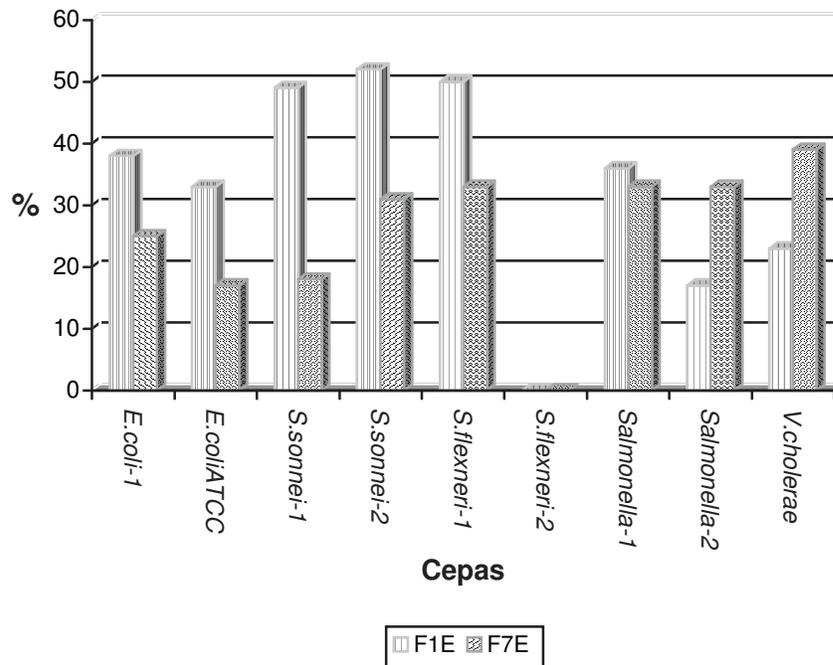
La selección de *H. excelsa* como una fuente de productos antibacterianos, deriva de los resultados obtenidos de la línea de investigación permanente que se lleva en la Unidad de Investigación Médica de Farmacología de Productos Naturales del IMSS, que tiene el propósito de sustentar algunas de las propiedades medicinales que se le atribuye a nuestra flora medicinal mexicana (Alanís *et al.*, 2002; 2005).

A partir de la corteza de la raíz de *H. excelsa*, se preparó el extracto orgánico empleado como disolvente de extracción hexano. El extracto resultante se sometió a ensayo de actividad antibacteriana a concentración de 8 mg/ml, contra las cepas antes mencionadas encontrándose porcentajes de inhibición superiores al 59 % contra las cepas de *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Salmonella sp* y *V. cholerae* (Tabla 2). Comparando la actividad antibacteriana del extracto contra la de los fármacos cloranfenicol y trimetoprima usadas como controles. El extracto a la misma concentración fue superior en actividad que el cloranfenicol, en el caso de la trimetoprima fue mejor contra ambas cepas de *S. flexneri* (Gráfica 1).

El fraccionamiento del extracto hexánico mediante CCA permitió obtener, 14 fracciones primarias (F1E a F14E) de estas, dos fracciones (F1E y F7E) mostraron la mayor actividad antibacteriana. En el caso de la fracción F1E, obtuvo el primer lugar de inhibición contra cuatro de las cepas usadas: *E. coli* -1, *S. sonnei* -1, *S. flexneri* -1 y *Salmonella* -1 con porcentajes de inhibición dentro del rango de 36 al 50 %. En el caso de la fracción F7E mostró el primer lugar para dos de las cepas usadas: *Salmonella* -2 y *Vibrio cholerae* con inhibiciones de crecimiento bacteriano del 33 y 39 %, respectivamente (Gráfica 2).



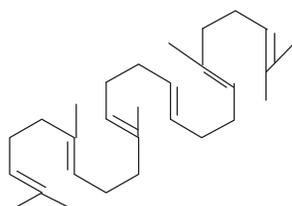
Gráfica 1. Resultados de los porcentajes de inhibición del extracto hexánico y fármacos controles



Gráfica 2. Resultados de los porcentajes de inhibición del extracto y fracciones activas F1E y F7E

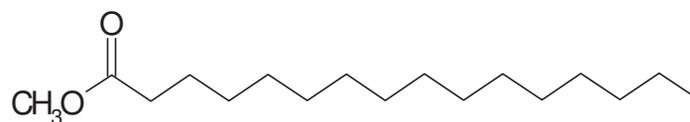
En los casos de la fracciones F2E, F6E, F8E y F14E mostraron la mayor actividad contra una sola bacteria: *S. flexneri* -2 (26 %), *E. coli* ATCC 25922 (54 %), *Salmonella* -2 (33 %) y *S. sonnei* -2 (71 %), respectivamente. Las fracciones restantes mostraron efectos de inhibición del 3 al 33 % contra las cepas evaluadas.

En el caso de la fracción F2E fue posible establecer mediante el análisis de espectros de IR, RMN-¹H, RMN-³C y EM (Espectro A-1, A-2 y A-3) que era exclusivamente escualeno (19; Apéndice). El porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano del escualeno contra las cepas usadas fue del 14 al 37%, cabe mencionar que este efecto es superior al extracto original si se considera que el escualeno fue evaluado a una concentración veinte veces menor (0.4 mg/ml).

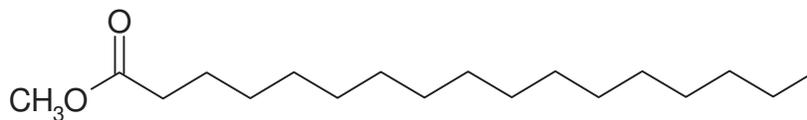


escualeno (19)

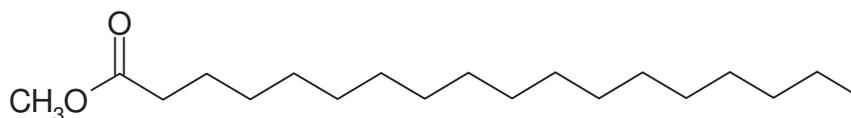
En el caso de la fracción F4E fue posible establecer mediante el análisis de los espectros de IR, RMN-¹H, RMN-³C, (Espectro A-4 al espectro A-10) y un experimento de cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM) que se trataba de una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos: hexadecanoato de metilo (20), heptadecanoato de metilo (21), octadecanoato de metilo (22), pentaicosanoato de metilo (23), y hexaeicosanoato de metilo (24, Apéndice) los porcentos de inhibición de la mezcla de ésteres metílicos contra las cepas usadas fue del 14 al 35 %.



