

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

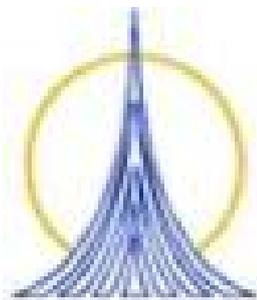
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
“ZARAGOZA”

“Determinación de actividad antibiótica de
flavonoides de *Tephrosia crassifolia*”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
MIGUEL GUERRA ORTIZ

DIRECTOR: DR. FEDERICO GÓMEZ GARIBAY
ASESOR: MTRA. DORA ALICIA PÉREZ GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F. , AGOSTO 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Es un privilegio para mí poder expresar mi sincero agradecimiento a todos mis amigos, colegas y otras personas que me ayudaron a iniciar y completar esta tesis. Es obvio que no es posible nombrar a cada persona, pero quiero agradecer a las siguientes personas en particular:

A Mamá, Papá, Diana Minerva Ruiz García, Gabriel Guerra Ruiz, A Mi familia; Rubén Marroquín Segura, Dora Alicia Pérez González, Federico Gómez Garibay, Mauricio Flores Pimentel, Claudia Fabiola Martínez Rodríguez, José Luis Mora Guevara, Armando Cervantes Sandoval; Roberto Carlos Huerta Juárez, Salvador Urquilla Simaco, Horacio López, Alberto Suárez Paniagua, Alexis Pérez Villalobos, Ricardo Beltrán, Jaime Rivera Arias, Carmen Melchor, Patricia Vidal, A el Laboratorio 313, José Luis Cortés Medina, Margarita Elizabeth Cisneros Ortiz, Michel Parrasales Bravo, Gemma Rivera, A mi país, A la UNAM, A mis profesores, A mis compañeros, A mis amigos, A todos los que voluntaria o involuntariamente ayudaron a que se lleve a cabo esta formación.

La instrucción y la enseñanza; la educación y sus fines; son el patrimonio de nuestra especie para mejorar a las nuevas generaciones.

Gracias

**LA VIDA ES BREVE Y
EL ARTE LARGO,
LA OCASIÓN ES FUGAZ,
LA EXPERIENCIA FALAZ Y
EL JUICIO DIFÍCIL.
NO BASTA QUE EL MÉDICO
HAGA SU PARTE
EN CUANTO DEBE HACER,
SI POR LA SUYA NO CONCURREN EN
EL MISMO OBJETIVO
EL ENFERMO, LOS ASISTENTES Y
LOS QUÍMICOS.**

ÍNDICE	
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA	4
<i>EL NACIMIENTO DE LA FARMACOLOGÍA</i>	4
<i>USO DE PLANTAS EN MEDICINA</i>	8
<i>METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS</i>	11
A) FLAVONOIDES	11
B) TERPENOIDES	14
C) ALCALOIDES	15
D) OTROS	15
<i>DESCUBRIMIENTOS RECIENTES</i>	17
<i>GÉNERO <u>TEPRHOSIA</u></i>	20
A) DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA	20
B) TAXONOMÍA	20
C) USO EN MEDICINA TRADICIONAL	21
D) METABOLITOS AISLADOS	22
<i>BREVE HISTORIA DE LOS ANTIBIÓTICOS</i>	24
<i>RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS</i>	26
<i>MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA</i>	32
<i>FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA "IN VITRO"</i>	36
<i>ASPECTOS CUANTITATIVOS</i>	38
<i>SALES DE TETRAZOLIO</i>	39
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	43
OBJETIVO	44
HIPÓTESIS	45
MATERIAL	46
<i>MATERIAL DE LABORATORIO</i>	46
<i>MATERIAL BIOLÓGICO</i>	47

MÉTODOS	49
RESULTADOS	52
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	56
PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES	59
ANEXO	62

RESUMEN

En el presente trabajo se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los flavonoides crassifolina (I), hildgartol (II), tephromicrocarpanona (III), metil glabranina (IV) y metil hildgartol (V).

Se usó para determinar la CMI el método de microdilución en placa de microtitulación, utilizando p-iodonitrotetrazolio (INT) como revelador de la actividad enzimática el cual se empleó en una concentración de 0.2 mg/mL y *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* como organismos de prueba, después de la incubación el crecimiento bacteriano fue detectado por la lectura de microplacas en un espectrofotómetro.

Las cinco sustancias tuvieron actividad antimicrobiana contra gram negativos siendo el hildgartol (*E. coli* 0.36-3.12 µg/mL y frente a *Ps. aeruginosa* 3.12 µg/mL) y el metil hildgartol (*E. coli* 0.78 µg/mL y contra *Ps. aeruginosa* 0.78-3.12 µg/mL) fueron los que obtuvieron mayor actividad.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas, que podrían considerarse batallas entre el hombre y sus agentes patógenos, son la principal causa de enfermedad y muerte en el mundo. Los patrones de infección que requieren atención médica presentan formas muy diversas, desde las enfermedades infecciosas más conocidas como la tifoidea, el cólera y la tuberculosis hasta las enfermedades oportunistas.

La llegada de la penicilina hace 70 años fue seguida por un periodo de descubrimientos, del uso exagerado de antibióticos y el surgimiento de la resistencia bacteriana gracias a la extraordinaria capacidad de los microorganismos de adaptarse a las nuevas condiciones, nuevas y más costosas drogas aparecieron, pero no han sido lo suficientemente capaces de evitar el creciente número de enfermedades bacterianas en el mundo.

La mayoría de los antibióticos naturales han sido aislados de microorganismos del suelo a través de una búsqueda intensa. En 1952 la mayor parte de los agentes reportados fueron derivados de *Streptomyces* y también parte de bacterias y hongos. Para 1985 el número de agentes llegó a 220 pero disminuyó la frecuencia de descubrimientos. Esto fue causado por las técnicas de búsqueda empleadas; a partir de entonces se exploraron nuevas técnicas como: la biosíntesis directa, búsquedas bioquímicas del modo de acción de los antibióticos existentes, ingeniería genética, la exploración de antibióticos a partir de organismos marinos y animales en donde se han encontrado interesantes hallazgos.

El uso de las plantas en el tratamiento de infecciones ha sido registrado desde hace mucho tiempo, algunos de los primeros registros datan del año 3000 antes de Cristo en China, también se tiene registros de documentos egipcios, hebreos y griegos y más recientemente de documentos precolombinos en América, aunque la medicina occidental no los ha aceptado como tales.

En las últimas dos décadas se ha observado un creciente nuevo campo interdisciplinario llamado etnobotánica, bioquímica ecológica, fitoquímica o etnofarmacología que

básicamente estudia la interacción bioquímica de la planta con los microorganismos en correlación con su efecto farmacológico, el cual ha tenido mucho éxito encontrando nuevos principios activos a los que después se les aplican modernas técnicas químicas mediante las cuales se pueden identificar y sintetizar su estructura química y emplearse como fármaco de uso terapéutico. Esto ha inducido el descubrimiento de que sustancias químicas, particularmente los metabolitos secundarios como los taninos, los alcaloides y los flavonoides tienen una significativa importancia en las complejas relaciones microorganismo, hombre, animal y planta en el medio ambiente.

Las plantas son la fuente más antigua de compuestos con actividad farmacológica y han proporcionado muchos compuestos medicinales a la humanidad por siglos. Hoy en día se estima que más de dos tercios de la población mundial basa su salud en drogas derivadas de plantas, de este modo, la búsqueda fitoquímica especialmente para su uso farmacológico, proporcionará información muy valiosa para la búsqueda de nuevos medicamentos. Menos del 10 % de las plantas han sido examinadas para la búsqueda de compuestos bioactivos, la búsqueda de plantas con propiedades antimicrobiales es un enorme reto y es sumamente importante ya que el surgimiento de la resistencia bacteriana lo amerita.

El criterio para elegir *Tephrosia crassifolia* para este estudio radica en que es una planta nativa mexicana que se encuentra distribuida en el occidente del país, estudios previos han reportado que posee flavonoides de los cuales se ha reportado actividad antibiótica¹, en este estudio se evalúa la actividad antibacteriana de los flavonoides determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) para conocer su potencia y bioactividad.

El método empleado para la determinación de la CMI es de vanguardia ya que se basa en el empleo de un espectrofotómetro de microplacas el cual determina la absorbancia producida por un formazan generado al reducirse una sal de tetrazolio (en este caso INT) por la actividad enzimática celular bacteriana.

FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

EL NACIMIENTO DE LA FARMACOLOGÍA

La industria farmacéutica surgió a partir de una serie de actividades diversas relacionadas con la obtención de sustancias utilizadas en medicina. A principios del siglo XIX, los boticarios, químicos o los propietarios de herbarios obtenían partes secas de diversas plantas, recogidas localmente o en otros continentes. Estas últimas se compraban a los especieros, que fundamentalmente importaban especias, pero como negocio secundario también comerciaban con productos utilizados con fines medicinales, entre ellos el opio de Persia o la ipecacuana y la corteza de quina de Sudamérica. Los productos químicos sencillos y los minerales se adquirían con comerciantes de aceites, gomas y encurtidos.

Los boticarios y químicos fabricaban diversos preparados con estas sustancias, como extractos, tinturas, mezclas, lociones, pomadas o píldoras. Algunos profesionales confeccionaban mayor cantidad de preparados de la que necesitaban para su propio uso y los vendían a granel a sus colegas.

Algunas medicinas, como las preparadas a partir de la quina, belladona, digital (*Digitalis purpurea*), carnizuelo del centeno (*Claviceps purpurea*) u opio (látex seco de la adormidera *Papaver somniferum*), eran realmente útiles, pero su actividad presentaba variaciones considerables. En 1820, el químico francés Joseph Pelleterier preparó el alcaloide activo de la corteza de quina y lo llamó quinina. Después de ese logro aisló varios alcaloides más, entre ellos la atropina (obtenida de la belladona) o la estricnina (obtenida de la nuez vómica).

Su trabajo y el de otros investigadores hizo posible normalizar varias medicinas y extraer de forma comercial sus principios activos. Una de las primeras empresas que extrajo alcaloides puros en cantidades comerciales fue la farmacia de T.H. Smith Ltd. en

Edimburgo, Escocia. Pronto los detalles de las pruebas químicas fueron difundidos en las farmacopeas, lo que obligó a los fabricantes a establecer sus propios laboratorios.

LAS PRIMERAS MEDICINAS SINTÉTICAS

Los productos químicos extraídos de plantas o animales se conocían como orgánicos, en contraposición a los compuestos inorgánicos derivados de otras fuentes; se creía que los primeros sólo podían ser producidos por los organismos vivos, de ahí su nombre. En 1828, sin embargo, el químico alemán Friedrich Wöhler calentó un compuesto inorgánico, el cianato de amonio, y logró producir urea, que anteriormente sólo se había conseguido aislar a partir de la orina.

Esa síntesis revolucionaria hizo que se intentaran sintetizar otros compuestos orgánicos, para la futura industria farmacéutica tuvo gran importancia el descubrimiento accidental, en 1856, del primer colorante sintético, la ‘malva’. Este descubrimiento del joven estudiante británico de química William Henry Perkin incitó a diversos fabricantes de Alemania y Suiza a desarrollar nuevos colores sintéticos, con lo que se ampliaron los conocimientos sobre la nueva química.

Los colorantes o tintes sintéticos tuvieron un impacto enorme en los avances médicos, aumentaron considerablemente la gama de productos biológicos de tinción, con lo que aceleraron el progreso de la bacteriología y la histología. La búsqueda de nuevos colores estimuló el estudio de la química orgánica, lo que a su vez fomentó la investigación de nuevas medicinas. El primer fármaco sintético fue la acetofenidina, comercializada en 1885 como analgésico por la empresa Bayer de Leverkusen (Alemania) bajo la marca Phenacetin. El paracetamol utilizado hoy como analgésico se derivó posteriormente de aquel compuesto.

El segundo fármaco sintético importante, comercializado en 1897, fue el ácido acetilsalicílico, creado por el doctor Felix Hoffmann en los laboratorios de investigación de Bayer. Este fármaco se vendió en todo el mundo con el nombre comercial de aspirina

y supuso un tratamiento nuevo y eficaz para los dolores reumáticos desde ese momento ésta empresa creció hasta convertirse en la gigantesca empresa IG Farbenindustrie.

LOS PRIMEROS FÁRMACOS ANTIINFECCIOSOS

El primer fármaco que curó una enfermedad infecciosa que causaba una gran mortalidad fue la “bala mágica” del bacteriólogo alemán Paul Ehrlich². Convencido de que el arsénico era clave para curar la sífilis, una enfermedad venérea, sintetizó cientos de compuestos orgánicos del arsénico. Más tarde inyectó estos compuestos en ratones previamente infectados con el organismo causante de la enfermedad, el *Treponema pallidum*. Algunos de los 605 compuestos probados mostraron ciertos indicios prometedores, pero morían demasiados ratones. En 1910, fabricó y probó el compuesto número 606, la arsfenamina, que restablecía plenamente a los ratones infectados.

Ehrlich se enfrentó entonces al problema de fabricar su compuesto en grandes cantidades, preparado de forma adecuada para su inyección, así como para su distribución. Buscó la ayuda de la empresa química Hoechst AG, de Frankfurt (Alemania). La empresa comercializó la sustancia en ampollas de vidrio con una dosis única de arsfenamina en polvo, que debía disolverse en agua esterilizada antes de ser inyectada. El fármaco, exportado a todo el mundo, recibió el nombre comercial de salvarsán. Este proceso de descubrimiento, producción comercial y distribución sigue siendo típico de la industria farmacéutica.

En 1916 los científicos de Bayer inventaron un fármaco eficaz para tratar una enfermedad tropical, la tripanosomiasis o enfermedad del sueño². Este mal, que afecta a los seres humanos y al ganado, es provocado por microorganismos llamados tripanosomas, transportados por la mosca tsetsé. La Primera Guerra Mundial interrumpió los suministros de productos químicos alemanes (y también suizos) a Gran Bretaña y Estados Unidos, lo que estimuló las actividades de investigación y desarrollo en esos países.

Los productos naturales han sido empleados para elucidar procesos fisiológicos e incluso para definirlos, obteniendo nombres como receptores “nicotínicos” o “muscarínicos” e incluso más recientemente “endorfinas” proveniente de morfina endógena. Los productos naturales son la base de muchas drogas usadas en la medicina moderna y son tan ampliamente empleados que los profesionales de la medicina no conocen su origen vegetal.

Algunas de las nuevas herramientas como colforsina (un estimulador de adenil ciclasa), ginkgolide B (un activador del factor plaquetario), son la vanguardia de la investigación bioquímica y son obtenidos solamente de plantas.

Aunque las plantas no son siempre el camino para descubrir compuestos novedosos que pueden ser empleados en el tratamiento de enfermedades, las plantas nos pueden dar una visión valiosa en la patología de la enfermedad.

Aunque la primera sustancia aislada a partir de las plantas fue el ácido benzoico en 1560, la búsqueda de drogas no inicia hasta 1804 cuando la morfina fue aislada de *Papaver somniferum* (opio). Desde entonces muchos principios activos de plantas superiores han sido descubiertos, pero menos de 100 de estructura definida son de uso común hoy en día en países industrializados.²

USO DE LAS PLANTAS EN MEDICINA

Los fósiles de vegetales datan de hace 3.2 billones de años, éstos provocaron la aparición de la vida animal y después la vida humana. Las plantas proporcionan calorías y vitaminas esenciales para el metabolismo, también generan principios activos empleados como medicinas.¹

Las plantas han presentado un arsenal de armas para sobrevivir al ataque de los microbios, estas incluyen barreras físicas así como antimetabolitos químicos, que están presentes en las ellas o son inducidas después de la infección llamadas fitoalexinas, las que pueden ser inducidas por factores abióticos como la radiación ultravioleta.

Cuando ocurre una infección o un daño a la planta, un conjunto de procesos son activados y algunos de los compuestos producidos lo hacen inmediatamente, las fitoalexinas tardan dos o tres días en producirse. Es difícil determinar si una sustancia es una fitoalexina o una prohibitina ya que en una planta puede ser una y en otra actuar de otra forma.

Encontrar poderes curativos en plantas es una idea ancestral. Cientos, sino es que miles de plantas han sido empleadas en los diferentes continentes a través de la historia de la humanidad. Hay evidencia de que los hombres Neandertal, que vivieron hace 60 000 años en lo que hoy es Irak, emplearon la malvarrosa (*Alcea rosea*) la cual sigue siendo empleada como planta medicinal alrededor del mundo hoy en día.² La Biblia proporciona descripciones de al menos 30 plantas de las cuales el incienso (*Boswellia sacra*) y la mirra (*Commiphora myrrha*) se emplearon para lavar bocas por sus propiedades antisépticas.

La caída de las civilizaciones antiguas dio como resultado la destrucción o pérdida de muchos de los documentos sobre plantas medicinales pero muchas culturas están redescubriendo sus conocimientos. Los nativos americanos reportaron que empleaban

1625 especies de plantas comestibles y 2564 como drogas, mientras que los europeos volteaban sus ojos hacia la botánica en 1800 con tratamientos venenosos e inefectivos.²

El uso de plantas medicinales como *Eupatorium perfoliatum* (hierba de ángel), *Podophyllum peltatum* (manzana de mayo), y *Panax quinquefolium* (ginseng) en Estados Unidos de América ha sido asociada con los Indios Americanos. Estas plantas han sido reconocidas y apreciadas por su valor ornamental. En América central las plantas medicinales han sido ampliamente usadas, ya sea por los Mayas, Aztecas, Toltecas, y Olmecas en México, los Mismitos y Sumus en Honduras y Nicaragua, los Pech, Lencas y Xicaques en Honduras, los Pipiles en El Salvador, los Tlmacas en Costa Rica, y los Guaymis y Kunas en Panamá. Actualmente cerca de 1500 especies de plantas aromáticas y medicinales son ampliamente usadas en Albania, Alemania, Bulgaria, Croacia, Francia, Hungría, España, Turquía y Reino Unido. La práctica de la medicina tradicional es muy grande en países como China, India, Japón, Pakistán, Sri Lanka y Tailandia, en China cerca del 40% del total de los medicamentos empleados son tradicionales, en Tailandia es muy generalizado el empleo de medicinas a partir de los géneros *Caesalpiniaceae*, *Fabaceae*, y *Mimosaceae* y en Japón las preparaciones herbales tienen más demanda que los productos farmacéuticos.

Las plantas medicinales son un componente integral de la medicina veterinaria. Granjeros y pastores de diferentes países usan plantas medicinales para el cuidado y conservación de la salud del ganado; desordenes intestinales en vacas son tratados en México con extractos de *Polakowskia tacacco*, suplementos alimenticios como la vitamina A son añadidos a el alimento de aves en Uganda, se estima que las plantas medicinales han sido empleadas por cientos de años para el control de enfermedades en el ganado. De hecho el interés en el sector veterinario de este tipo de medicina radica en el incremento en el costo de mantenimiento del ganado y la introducción de nueva tecnología en la producción de vacunas y medicinas.