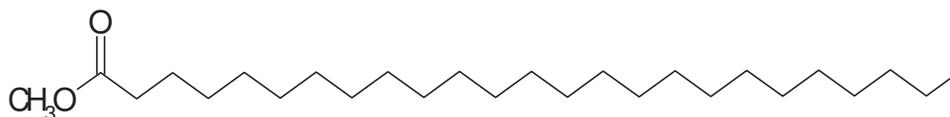
hexadecanoato de metilo (20)



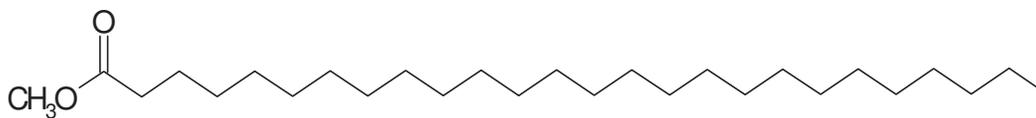
heptadecanoato de metilo (21)



octadecanoato de metilo (22)



pentaicosanoato de metilo (23)

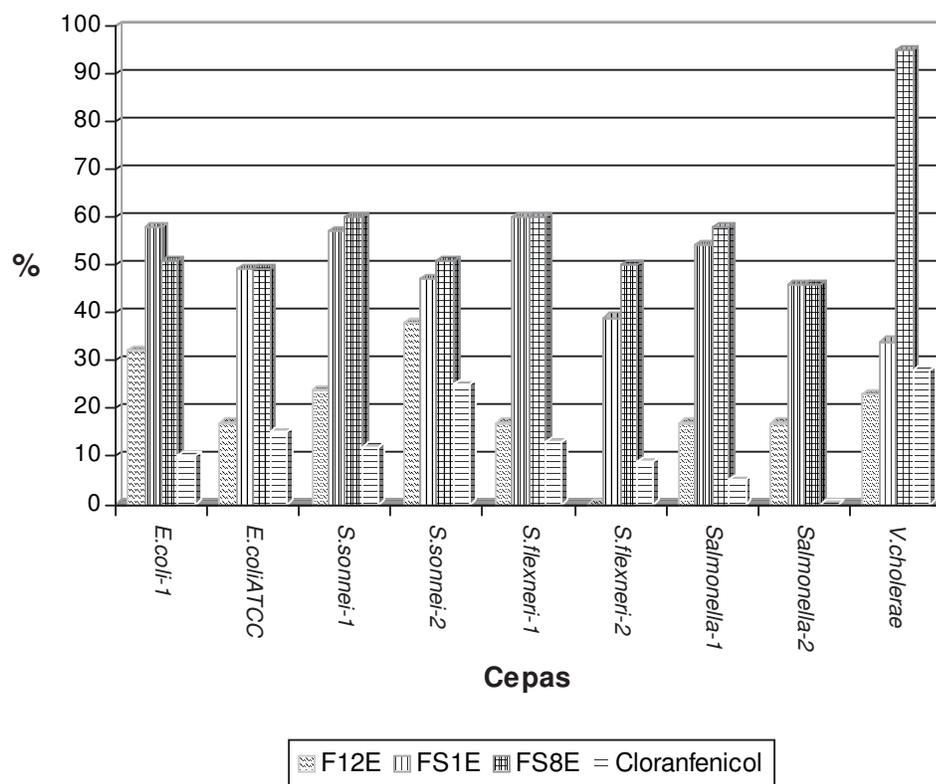


hexaeicosanoato de metilo (24)

La separación de la fracción F12E se hizo mediante CCA obteniéndose un total de ocho fracciones secundarias (FS1E a FS8E), de estas dos las más activas fueron FS1E y FS8E. La fracción FS8E obtuvo el primer lugar de inhibición contra ocho de las cepas usadas, con inhibiciones de crecimiento del 46 al 95 % a una concentración de 400µg/ml.

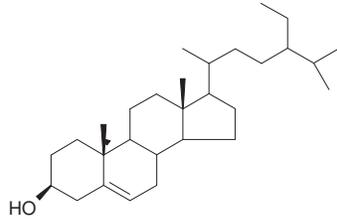
La fracción FS1E mostró el mismo porcentaje de inhibición que la fracción FS8E para las cepas de *E coli* ATCC 25922 (49 %), *Shigella flexneri* -1 (60 %) y *Salmonella* -2 (46 %). Adicionalmente fue la mejor de todas las fracciones secundarias contra *E. coli* -1

(58 %). Comparando la actividad antibacteriana de las fracciones activas FS1E y FS8E contra la del fármaco control cloranfenicol, se observa que las fracciones superan el efecto antibacteriano del fármaco (Gráfica 4).



Gráfica 3. Resultados de los porcentajes de inhibición de las fracciones F12E, FS1E, FS8E y cloranfenicol

De la fracción FS6E se identificó mediante el análisis IR, RMN-¹H, RMN-³C y EM (Espectro A-11 y A-12) como β -sitosterol (25; Apéndice) el efecto de inhibición del compuesto para siete cepas fue entre el 2 al 19 % a una concentración de 400 μ g/ml.



β -sitosterol (25)

Cabe destacar que las propiedades antibacterianas de los compuestos obtenidos (escualeno, β -sitosterol y estéres metílicos), no han sido descritos en la literatura para estas cepas de bacterias entéricas.

9. CONCLUSIONES

El fraccionamiento del extracto hexánico de *Hippocratea excelsa* nos condujo a la obtención de cuatro fracciones activas (F1E, F7E, FS1E y FS8E) que a una concentración de 0.4 mg/ml mostraron efectos de inhibición bacteriana del 14 al 95 %.

Del fraccionamiento del extracto hexánico de *H. excelsa* la fracción FS8E fue la única que inhibió a 8 de las cepas empleadas.

Del fraccionamiento del extracto hexánico de *H. excelsa* se obtuvieron los compuestos escualeno, β -sitosterol y una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos: hexadecanoato de metilo, heptadecanoato de metilo, octadecanoato de metilo, pentaicosanoato de metilo y hexaeicosanoato de metilo.

La actividad antibacteriana mostrada tanto en fracciones y compuestos aislados puede explicar en parte el uso que se hace de la raíz de *Hippocratea excelsa* en el tratamiento de la diarrea o disentería en las prácticas médicas alternativas de México.

Es la primera vez que se describe la actividad antibacteriana de los compuestos escualeno, β -sitosterol y estéres metílicos.

Este estudio de la evaluación antibacteriana es un aporte más a la investigación farmacológica de la flora medicinal mexicana.

Los compuestos escualeno, β -sitosterol y los ésteres metílicos, obtenidos en este estudio no se habían encontrado en la planta, por lo que es un aporte en la química de la planta.

10. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jáquez, P., López, M. E. 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS, México.

Aguliar, O. M. M. 1998. Aislamiento de los compuestos con actividad antimicrobiana de las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum* lag. Tesis de Licenciatura QFB. FES Zaragoza. UNAM.

Alanís, A. D., Calzada, F., Torres, J. 2002. Screening of some mexican medicinal plants for antibacterial activity. Revista de Fitoterapia SI, 311.

Alanís, A., Calzada, F., Cervantes, A., Torres, J., Cevallos, G. 2005. Antibacterial properties of some Medicinal plants used in mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. Journal of Ethnopharmacology. 100:153-157

Barcnas, B. Y. 2001. Bacterias enteropatógenas asociadas a diarrea aguda en niños hospitalizados en la ciudad de México. Tesis profesional para título de Biólogo. FES Iztacala. UNAM.

Brock, D. T. 1993. Microbiología. 6ta Editorial Hispanoamerica S. A.

Calzada, F. 1989. Metilquinonas triterpénicas y alcaloides sesquiterpénicos de *Hippocratea excelsa* HBK. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.

Calzada, F., Mata, R., Lopez, R., Linares, E. 1991. Friedelanes and triterpenoquinone methodes from *Hippocratea excelsa* . *Planta medica* 57:194-195

Calzada, F., Alanís, A., Meckes, M., Tapia-Contreras, A., Cedillo-Rivera, R. 1998. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia Lamblia* to some medicinal plants used by the people of Southern México. *Phytotherapy Research*. 12: 70-72.

Cristobal, T. E. 1998. Estudio químico y actividad insecticida de *Hippocrateina celestroides* HBK (Hippocrateaceae) Tesis de Licenciatura para titulo de Biólogo. Facultad de Ciencias UNAM.

Freeman, B. 1989. Microbiología de Burrows. Editorial Interamericana Mac Graw-hill. 22a Edición. Pp 505-512.

Gómez, M. S. 2000. Estudio Etnobotánico de la flora útil del municipio de nuevo Urecho, Michoacán. Tesis de Licenciatura para titulo de Biólogo. FES Iztacala. UNAM.

Goytia, J. Ma A. 1992. Cultivo *invitro* de cancerina (*Hippocratea excelsa* HBK) Tesis de Licenciatura para titulo de Biólogo. FES Iztacala, UNAM.

Goodman, G. A., Rall, T. W., Nies, A. S., Taylor, P. 1995. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Novena edición, volumen 1. Editorial McGraw-Hill Interamericana.

Jawetz, E., Melnick, J. Adelberg, E. 1987. Microbiología Médica. Editorial El Manual Moderno, S.A de C.V. Pp 238-251, 262

Mandell, A. 1991. Enfermedades infecciosas. Editorial Medica Panamericana S.A. Pp 1728,1752,1796,1814.

Mata, R., Calzada, F. 1990. Chemical studies on mexican plants used in traditional medicine, XV. Sesquiterpenevoninoate alkaloids from *Hippocratea excelsa*, Journal. Nature Products. 53 (5):112-1219.

Merck. 1999. El manual Merck, Editorial Harcurt, S.A, 10ma edición. España. 3ra sección cap. 27.

MindVision, PLMMR. 1997. Diccionario de la salud. Enciclopedia multimedia y comunicación.

Mograbi, M. L. 1984. Infecciones entéricas fisiopatología y tratamiento de sus complicaciones. Editorial el Manual Moderno S.A de C.V. Pp 27-30.

Natura.2004 [www.Natura.com .mx/herbolaria/articulo.html](http://www.Natura.com.mx/herbolaria/articulo.html)

Pantoja C. J. C. 2000. Comparación de los perfiles cromatograficos de los estéres metílicos de los ácidos grasos de cepas tipificadas y ambientales de *Salmonella Sp*, Para determinar los picos características del género. Tesis de Licenciatura para título de Biólogo. FES Iztacala. UNAM.

Pérez, R. M, Pérez., S; Zavala., M; Salazar, M. 1995. Antiinflammatory activity of the bark of *Hippocratea excelsa* Journal Ethnopharmacology. 47: 85-90.

Popoca, S, J., Villarel, O. M. L Aguilar, C. 1996. Actividad citotóxica de extractos orgánicos derivados de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana como antitumorales. Resumen de ponencias del Primer Congreso Nacional de Plantas Medicinales de México Tlaxcala, Tlax., 24-30 de junio. Pp: 84-85.

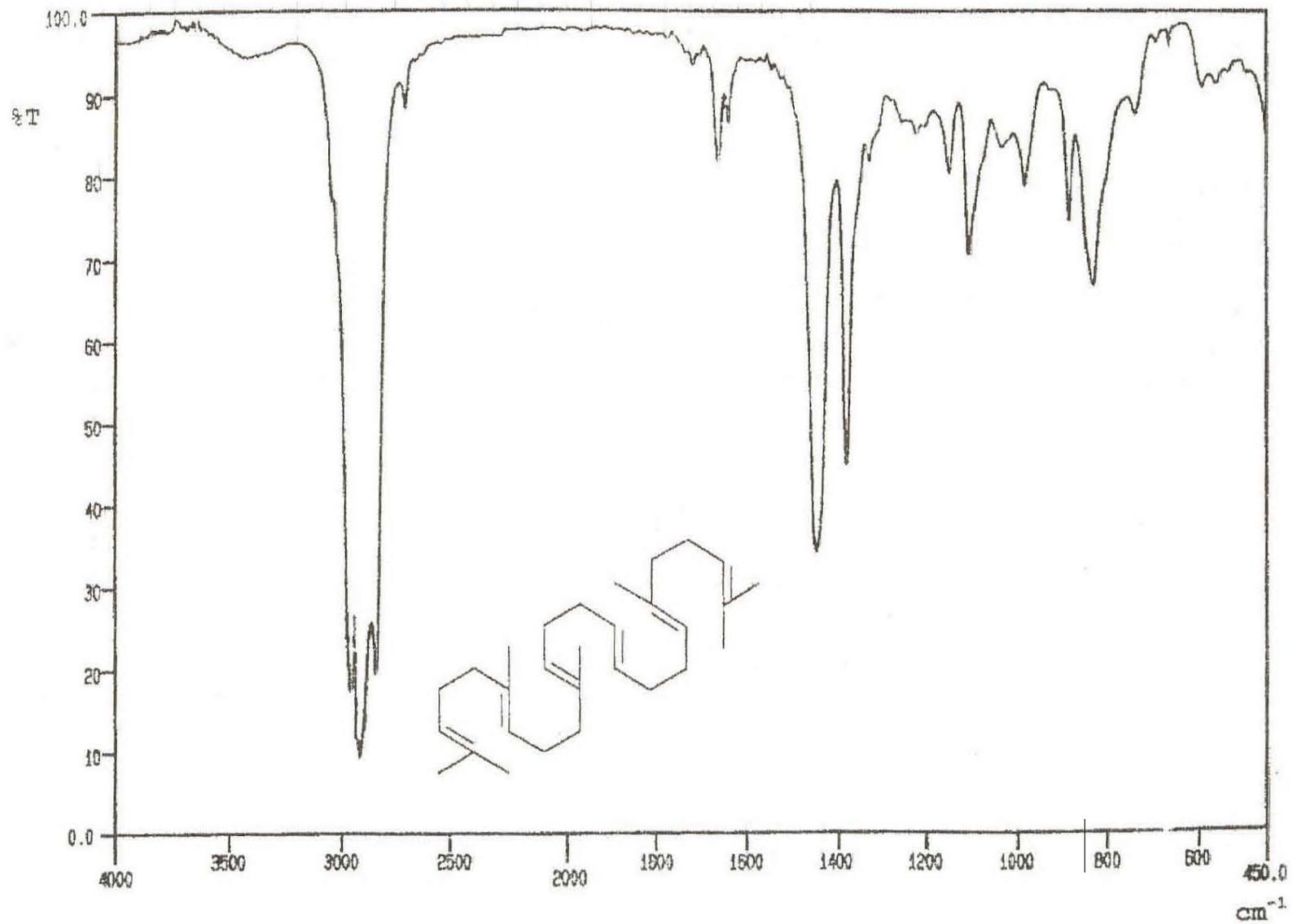
Popoca, J; Aguilar, A; Alfonso, D; Villareal, M. L.1998. Citotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. Journal. Ethnopharmacology. 59: 173-177

SS. (Secretaria de salubridad y Asistencia. 2001).