Los usos de las plantas medicinales en la industria son muchos desde medicinas tradicionales, tés, comidas nutritivas, fitofármacos, hasta prototipos en la producción de

drogas semisintéticas. El mercado para químicos derivados de plantas, como fármacos, fragancias, sabores y colores excede por si mismo muchos billones de dólares por año.

En muchos países industrializados, las drogas prescritas derivadas de plantas constituyen un elemento en la preservación de la salud. Las plantas medicinales son un componente integral en la industria farmacéutica, como focos en la búsqueda y uso de principios activos y en la creación de nuevos productos con actividad farmacológica. En Alemania por ejemplo más de 1500 plantas incluidas en 200 familias y 800 géneros han sido procesadas como productos medicinales, por otro lado en Sud África cerca de 500 especies son productos comerciales. Hoy en día de hoy Bulgaria, Alemania y Polonia están reconocidos como los mayores exportadores de medicinas basadas en plantas.

Los efectos profilácticos y terapéuticos de las plantas en enfermedad cardiovascular han sido reportados, entre las más reconocidas están: *Achillea millefolium* (milenrama), *Allium sativum* (ajo), *Convallaria majalis* (lirio del valle), *Cratageus laevigata* (heno), *Cynara scolymus* (alcachofa), *Gingko biloba* (gingko) and *Viburnum opulus* (mundillos)³.

El interés en las plantas medicinales como una ayuda emergente a la salud ha sido avivado por el incremento de los costos de los medicamentos de prescripción médica en el mantenimiento de la salud y bienestar social, además de la perspectiva de nuevas drogas derivadas de plantas así como una gama de actividades relacionadas en diferentes países van a la par con ello. Basado en estudios financieros, las plantas medicinales continuaran teniendo un rol importante en el mantenimiento de la salud mundial.³

METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS

Los organismos vivos, sean plantas, animales o microbios, están compuestos todos básicamente los mismos componentes químicos. La bioquímica comparativa ha demostrado que en mayor o menor grado los mismos procesos químicos de los diferentes organismos proporcionan los requerimientos particulares. Los compuestos químicos han sido extensamente usados en plantas y dos categorías de compuestos químicos de uso sistemático pueden reconocerse, los metabolitos secundarios, (los cuales no proporcionan funciones esenciales para la planta) y la información contenida en las proteínas, (ADN y ARN).

La mayoría de las funciones de los compuestos secundarios es la defensa contra depredadores y patógenos, como dispersores en la polinización y en la dispersión de semillas.⁴

A) Flavonoides

Son miembros de un gran grupo de productos naturales con un esqueleto $C_6C_3C_6$ que, en la mayoría de los mismos, tiene una forma de anillo fenilcromano, en el grupo fenilo puede estar en la posición 2 (flavonoides normales), 3 (isoflavonoides) o 4 (neoflavonoides) del anillo de pirano. La posterior clasificación se basa en el grado de oxidación del anillo pirano. El anillo que contiene oxígeno puede estar reducido o ausente.⁵

Por marcaje radioactivo se ha establecido de manera clara que todas las clases de flavonoides, están biosintéticamente relacionadas. Una chalcona (calcona) es el último intermediario en la secuencia biosintética común de todos los flavonoides. Las primeras etapas de la biosíntesis a partir de fenilalanina también conducen a la biosíntesis de otros

compuestos de fenilpropilo, por ejemplo cumarinas, lignanos, lignina, derivados de ácido benzoico, ésteres aromáticos, etc. Las chalconas también precursoras de estilbenos.

Los diversos patrones de hidroxilación y metoxilación de los flavonoides se pueden establecer parcialmente en una etapa temprana.^{6,7,8}

Los flavonoides representan un amplio de derivados de fenoles hidrosolubles, muchos de los cuales son coloreados por lo menos nueve clases de flavonoides se han reconocido y son de gran interés fitoquímico. Su función es de defensa contra herbívoros y la regulación del transporte de auxina. La atracción de insectos y aves es también importante en la dispersión de semillas y en la polinización.

A los flavonoides se les ha encontrado una serie de beneficios al ser humano entre los que destacan:⁹

- **Propiedades antioxidantes**

La mayoría de ellos, y especialmente las catequinas del té verde, tienen una alta capacidad para neutralizar los radicales libres e impedir los perniciosos efectos que estos ejercen en la salud de nuestro organismo. Usados como complementos en combinación muchas veces con la vitamina C pueden ser capaces de neutralizar ciertos virus como los del herpes.

- **Propiedades anticancerígenas**

Muchos flavonoides se han mostrado tremendamente eficaces en el tratamiento del cáncer. Se sabe que muchos inhiben el crecimiento de las células cancerosas.

- **Propiedades cardiotónicas**

Tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación. Atribuidas fundamentalmente al flavonoide quercetina aunque aparece en menor intensidad en otros como la genisteína y la luteolina.

- **Fragilidad capilar**

Mejoran la resistencia de los capilares y favorecen el que estos no se rompan, por lo que resultan adecuados para prevenir el sangrado. Entre todos los flavonoides tendríamos que mencionar por orden de importancia la hesperidina, la rutina y la quercetina.

- **Propiedades antitrombóticas**

La capacidad de estos componentes para impedir la formación de trombos en los vasos sanguíneos posibilita una mejor circulación y una prevención de muchas enfermedades cardiovasculares.

- **Disminución del colesterol**

Su capacidad para rebajar el colesterol y los triglicéridos supone una ventaja en la salud del aparato circulatorio.

- **Protección del hígado**

Algunos flavonoides han demostrado su poder protector contra las enfermedades del hígado. La silimarina se ha probado experimentalmente como protectora y regeneradora del hígado en la hepatitis. Este mismo flavonoide, junto con la apigenina y la quercetina, son muy útiles para eliminar ciertas dolencias digestivas relacionadas con el hígado, como la sensación de plenitud o los vómitos.

- **Protección del estómago**

Ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kamferol, tienen propiedades contra úlceras al proteger la mucosa gástrica.

- **Antinflamatorias y analgésicas**

La hesperidina y otros flavonoides, por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, se han utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis.

- **Antimicrobianas**

La mayoría de estos principios han demostrado tener propiedades antivirales, antifúngicas y antibacterianas.¹⁰

B) Terpenoides

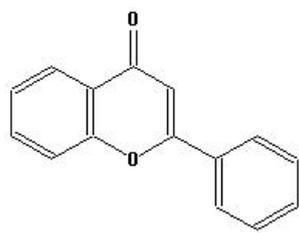
Los terpenoides son un grupo diverso y grande de metabolitos secundarios que son importantes en numerosas interacciones bióticas. Están ampliamente distribuidas en las plantas y muchos tienen funciones fisiológicas primarias, tanto formando parte de membranas, pigmentos carotenoides, de la clorofila y de hormonas. Los monoterpenoides volátiles son los mayores componentes de los aceites esenciales y frecuentemente tienen función de glándulas de olor de las flores.¹

C) Alcaloides

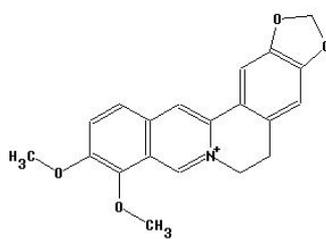
Los alcaloides presentes en la corteza de *Cinchona spp* tienen quinina como su constituyente central, conocido desde 1630 por sus propiedades antimaláricas. Todos los alcaloides contienen nitrógeno, el cual forma parte de un anillo heterocíclico y son básicos en la naturaleza. La gran distribución de estos compuestos en todas las partes de las plantas ha estimulado la búsqueda de funcionalidad metabólica. Estos compuestos ofrecen protección contra depredadores, actúan como reguladores del crecimiento, mantienen el balance iónico, como reserva de nitrógeno y posiblemente sirven como productos de excreción.¹¹

D) Otros

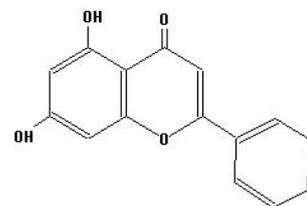
En muchos fitoquímicos no mencionados anteriormente se ha encontrado que ejercen propiedades antimicrobianas las cumarinas por ejemplo, son sustancias fenólicas hechas de un benceno fusionado con anillos pirrólicos ellas son responsables del olor característico del heno, al menos 1300 fitoquímicos han sido identificados. Su fama procede de actividad antitrombótica, antiinflamatoria y vasodilatadora. La warfarina es un representante de este grupo. Las lecitinas y polipéptidos, los péptidos que eran inhibidores de microorganismos fueron primeramente reportados en 1942, ellos están cargados positivamente y contienen enlaces disulfuro su mecanismo de acción puede ser la formación de canales iónicos en la membrana microbiana.¹