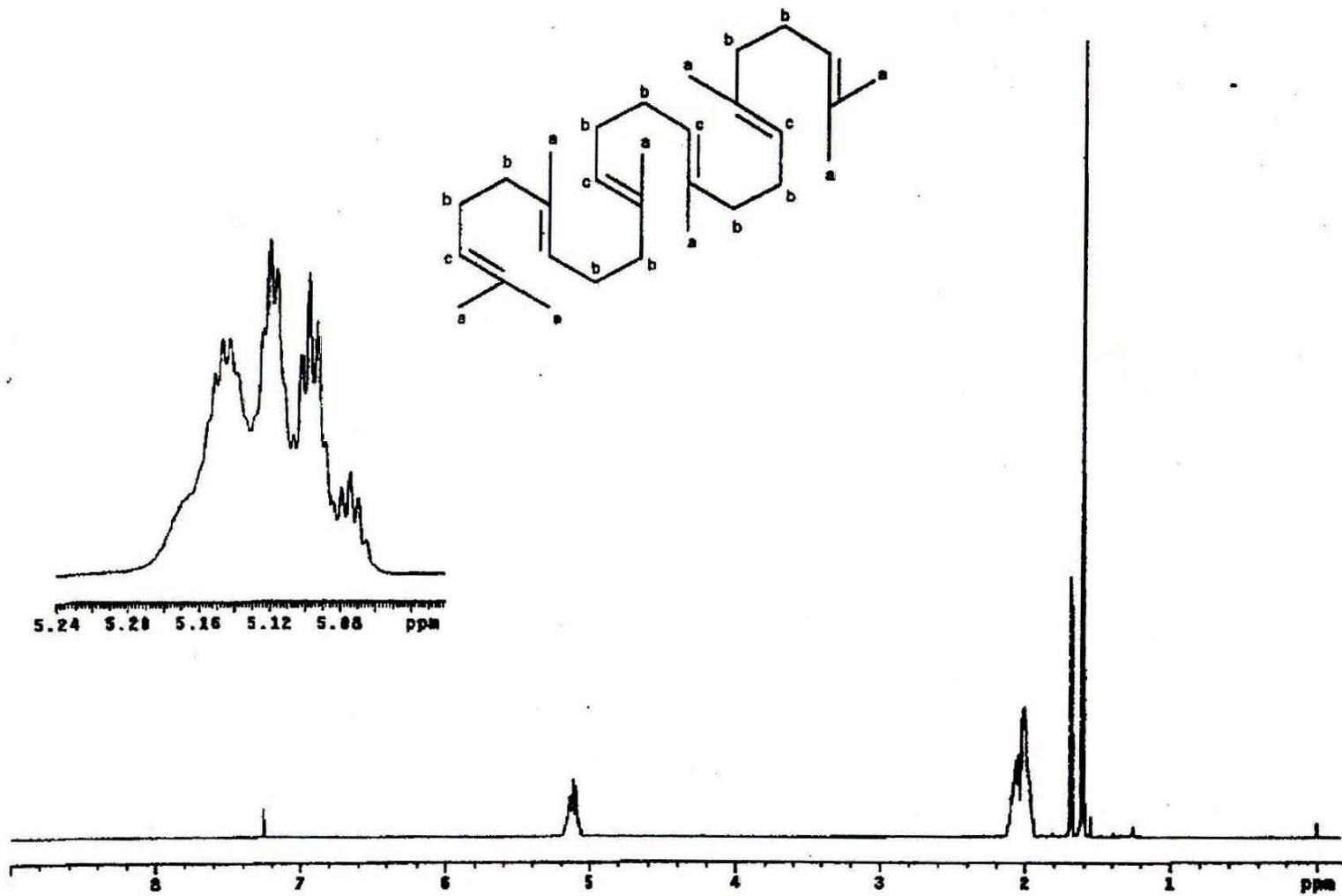
Trejo, M. J. 1998. Valoración farmacológica de la utilidad gastroprotectora de los constituyentes de *Hippocratea excelsa*. Tesis de Licenciatura para título de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Ciencias UNAM.

[Umm 2000 www.Umm.edu/esp_ency/article/000254.htm](http://www.Umm.edu/esp_ency/article/000254.htm)