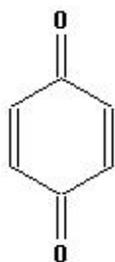
Flavona



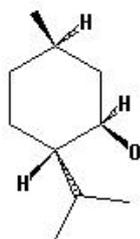
Berberine



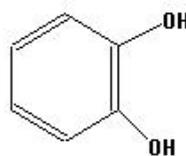
Crisina



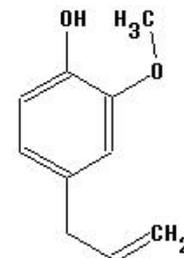
Quinona



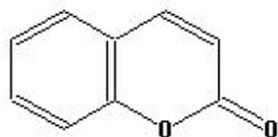
Mentol



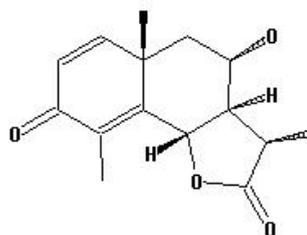
Catechol



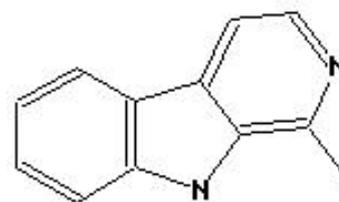
Eugenol



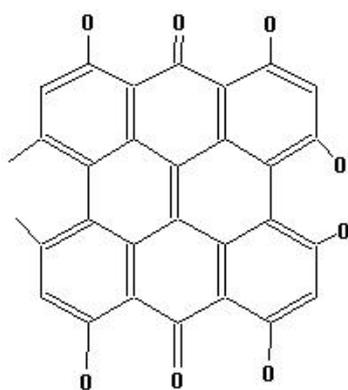
Cumarina



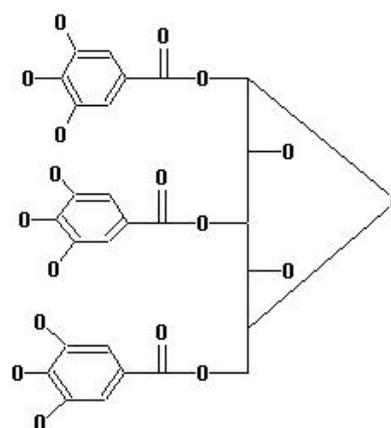
Artemisina



Harmane



Hipericina



Acido tánico

Figura 1. Estructura de antimicrobianos comunes obtenidos de plantas

Cowan, 1999.

DESCUBRIMIENTOS RECIENTES

La búsqueda de drogas basada en objetivos moleculares generó la idea de producir una enorme cantidad de compuestos que satisficieran las necesidades de salud. La química combinatoria que fue desarrollada hace unos 20 años, se imaginó como respuesta a la demanda de nuevas drogas, inicialmente enfocada en la síntesis de péptidos y oligonucleótidos y ahora en síntesis de drogas de estructuras moleculares pequeñas. En consecuencia, muchas compañías farmacéuticas han desestimado la búsqueda de productos naturales a favor de la química combinatoria, sin duda con la expectativa de conseguir grandes recompensas en cuanto a una gran cantidad de drogas novedosas y los resultantes ingresos inesperados. La expectativa en productividad no ha sido materializada y el número de Nuevas Sustancias Activas (NASs), también conocidas como Nuevas Entidades Químicas (NCEs) han sido menores de lo esperado en 20 años y sigue disminuyendo. La Administración para Alimentos y Drogas (FDA) de Estados Unidos recibió 16 aplicaciones nuevas de drogas en 2001 las cuales fueron menores a las 24 del año anterior.

Aparentemente a partir de la inspección de tipos de estructuras involucrados en la terapia antiinfectiva, particularmente en área antibacterial, si bien dos tipos de estructuras aparentemente nuevas fueron aprobadas, una en 1999 (dalfopristina/quinupristina; Synercid) y otra en 2000 (linezolid; Zyvox), si uno determina su procedencia estructural, entonces los primeros dos son derivados de antibióticos ya conocidos, las pristamicinas/estafilomicinas, las cuales se emplearon en suplementos alimenticios de animales y el otro es herencia de trabajos reportados por DuPont a mediados de los 80's.

Uno puede añadir que Pharmacia hizo un elegante trabajo de combinación al modificar las estructuras de DuPont para crear linezolid. Aunque la estructura base de ésta NCE no ha sido expuesta clínicamente, un gran número de reportes han remarcado la significativa resistencia a esta droga una situación que recuerda a las primeras beta lactamas. Todos los otros antibacterianos reportados son modificaciones de las estructuras ya existentes.

Nicolaou y colaboradores han demostrado algunos avances muy interesantes con modificaciones estructurales con actividades antibióticas significativas contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina y también contra *Enterococcus* resistentes a vancomicina y Synercid.

La World Health Organization (WHO) estima que el 80 % de 5200 millones de personas que viven en países en vías de desarrollo derivan su atención primaria a la medicina tradicional.

En 1980 el consumidor pagó cerca de ocho billones de dólares por prescripción médica en los cuales el principio activo fue derivado de plantas, se estima que el mercado de drogas derivadas de plantas se incrementará gradualmente durante los años siguientes.

Durante décadas, los productos naturales han sido un paraíso en las primicias de drogas según un estudio reciente, 61% de 877 nuevas entidades químicas introducidas como drogas en el mundo durante el periodo de 1981-2002 fueron inspiradas por los productos naturales.¹²

Éstos incluyen los productos naturales (6%), los derivados de productos naturales (27%), compuestos sintéticos basados en el conocimiento generado por algún producto natural (5%).¹³

En ciertas áreas terapéuticas, la productividad es más alta: 78% de antibacteriales y 74% de compuestos anticancerígenos son productos naturales o se han derivado de un producto natural. Estos números no son sorprendentes si es supuesto que los productos naturales evolucionaron para la autodefensa.

Entre 1981-2002 se han aprobado 90 antibacterianos de los cuales 9 fueron productos naturales, 61 derivados de productos naturales, 19 totalmente sintéticos y uno se obtuvo por síntesis química pero la estructura precursora fue de un producto natural.¹²

Tabla 1. Antiinfectivos desde 1981 hasta 2002 y su fuente.

Newman, 2003

Indicación	Total	N	ND	S	S*
Antibacterianos	90	9	61	19	1
Antifúngicos	23		2	18	
Antiparasitarios	13	2	5	4	2
Antivirales	33		1	7	17
Total	159	11	69	48	19
Porcentaje	100.0	6.9	43.4	30.2	12.0

N = Producto natural.

ND = Derivado de un producto natural y es usualmente una modificación semisintética.

S = Droga totalmente sintética.

S* = Hecha por síntesis, pero el fármaco fue de un producto natural

GÉNERO *TEPHROSIA*

A) Distribución geográfica

El género *Tephrosia* se encuentra en todos los continentes, con excepción de Europa, que no cuenta con especie alguna.

Se encuentra ampliamente distribuido en regiones tropicales, desde 0 hasta 2,700 m de altura, aunque son más abundantes entre los 300 y hasta los 1,500 m de altitud. En México se encuentran aproximadamente 50 especies, ubicadas principalmente en las costas del Pacífico y del Golfo de México, aunque se les puede encontrar desde el estado de Baja California Sur, pasando por los estados de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero, Oaxaca, parte de Chiapas, así como Nuevo León.¹⁴

La especie *T. crassifolia* se encuentra en los estados siguientes:

- Guerrero
- Jalisco
- Nayarit
- Oaxaca
- Sinaloa

B) Taxonomía

La familia *Fabaceae* se caracteriza por agrupar plantas que son en su mayoría de clima templado, aunque también hay de clima cálido, situación que se ejemplifica con cultivos hortícolas de estación fría como arveja y haba, y de estación cálida como poroto y soya verde. Son plantas moderadamente tolerantes a acidez y poco tolerantes a la salinidad del suelo.

La literatura se presenta confusa con respecto a la denominación de la familia, ya que varios autores utilizan el nombre *Fabaceae* como sinónimo de *Leguminosae*, familia taxonómica antigua que incluía las sub-familias *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Esta subdivisión fue hecha en base a las diferencias morfológicas que presentan en su estructura floral los distintos géneros. Hoy en día es más aceptado referirse a dichos grupos como familias individuales del orden Leguminales: *Caesalpinaceae*, *Mimosaceae* y *Fabaceae*, este último nombre en reemplazo de *Papilionaceae*. Es necesario establecer entonces que el nombre *Fabaceae* sólo se utilizará para referirse a este último grupo de plantas. A pesar de estas adecuaciones taxonómicas realizadas hace varios años, por uso y costumbre, se continúa hablando de leguminosas de grano y leguminosas hortícolas en el medio vernáculo.¹⁵

Tabla 2. Taxonomía de la planta en estudio

Gómez, 2001

Reino	<i>Plantae</i>
Filo	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Fabales/Leguminosae</i>
Familia	<i>Fabaceae/Papilionaceae</i>
Género	<i>Tephrosia</i>
Especie	<i>Crassifolia</i> (Bent)/ <i>smithyae</i> (McVaugh)

C) Uso en medicina tradicional

La importancia en la medicina tradicional de *Tephrosia* es reconocida desde hace mucho tiempo, un número considerable de especies de este género fue descrito en décadas pasadas en diversas partes del mundo como útiles para varios fines.

En la zona del Caribe se emplean *T. multifolia* y *T. cinerea* como febrífugos, purgantes, para contracciones nerviosas, enfermedades cutáneas y venéreas, *T. tenella* y *T. pupurea*

son usadas en América y Asia contra la elefantiasis, erupciones de la piel, afecciones renales y hepáticas, para la indigestión y la tos, *T. senna* del Caribe como purgante, *T. apollinea* en Israel para aliviar cólicos.¹⁹

D) Metabolitos aislados

El estudio fotoquímico del género *Tephrosia* demuestra la presencia de numerosos compuestos entre los cuales se encuentran, principalmente, flavonoides y rotenoides, así como pterocarpanos, esteroides y triterpenos.

Tiempo atrás algunas especies de este género han sido explotadas industrialmente para la obtención de rotenoides y compuestos relacionados para la fabricación de insecticidas no tóxicos para mamíferos.

Recientemente algunas especies de *Tephrosia* fueron analizadas químicamente, reportando la presencia de rotenoides y flavonoides relacionados en: *T. carrolli*, *T. cinerea*, *T. abbotiae*, *T. pringlei*, *T. nitens*, *T. watsoniana* y *T. sinapou*, que ubican al género como fuente potencial para la obtención de metabolitos. Los rotenoides son compuestos isoflavonoides de gran interés por sus propiedades biológicas, que se encuentran principalmente en varias plantas pertenecientes a la familia Papilionidae.

Entre los 59 rotenoides descritos hasta la fecha algunos de ellos, se caracterizan por su alta actividad insecticida y piscicida, así como por su reducida toxicidad en mamíferos.

Con respecto a los flavonoides encontrados en las especies mexicanas es interesante señalar que estos generalmente se encuentran prenilados en posición C-8 del núcleo base, pudiendo encontrarse como grupo prenilo o en forma cíclica hacia la posición C-7 para originar un furano sustituido o un dimetil-cromeno con diferentes grados de oxidación.

En la especie *T. crassifolia* se encuentran los siguientes compuestos:

- Abbotina
- Crassichalcona
- Crassifolina
- Hildgartol
- Metil glabranina
- Metil hildgartol
- Metil obovatina
- Oaxacacina
- Sacarosa
- Sitosterol
- Stigmasterol
- Tephromicrocarpanona
- Tephrowatsina B

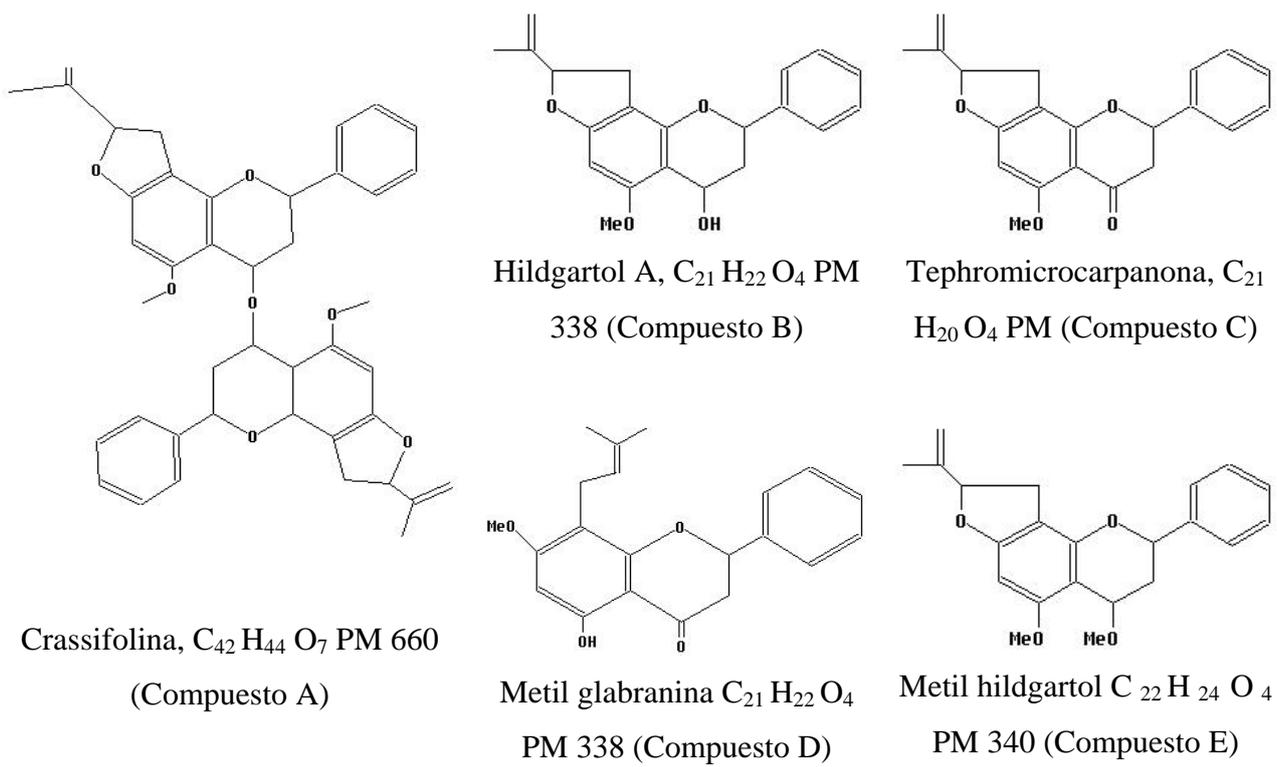


Figura 2. Flavonoides aislados de *Tephrosia crassifolia*.
Gómez, 2001

BREVE HISTORIA DE LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos han sido reconocidos como el descubrimiento más importante de la medicina, un detalle interesante es que su descubrimiento fue anterior al establecimiento de muchas de las culturas actuales, por otro lado los antibióticos fueron empleados aún antes de ser descubiertos, antiguos documentos reportan la aplicación de prendas impregnadas con sustancias naturales para ayudar a sanar, antropólogos han descubierto trazas de tetraciclina en momias de Nubia de miles de años de antigüedad.

La quimioterapia moderna se presenta en tres eras:

La primera de 1600 a 1900, que involucra el uso de la corteza de la *Chinchona spp* en el tratamiento de la malaria. La quinina que es el ingrediente activo fue aislada hasta 1820.

La segunda (la era sintética) al principio de 1900, en la cual se sintetizaron varias sustancias que se emplean en el tratamiento de infecciones bacterianas, la primera sustancia sintetizada fue la piocianina, un pigmento azul producido por *Pseudomonas aeruginosa*, la cual reduce el crecimiento de otras bacterias *in vitro*, cuando se ha empleado *in vivo* se ha encontrado inestable y tóxica; problemas semejantes se han encontrado con el Salvarsan, usado en el tratamiento de la sífilis, y el Prontosil, activo contra estreptococos *in vitro*.

La tercera era, (1940 - actualidad) posiblemente el evento más importante en el descubrimiento de los antibióticos sucedió alrededor de 1940 cuando Florey y su equipo descubrieron su potencialidad. Aunque Alexander Fleming descubrió la penicilina en 1929, fue hasta 1940 cuando Florey y su equipo descubrieron su potencialidad, ésta al principio llamada “droga milagrosa” era tan escasa que la penicilina tenía que ser reextraída de la orina para su uso subsiguiente, al principio, en la era de los antibióticos, este valioso agente era fácilmente disponible al público en diferentes preparaciones incluyendo, cremas nasales, jarabes e incluso cremas cosméticas. Para 1955 la mayoría de los países restringieron su empleo solo por prescripción médica, pero su uso masivo ya había ocurrido, lo que llevó a la resistencia generalizada. Una respuesta a esta resistencia vino con la meticilina al principio de 1960 esta penicilina semisintética no

era vulnerable a las enzimas bacterianas que degradaban a la penicilina. Otros antibióticos derivados salieron al mercado pero este avance fue sobrepasado por la resistencia bacteriana a todos los antibióticos disponibles.

Hoy en día las mayores causas de mortalidad en las culturas occidentales son: enfermedades cardiovasculares, cáncer, desordenes nerviosos, e infecciones microbiológicas. En los pueblos indígenas, donde la vida es diferente, otras enfermedades los aquejan, como los son, diarrea, complicaciones en el parto e inflamaciones son considerados como los más importantes para sobrevivir. El papel que desempeñan las enfermedades bacterianas en estas culturas no puede ser sobreestimado.

Es solo hasta cerca de 1940 que hemos visto la presencia y producción exponencial de antibióticos y la necesidad de nuevas formulaciones continúa pero a paso más lento. Los descubrimientos de nuevas drogas se presentan solo con pequeñas modificaciones estructurales de los ya existentes, pero nuevas iniciativas para hallar realmente antibióticos novedosos son necesarias y ésta es la meta para el nuevo milenio.

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

El abuso de drogas usualmente nos trae a la mente imágenes de personas de bajos recursos, sucias, en la calle o de jóvenes ricos en fiestas. El uso de heroína, cocaína, marihuana e incluso antidepresivos es considerado como antisocial. Recientemente el uso de la eritropoyetina en los atletas se ha considerado como elemento para descalificarlos y suspenderlos de sus competencias.

La mayoría de nosotros estamos de acuerdo con que usamos demasiado las drogas para que nos ayuden a disminuir o incrementar el apetito, controlar la depresión y el estrés y en general hacer nuestra vida más soportable. Pero solo algunos de nosotros consideramos la sobre utilización de lo antibióticos como un abuso. El abuso de estos compuestos puede representar aún mayores consecuencias mundiales para ambos tanto humanos como animales que todos los narcóticos empleados.