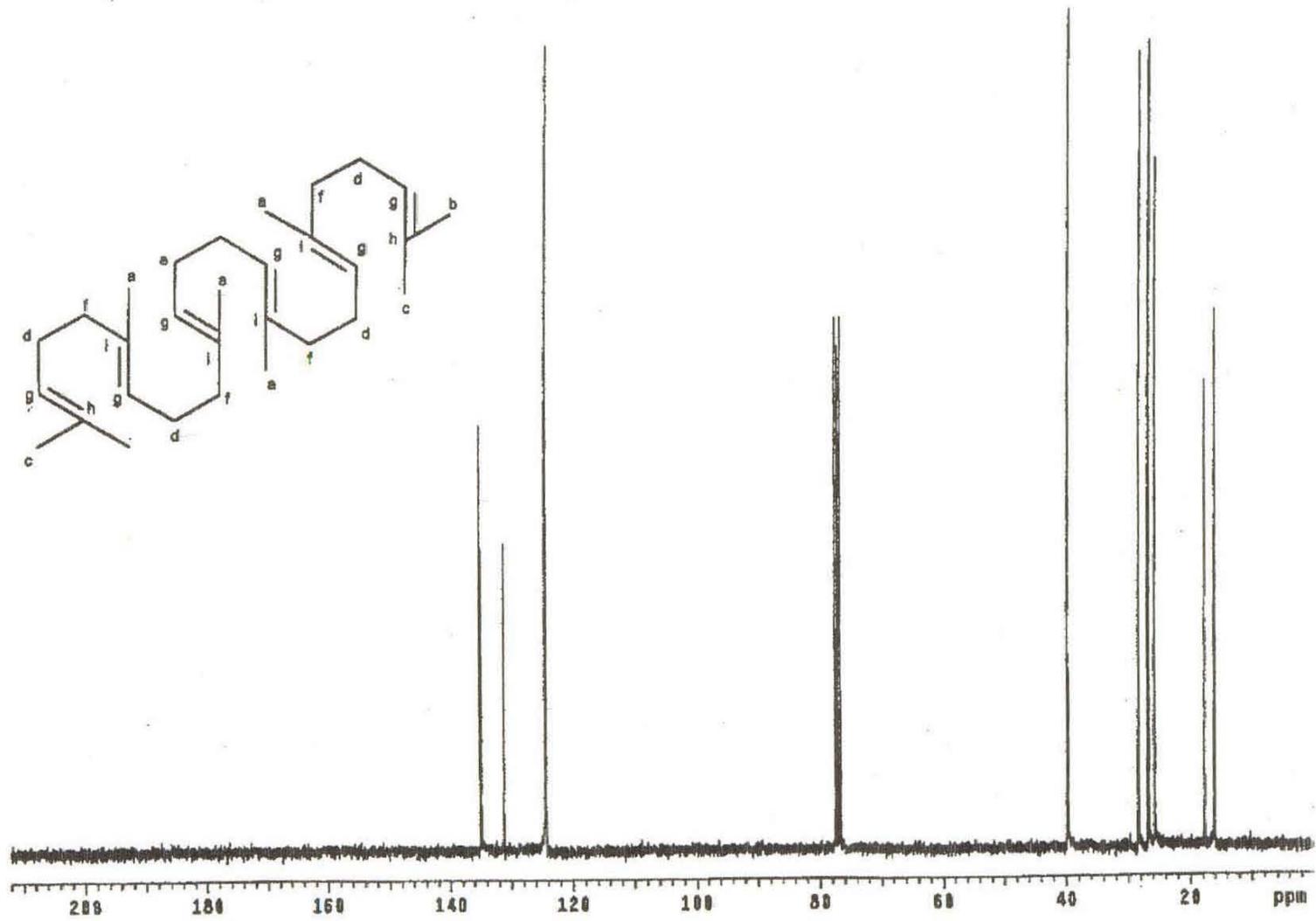
11. APÉNDICE



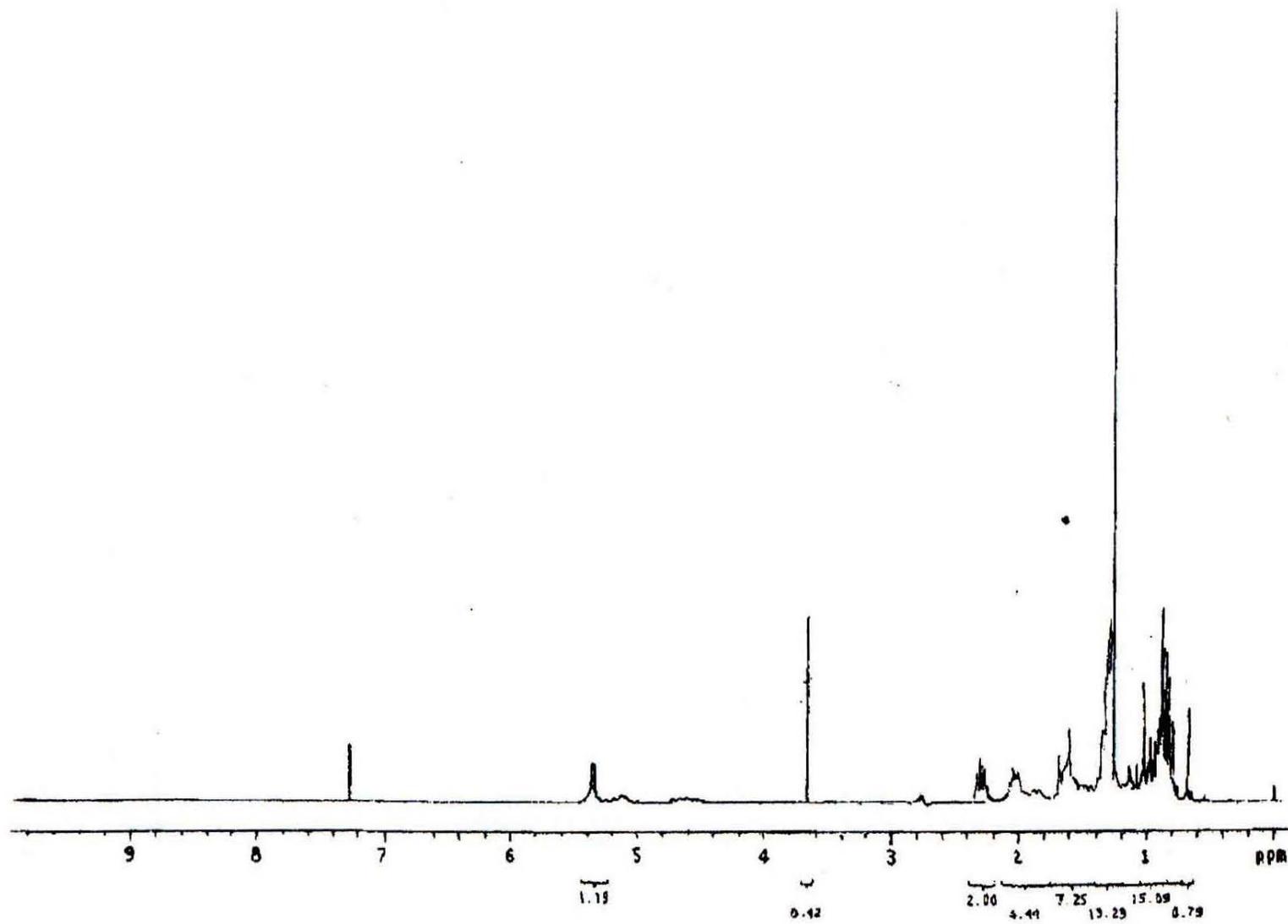
Espectro A-1. Espectro de en el IR del escualeno



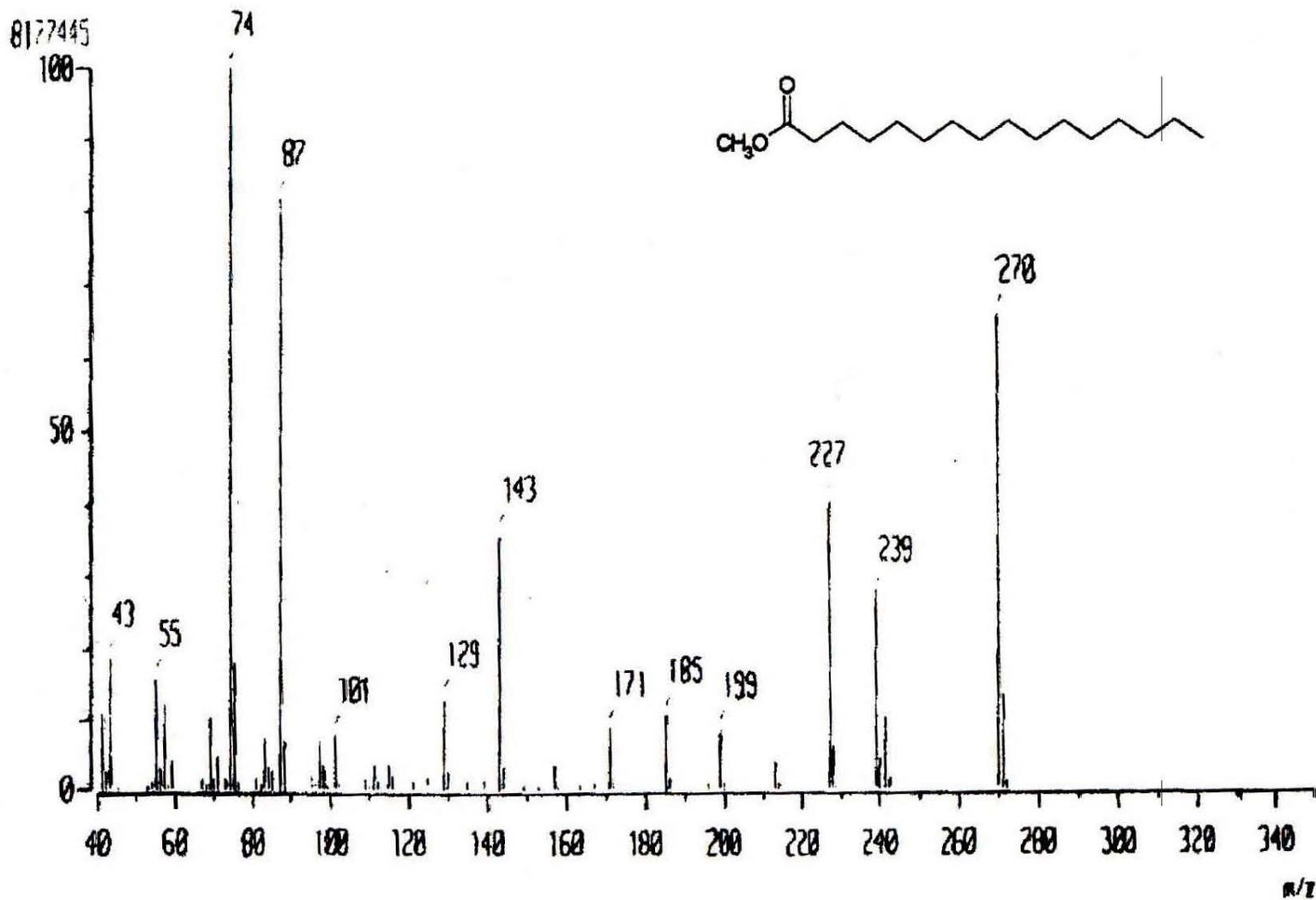
Espectro A-2. Espectro de RMN-¹H a 500MHz del escualeno



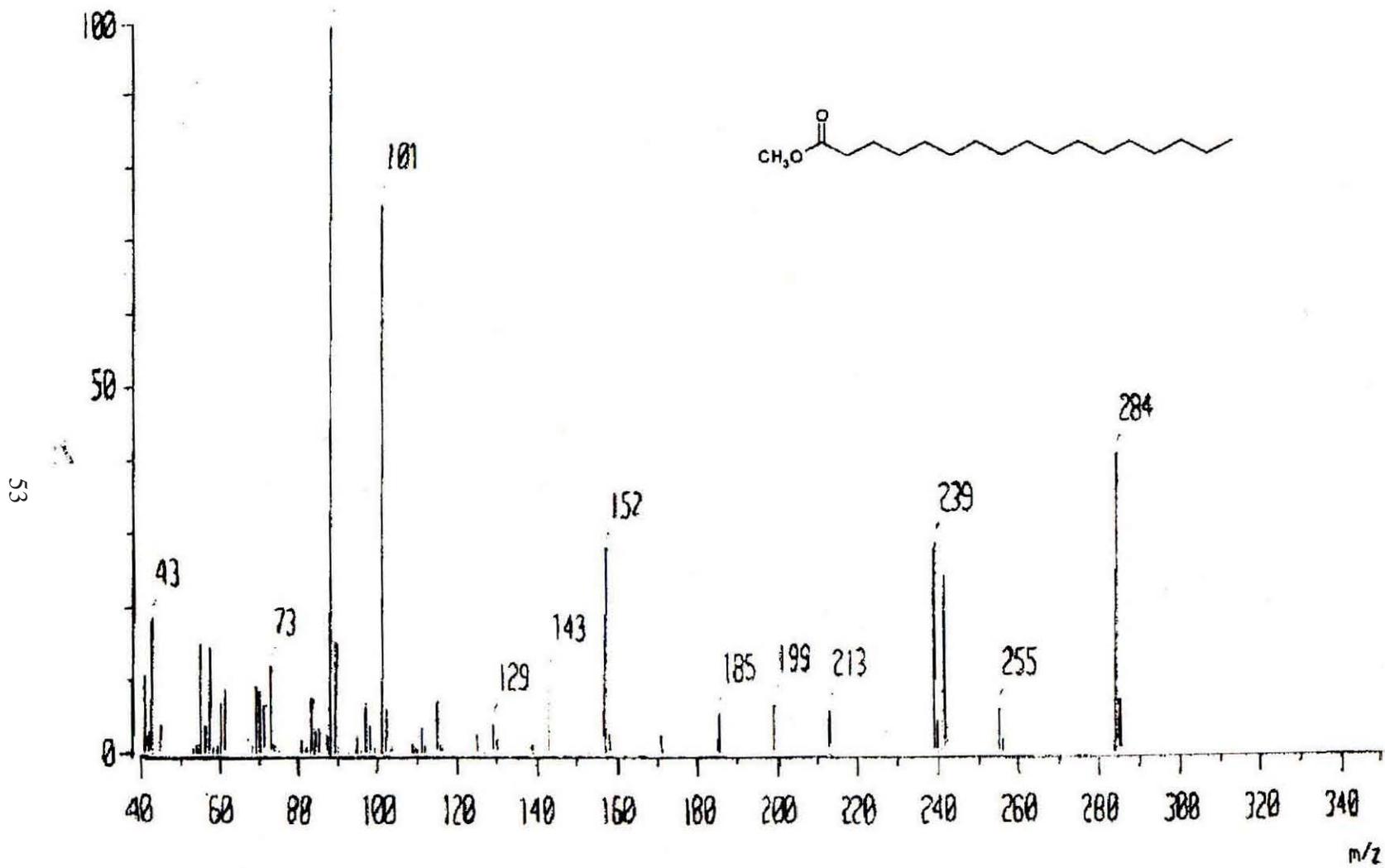
Espectro A-3. Espectro de RMN-¹³C a 500MHz del escualeno



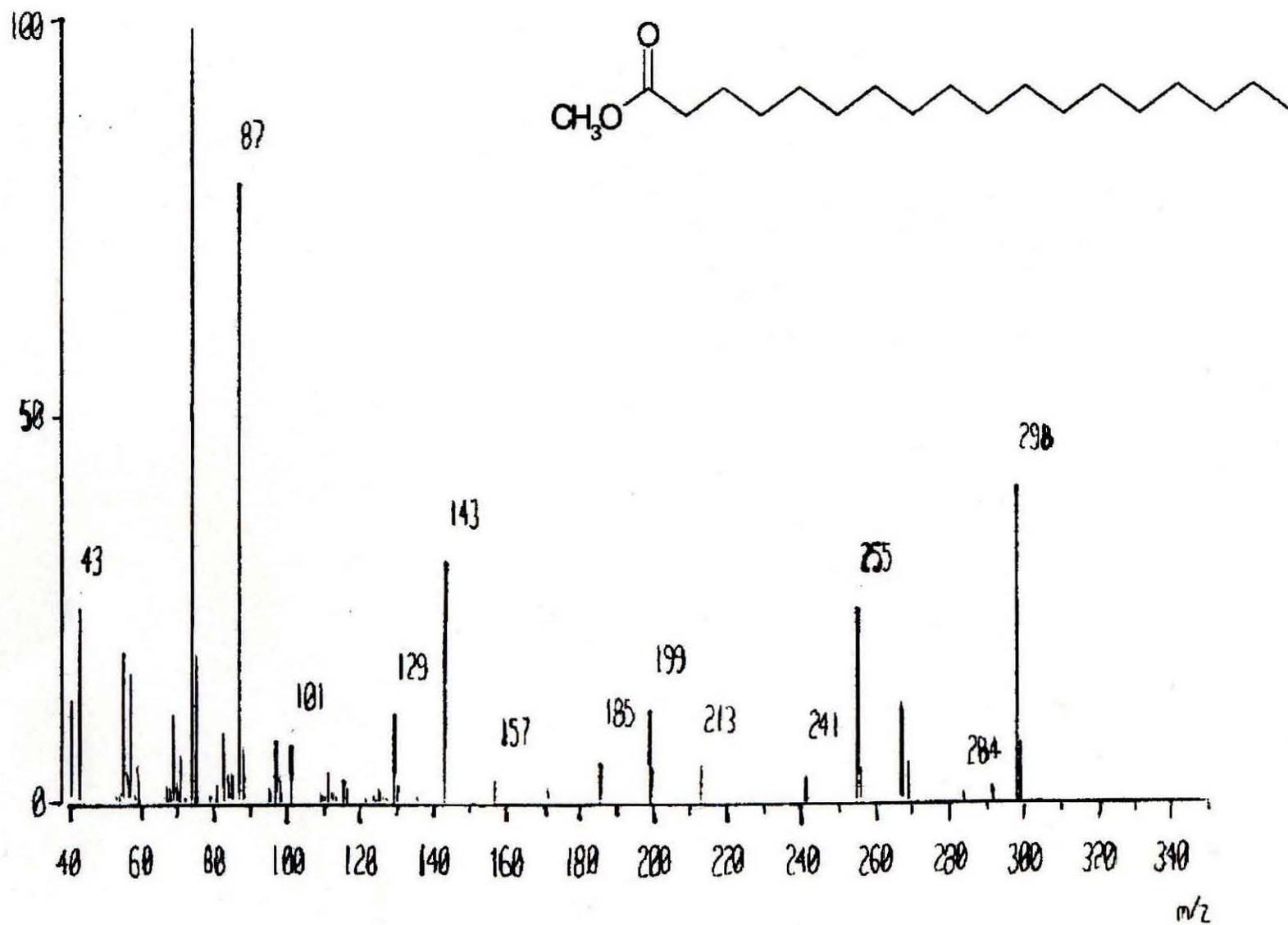
Espectro A-4. Espectro de RMN- ^1H a 300MHz de los ésteres metílicos.



Espectro A-5. Espectro de IE del hexadecanoato de metilo.