Casi desde el inicio de la era de los antibióticos, la resistencia ha sido el mayor de los obstáculos para el tratamiento exitoso, difícilmente cualquier grupo de antibióticos que ha sido introducido no presenta resistencia bacteriana. La resistencia bacteriana ha sido minimizada como problema simplemente por que no es conocido o no es reconocido, antes de 1970 se creía que el problema de las infecciones bacterianas estaba resuelto. Al mismo tiempo que se pensaba esto, *Staphylococcus aureus* presentó resistencia a la bencilpenicilina y a la meticilina, solo quedó la gentamicina para su tratamiento.¹⁶

Al inicio del nuevo siglo las cosas se ven muy diferentes. Ya al menos tres especies bacterianas capaces de causar enfermedades que comprometen la vida (*Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Pseudomonas aeruginosa*) presentan resistencia a mas de 100 antibióticos disponibles excepto por la vancomicina. La vancomicina es el antibiótico de última opción para el tratamiento de infecciones resistentes, en los últimos años se han encontrado cepas de *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* que son resistentes a este antibiótico. Con la presencia de estos reportes y los nuevos casos que aparecen continuamente, una uña enterrada, una cortada o una herida podrían causar la muerte. Lo que está pasando es que alrededor de un tercio de los antibióticos recetados son innecesarios.¹⁷

Aunque el descubrimiento de antibióticos ha sido exponencial desde 1940, no se han descubierto nuevas drogas después de 1961 y todas las drogas que han sido lanzadas al mercado desde la década de 1960 son modificaciones de los antibióticos que ya existían.

Esto significa que las bacterias que aprendieron como resistir un miembro de una clase química de antibióticos no han tenido que aprender mucho al hacerse una modificación de los mismos.¹⁸ La introducción de la síntesis orgánica permitió el incremento del uso de los antibióticos, que fue acompañado de un incremento en la resistencia estafilocócica a la meticilina y enterocócica a la vancomicina.¹²

Reportes recientes han mostrado un incremento de la resistencia bacteriana de bacterias que infectan a la comida causada por el uso irracional de antibióticos como conservadores. Otro tópico de la resistencia recae en el uso de genes resistentes como marcadores en organismos genéticamente modificados (GMOs). El problema radica cuando los GMOs son introducidos al ambiente.

Hay dos campos de trabajo el día de hoy, el hospital y la comunidad, los cuales no están separados. Los pacientes han sido descargados desde el hospital a su comunidad y aquellos con infecciones comunes han sido hospitalizados. La facilidad de trasladarse de los organismos resistentes a diferentes lugares hace de esto un problema global. Como resultado de este problema creciente y peligroso, el Centro de Control de Enfermedades (CDC), la Organización Mundial de Salud (WHO)¹⁹ y los grupos de salud locales han iniciado programas de vigilancia. Algunos de estos programas han venido monitoreando la resistencia por décadas y muchas compañías farmacéuticas han apoyado programas internacionales de vigilancia. A pesar de estos esfuerzos es evidente que es necesaria mayor atención.¹⁷

Uno de los grupos bacterianos más grandes es el que comprende la familia de Enterobacteriaceae, misma que contiene más de 120 especies. Las que están agrupadas en géneros entre ellos los más patógenos incluyen *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*.

También incluye *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*. Estos miembros han sido encontrados en diferentes ubicaciones y han sido asociados con prácticamente

todo tipo de infecciones, abscesos, neumonía, meningitis, septicemia y otro tipo de infecciones locales en conjunto estos organismos son responsables de una sexta parte de las infecciones nosocomiales. Internacionalmente estos organismos han causado erupciones hospitalarias significativas en Francia, Alemania, Australia, Reino Unido, Grecia, Túnez y Estados Unidos.

Tabla 3. Susceptibilidad antimicrobiana (%) de patógenos nosocomiales
Wise, 1998

Agente antimicrobiano	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cloacae</i>
Cefuroxima	95	91	77	59
Ceftazidima	96	92	81	77
Cefotoxima	98	89	77	67
Ceftriaxona	97	96	75	77
Pipercilina-tazobactama	95	87	74	77
Imipenem	97	98	95	97
Gentamicina	97	95	97	96
Ciprofloxacina	96	88	88	93

La producción de beta-lactamasas por microorganismos de la familia Enterobacteriaceae ha sido reconocida por años desde 1970, la resistencia a los beta-lactamicos, trimetroprima-sulfametoxazol (TMP/SMX) y a los aminoglucósidos, ha causado erupciones de infecciones nosocomiales. Desde 1980 salen al mercado agentes de amplio espectro, los que incluían cefalosporinas de segunda y tercera generación y las aminopenicilinas.

Pronto fue evidente que en estos organismos evolucionaron sus propias beta-lactamasas en respuesta a la presión ambiental y esas enzimas son conocidas como beta-lactamasas de amplio espectro (ESBLs). Estas enzimas pronto inactivaron agentes como la cefoxitina, estas ESBLs destruyen más a la segunda y tercera generación de cefalosporinas pero también tienen actividad contra diversos agentes como ácido clavulánico, tazobactama, y sulbactama. Esta resistencia puede incluir resistencia a otros antibióticos (ver tabla 3).²⁰

Esta habilidad para crear nuevas mutaciones y enzimas inactivadoras de beta-lactámicos dan a estos organismos un escudo protector bajo el cual pueden causar significativa morbilidad y mortandad.

Hasta el momento se han identificado varios mecanismos por los cuales las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos y comprenden: la inhibición dependiente de enzimas, la modificación de la permeabilidad de la pared bacteriana, la extracción del antibiótico, la alteración de los sistemas de transporte, la modificación del blanco ribosomal y el cambio en la estructura de las proteínas "blanco" (tanto en el citoplasma bacteriano, como a nivel de la pared).

Hay muchas pruebas que avalan la posición de que el consumo total de antimicrobianos es el elemento fundamental de la selección de la resistencia. No obstante, la relación entre uso y resistencia no constituye una simple correlación, ya que, en particular, poco se conoce sobre la contribución relativa del modo de empleo (dosis, duración del tratamiento, vía de administración, intervalo entre dosis) en comparación con la del consumo total. Paradójicamente, el uso insuficiente debido a falta de acceso, dosis inadecuadas, incumplimiento o productos de mala calidad pueden ser tan importantes en cuanto a la resistencia como el uso excesivo. Sin embargo, no se discute que el uso inadecuado de antimicrobianos no da los resultados terapéuticos esperados y se asocia con la generación de resistencia. Por las razones anteriores, el mejorar el uso de estos fármacos debe ser una prioridad si se ha de controlar la aparición y diseminación de la resistencia.

Entre los fármacos que se falsifican con más frecuencia se encuentran los antimicrobianos.²¹ El uso de medicamentos falsificados puede tener repercusiones clínicas graves en cuanto a fracasos de tratamiento y prolongación de la enfermedad e incluso, aumento del sufrimiento. La aplicación de medidas concertadas para reducir la distribución de medicamentos falsificados sobrepasa el alcance de este documento y requiere que se ponga en marcha otro conjunto de intervenciones. Las autoridades nacionales e internacionales deberán colaborar para garantizar la aplicación de las leyes pertinentes.

Solo recientemente se ha comenzado a ver la resistencia como un tema de importancia para la sociedad y, desde el punto de vista económico, como un elemento negativo externo al ámbito sanitario. La decisión individual de tomar fármacos antimicrobianos (ya sea decisión del consumidor o de este con la persona que le receta el medicamento) a menudo hace caso omiso de la posición de la sociedad y del servicio de salud. La aparición implacable de la resistencia a los antimicrobianos afecta el costo de la atención de la salud en todo el mundo. Asimismo, la pérdida de eficacia de ciertos tratamientos por causa de la resistencia a los antimicrobianos aumenta el sufrimiento humano, contribuye a la pérdida de productividad y, a menudo, a la mortalidad. Si bien la información sobre el costo de la resistencia es escasa,²² hay cada vez más consenso sobre los siguientes puntos:

- En muchas regiones, es tan alta la tasa de prevalencia de la resistencia a los fármacos que se encuentran más al alcance de la mano y son más baratos, que la eficacia clínica de tales medicamentos ya es limitada. Esto presenta decisiones difíciles. Por un lado, se puede gastar el dinero en fármacos baratos pero ineficaces. Por otro, se podría utilizar medicamentos más eficaces y más caros para dar tratamiento a una fracción de la población que lo necesita. La tercera opción es aumentar el gasto en atención de la salud.
- Cuando el tratamiento no es eficaz, suben los costos, debido a que se prolonga la enfermedad y aumenta la frecuencia y el período de las hospitalizaciones. Además, los agentes patógenos resistentes presentes en el ámbito hospitalario generan infecciones nosocomiales, el control de las cuales es caro y su erradicación, extremadamente difícil.
- La utilización de fármacos antimicrobianos fuera del ámbito de la medicina humana también tiene repercusiones en la salud de las personas. La prevalencia de microorganismos resistentes entre animales destinados al consumo humano tiene graves consecuencias de índole financiera, tanto para el productor agropecuario como para el consumidor. Los agentes patógenos resistentes presentes en algunos productos alimentarios, especialmente en la carne, pueden causar infecciones humanas cuyo tratamiento es difícil. A esto se suma la pérdida de confianza del público en la inocuidad de los alimentos, que afecta la demanda de tales productos y tiene consecuencias potenciales graves para el sector agropecuario.

Si bien algunos estudios han dado indicación de que es posible reemplazar los clones resistentes con otros susceptibles,^{23, 24} por lo general la resistencia toma mucho tiempo en revertir; también puede ser irreversible. Lo anterior es una indicación de la necesidad de poner tempranamente en práctica intervenciones para detener el desarrollo de resistencia, antes de que se convierta en problema. Cuanto antes se tomen estas medidas, más tardará en surgir y avanzar la resistencia. Así, habrá que intervenir antes de que aumente la prevalencia de las infecciones resistentes, y tomar decisiones mientras aún sea bajo el número de individuos afectados por ese tipo de infección. La resistencia a los antibióticos recién se está empezando a ver como una preocupación de la sociedad y, desde el punto de vista económico, como un elemento negativo.^{25, 26}

MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS PARA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

El método más ampliamente empleado para la rutina clínica es la técnica de dilución en agar. Este facilita el reporte de la susceptibilidad del microorganismo en tres categorías: (S) Susceptible, (I) Intermedio y (R) Resistente.