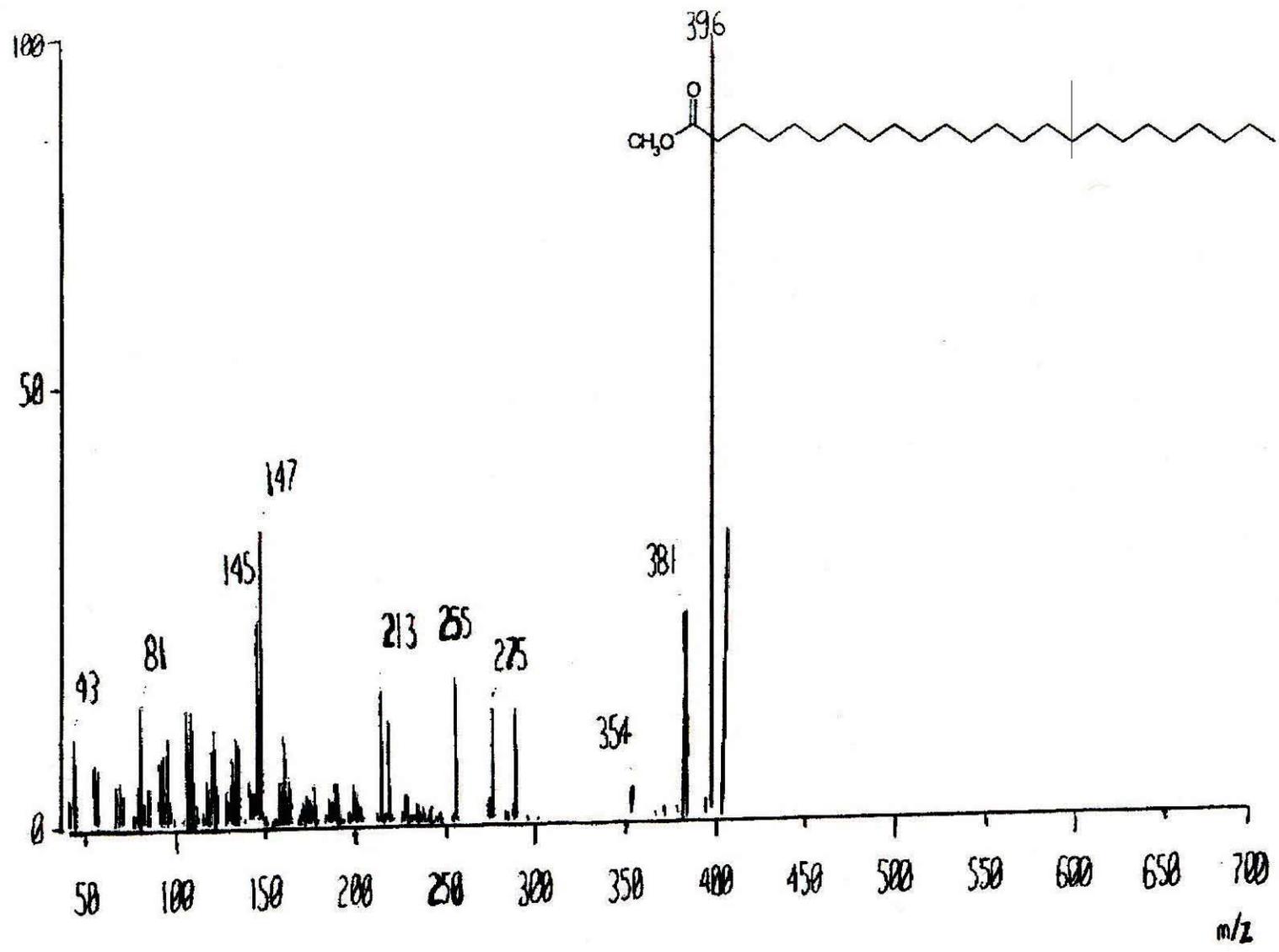


Espectro A-6. Espectro de IE heptadecanoato de metilo



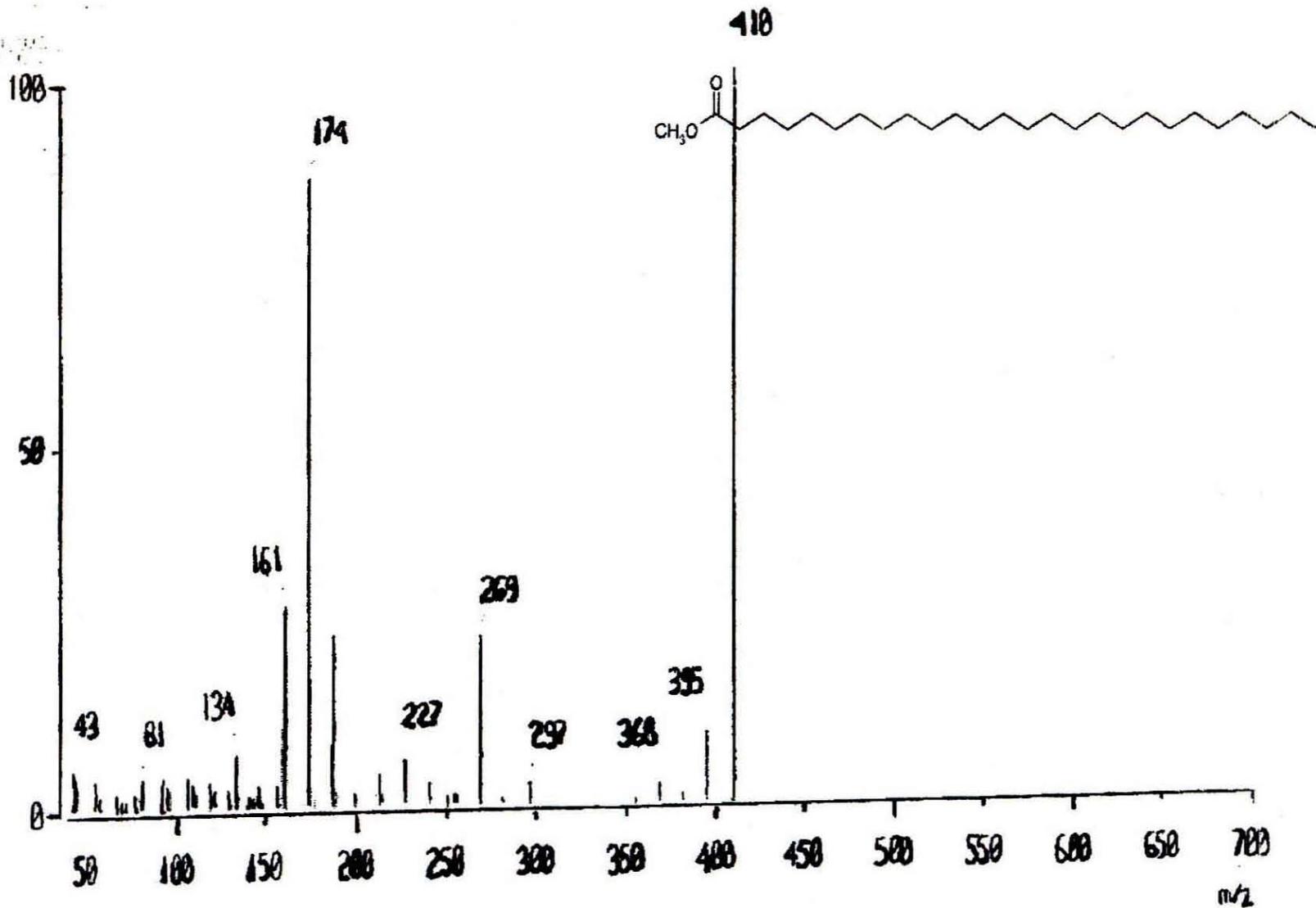
Espectro A-7. Espectro de IE octadecanoato de metilo.