Una mejor medida de la susceptibilidad antimicrobiana es por la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), esta definida como la concentración más baja (expresada en mg/L) que inhibe el crecimiento microbiano.

Los métodos predominantes para la determinación de CMI son:²⁷

- **Técnica de dilución en tubo.**
- **Técnica de microdilución en placa de microtitulación.**
- **Técnica de dilución en agar.**
- **Técnica de difusión en placa.**
- **E-Test.**

Técnica de dilución en tubo

(Prueba de susceptibilidad por macrodilución en caldo)

En el método de dilución en tubo se utilizan una serie de tubos que contienen un medio de cultivo estéril y varias concentraciones de cada uno de los antibióticos que se van a ensayar. Todos los tubos se inoculan con el microorganismo que va a ser ensayado y se incuban a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo.

Posteriormente se examinan los tubos para determinar en cuáles de ellos se ha inhibido el crecimiento del microorganismo. También se calcula la CMI. Aquellos antibióticos que tengan la CMI más baja deberán ser los que tengan la mayor actividad antimicrobiana frente al patógeno.

Técnica de microdilución en placa de microtitulación

La prueba de microdilución es una adaptación de la prueba macroscópica de referencia. Puede probarse con facilidad gran número de aislamientos contra múltiples drogas, de modo que el procedimiento está bien adaptado al uso de rutina. Esta prueba suministra más información cuantitativa, que puede ser útil en ciertas circunstancias, que la prueba de difusión en discos de referencia. Puede emplearse en microplacas de 80, 96 o más pozos dependiendo del número y concentración de los antimicrobianos incluidos en la prueba.

La ventaja de este sistema es que emplea volúmenes pequeños de reactivos y permite un que un gran número de bacterias sean probadas, relativamente rápido y barato además de que se desechan menos residuos biológico infecciosos.

La desventaja principal es que microorganismos de especies fastidiosas no crecen en este sistema.

Técnica de dilución en agar

(Prueba de susceptibilidad por dilución en agar)

El procedimiento de dilución en agar, que es el segundo método de referencia, ha sido exitosamente adaptado para uso de rutina en los grandes laboratorios mediante la prueba de concentraciones seleccionadas de antibióticos. Se inocula una suspensión normalizada de bacterias en una serie de placas de agar, cada una con diferentes concentraciones de antibióticos, incluyendo el rango terapéutico de la droga.

Técnica de difusión en placa

(Prueba de susceptibilidad por difusión en discos o Kirby-Bauer)

En este método se incuba el microorganismo en una placa Petri con medio de cultivo solidificado sobre la que se añaden discos de papel impregnados con una cantidad conocida de antibiótico. Después de la incubación se observan en la placa la presencia de zonas claras alrededor de los discos llamadas halos de inhibición. La ausencia de un halo significa que el microorganismo es resistente al antibiótico. Por el contrario y por regla general, cuanto mayor es el halo más efectivo es el antibiótico.

Este método se puede utilizar también para determinar la CMI al utilizar discos con distintas concentraciones de un mismo antibiótico.²⁸

1.6.5. E-Test

El E-Test es un método novedoso para la cuantificación directa de la susceptibilidad antimicrobiana empleando el método de difusión en agar. Se emplea una tira plástica de 50 x 5 mm, en el cual en un lado hay una escala exponencial continua y en el otro lado hay una escala de CMI (mg/L). Cuando la tira es aplicada a la superficie de la placa, inoculada con el microorganismo a probar, el cual ha sido colocado previamente.

Después de una incubación adecuada, una zona elíptica de inhibición es producida y la CMI es leída en donde la zona de inhibición intercepta la tira. La ventaja de este método es que se prepara rápido.²⁹

Los factores que deben ser controlados bajo rigurosa estandarización son:

- Pureza y densidad del inóculo bacteriano.
- Condiciones de la incubación (temperatura y tiempo).
- Composición del medio de cultivo.

Recomendaciones detalladas son publicadas periódicamente en diferentes partes del mundo:

- En Estados Unidos de América: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) empleada globalmente, visitar: <http://www.nccls.org/>
- En Francia: Comité de L`Antibiogramme de la Société Francaise de Microbiologie (CA-SFM, Clinical Microbiology and Infection, 1996, 2 Suppl1, French Susceptibility Committee)
- En Dinamarca: Deutsches Institute für Normung e.V.
- En Alemania y Suiza: DIN 58940 Medizinische Mikrobiologie, visitar <http://www.din.de/>.
- En Gran Bretaña: British Society of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (BSAC). BSAC Disc Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing, visitar. <http://www.bsac.org.uk/>.
- En Europa: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), visitar www.esamid.org/

La calidad de los organismos estándar debe ser evaluada a la par con el ensayo para validar los resultados.

FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO

Entre los factores que pueden afectar la actividad antimicrobiana in vitro, deben considerarse, ya que influyen significativamente en el resultado de las pruebas los siguientes:

pH del medio

Algunos medicamentos son más activos a pH ácido (por ejemplo, nitrofurantoína); otros a pH alcalino (por ejemplo, aminoglucósidos, sulfonamidas).

Componentes del medio

El sulfonato de polianetol sódico y otros detergentes aniónicos inhiben a los aminoglucósidos de manera notoria. El PABA en extractos tisulares antagoniza a las sulfanamidas. Las proteínas séricas fijan a las penicilinas en grado variable, yendo desde 40 % para meticilina hasta 98 % para la dicloxacina. La adición de NaCl al medio aumenta la detección de la resistencia a la meticilina en *S. aureus*.

Estabilidad del fármaco

A temperatura de incubación, varios agentes antimicrobianos pierden su actividad. La clortetraciclina es inactivada rápido y las penicilinas de modo más lento, mientras que los aminoglucósidos, el cloramfenicol y la ciprofloxacina son considerablemente estables durante periodos prolongados.

Tamaño del inóculo

En general cuanto más grande sea el inóculo bacteriano, más baja será la sensibilidad aparente del microorganismo.

Duración de la incubación

En muchos casos, los microorganismos no mueren cuando se exponen un tiempo corto a los agentes antimicrobianos, sino que solo se inhibe su multiplicación.

Actividad metabólica de los microorganismos

En general, los microorganismos que tienen crecimiento rápido y activo son más sensibles a la acción de los medicamentos, que aquellos que se encuentran en fase de reposo.²⁸

ASPECTOS CUANTITATIVOS

Clínicamente, los exámenes de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro* son empleados como guía para determinar la quimioterapia antimicrobiana, aunque la susceptibilidad de un patógeno es impredecible.

Tabla 4 Rangos aceptables de CMI (mg/L) para cepas utilizadas en el control de los antibiogramas realizados mediante técnicas de dilución.

Picazo, 2000.

Antibiótico	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Amikacina	1-4	64-256	0.5-4	1-4
Ampicilina	0.5-2	0.5-2	2-8	-
Azitromicina	0.25-2	-	-	-
Cafaclor	1.4	-	1-4	-
Cefazolina	0.25-1		1-4	-
Cefuroxima	0.5-2		2-8	-
Cloranfenicol	2-8	4-16	2-8	-
Claritromicina	0.12-0.5	-	-	-
Eritromicina	0.25-1	1-4	-	-
Gentamicina	0.12-1	4-16	0.25-1	0.5-2
Lomefloxacina	0.25-2	2-8	0.03-0.12	1-4
Meticilina	0.5-2	>16	-	-
Ofloxacina	0.12-1	1-4	0.015-0.12	1-8
Penicilina G	0.25-1	1-4	-	-
Teicoplanina	0.25-1	0.06-0.25	-	-
Tetraciclina	0.25-1	8-32	0.5-2	8-32
Vancomicina	0.5-2	1-4	-	-
Trimetroprima	1-4	<1	0.5-2	>64

La CMI no representa un valor absoluto, incluso bajo las mejores condiciones un examen de dilución no mostrará el mismo punto final cada vez que sea repetido pero da una indicación de la cantidad de antimicrobiano que al alcanzar el lugar de infección inhibirá al organismo. La tabla 4 da una indicación de los valores de CMI de diferentes antibióticos para cuatro diferentes bacterias.²⁹

SALES DE TETRAZOLIO

S DE TETRAZOLIO

INDICADORES COLORIDOS ALTAMENTE SENSIBLES DE REACCIONES ENZIMÁTICAS DE OXIDO REDUCCIÓN

USOS

Frecuentemente se usan las sales de Tetrazolio como indicadores coloridos para la detección de sistemas enzimáticos en donde se forman los equivalentes. Comparado con el ensayo en UV de NAD(P)H, los métodos basados en sales de tetrazolio ofrecen una sensibilidad más alta con un equipo más simple.

ORIGEN

Las sales de tetrazolio usadas en la bioquímica y biología celular son principalmente derivados aromáticos de 1, 2, 3, 4-Tetrazol (sustituídos en posición 2, 3, y 5). Además de las sales de monotetrazolio hay también compuestos ditetrazolicos conformados por dos anillos de tetrazolio unidos por un grupo difenil.