55

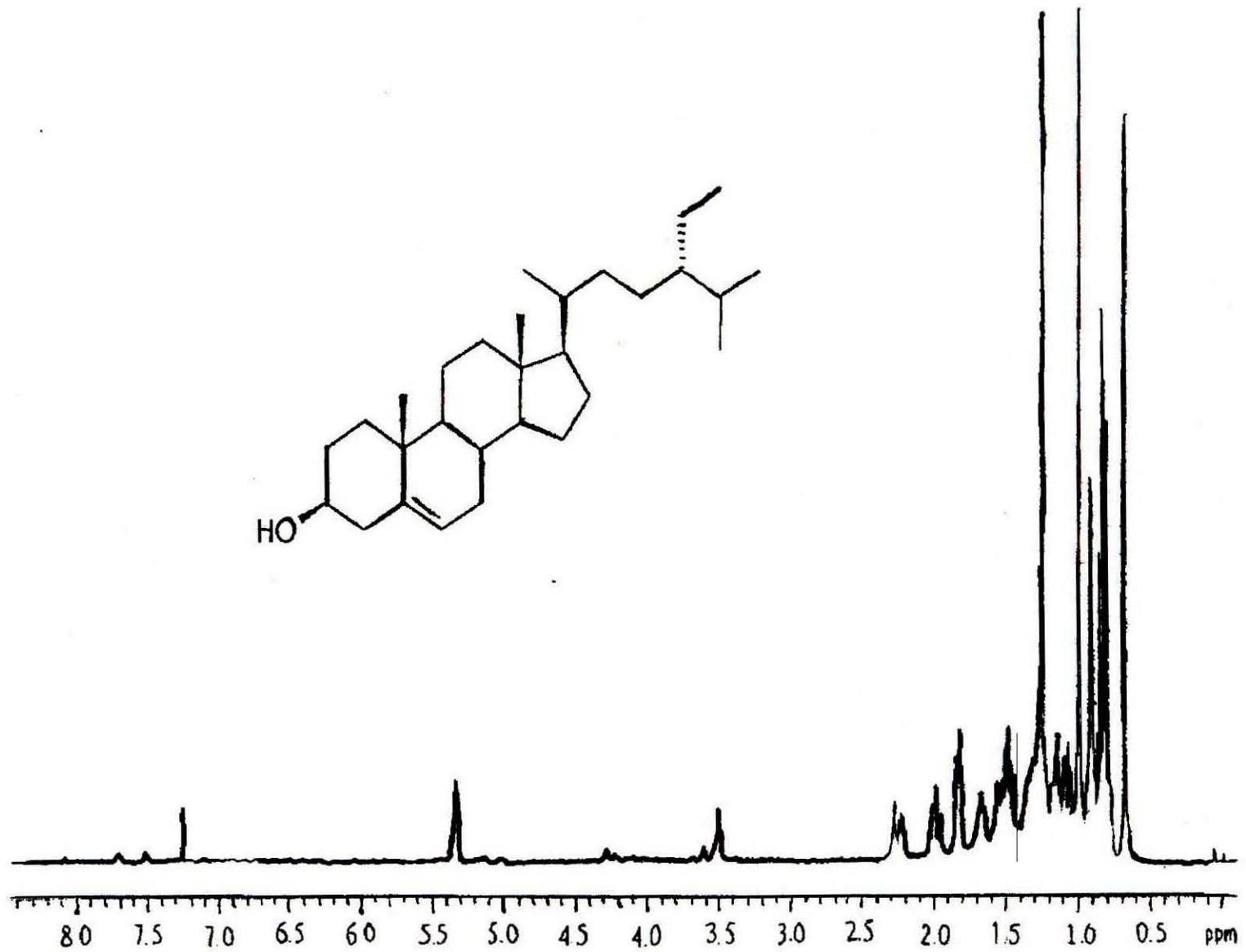


Espectro A-8. Espectro de IE pentaicosanoato de metilo.

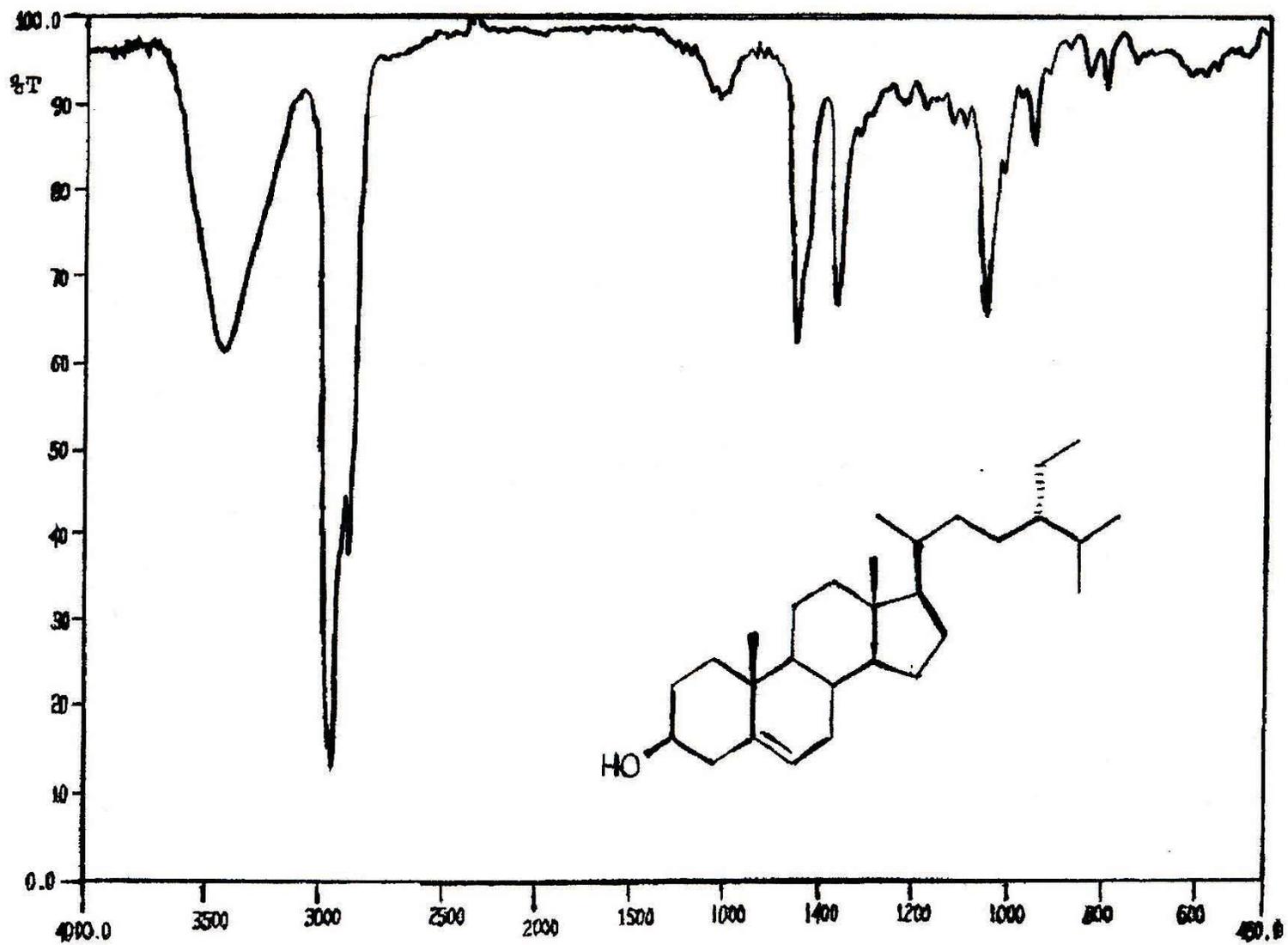
56



Espectro A-9. Espectro de IE hexaeicosanoato de metilo



Espectro A-10. Espectro de RMN-1 a 500MHz del β -sitosterol.

Espectro A-11. Espectro IR del β -sitosterol