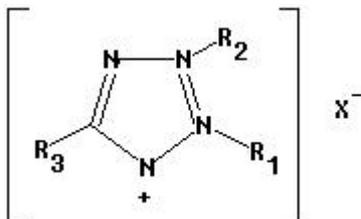


Figura 3. Monotetrazolio

SOLUBILIDAD EN AGUA

Las sales de tetrazolio solubles en agua son amarillentas y forman en su reducción pigmentos altamente coloridos conocidos como formazanes: Los monoformazanes cambian de amarillo a rojo, mientras los diformazanes son normalmente azules y cambian a negro.

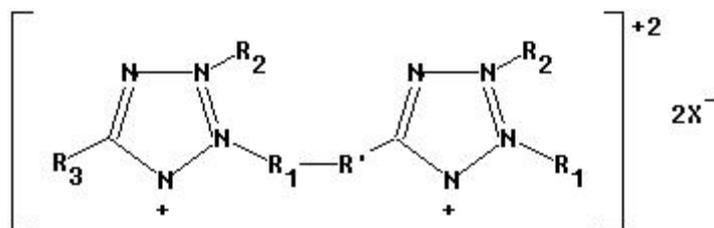


Figura 4. Ditetrazolio

Los formazanes de la mayoría de las sales del tetrazolio (por ejemplo MTT, INT, NBT o TNBT) son ligeramente solubles en agua, mientras XTT, WST 1, WST 3 y WST 4 forman formazanes muy solubles en agua lo que habilita una determinación cuantitativa más conveniente, en muchas aplicaciones.

REACCIÓN

La deshidrogenasa toma un hidrogeno del sustrato y éste es transferido a un aceptor usualmente una co-enzima NAD (P) H.³² A partir de la co-enzima se transfiere a la sal de tetrazolio, que es reducido a su insoluble y colorido formazan.

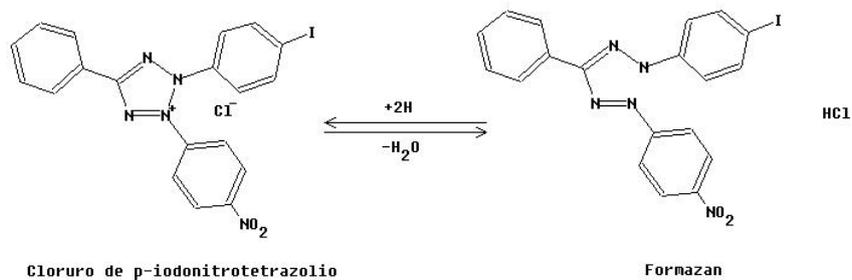


Figura 5. Reacción de formación de Formazan

APLICACIONES

Básicamente, se usan las sales de tetrazolio para la detección de actividad de la deshidrogenasa o cualquier otro sistema enzimático dónde se generan equivalentes redox, debido a este rasgo, son una herramienta académica sumamente útil, en la investigación clínica, así como para muchas aplicaciones de diagnóstico, por ejemplo:

Ayuda en investigación de cáncer, biología celular y molecular:

Para probar proliferación y viabilidad de la célula así como para las pruebas de citotoxicidad.^{33, 34, 35}

Diagnósticos enzimáticos y química clínica:

Para el ensayo de actividad de la deshidrogenasa y otros sistemas enzimáticos que forman equivalentes redox; para la determinación de concentraciones de sustrato de deshidrogenasa; para la detección de glucosa, etanol, glicerol y otros sustratos que desarrollan los equivalentes redox en una reacción acoplada.

Inmuno-histoquímica:

Para la detección de fosfatasa alcalina.

Histología y patología:

Para la detección histoquímica de la deshidrogenasa.

En los graneros:

Para probar la viabilidad de las semillas.³⁶

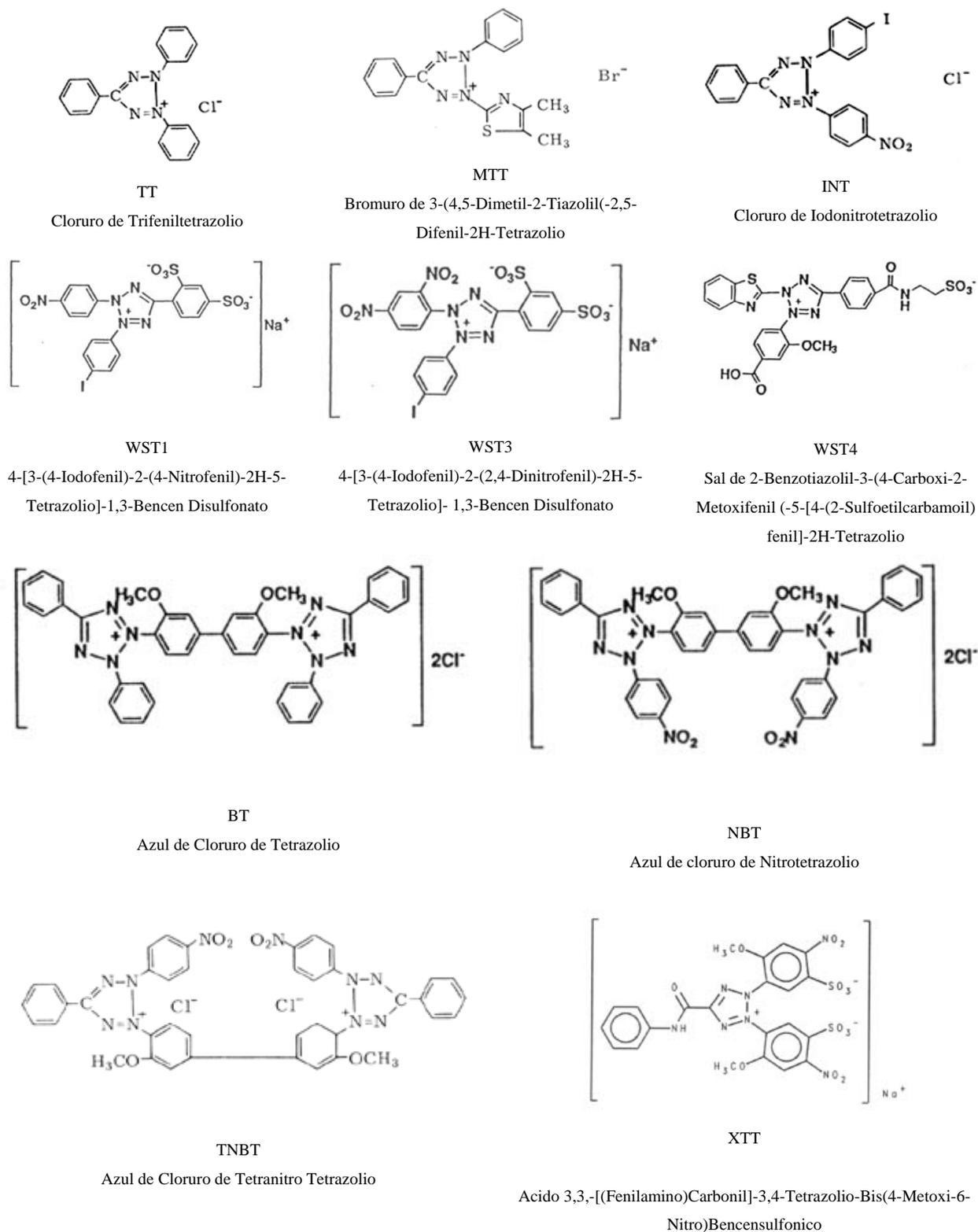


Figura 6. Ejemplos de las principales sales de tetrazolio

Serva, 2005

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde el principio de la era antibiótica los fenómenos de resistencia a estas sustancias han sido descritos. Cabe destacar la importancia inicial de cepas de *Staphylococcus aureus* capaces de degradar la penicilina y la posterior aparición de esta misma bacteria con resistencia a la meticilina. Inicialmente el problema fue resuelto con el descubrimiento o síntesis de nuevas sustancias que eran capaces de controlar las bacterias con este fenómeno, y aparecen medicamentos como los aminoglucósidos, macrólidos, glicopéptidos, entre otros. Sin embargo, esto no es suficiente y cada vez aparecen nuevos mecanismos que son difíciles de controlar por estos medicamentos. Se ha encontrado que la prevalencia de organismos patógenos humanos resistentes a los antibióticos es cada vez mayor, pero el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos que controlen éstos es mucho más lento. Son varias razones las que explican este hecho: costo de la síntesis hasta el mercadeo del medicamento (US \$100 millones a US \$350 millones); falta de nuevos blancos para la acción de los antibióticos, entre otras.

En una crisis como esta donde nos enfrentamos desesperadamente a la necesidad de antimicrobianos novedosos los cuales no generen resistencia, parece lógico voltear a los productos que proporciona la naturaleza. Los secretos para su éxito han sido revelados por siglos a partir de diversas fuentes. Se calcula que 58 % de todos los antibióticos se obtienen de actinomicetos, 18% de hongos, 12% de plantas, 9% por bacterias y el restante por algas, líquenes y animales. Aunque estos antibióticos son ahora sintetizados por los laboratorios, ellos fueron originalmente obtenidos de organismos vivos. Por esta razón el objetivo de este estudio es volver a la búsqueda de antibióticos en los recursos naturales, en especial en *Tephrosia Crassifolia* ya que se han extraído flavonoides de ella y con la esperanza de encontrárseles actividad antibiótica.

OBJETIVO

Determinar la actividad antibacteriana de los compuestos Crassifolina (I), Hildgartol (II), Tephromicrocarpanona (III), Metil glabranina (IV) y Metil hildgartol (V) aislados de *Tephrosia crassifolia* por el método de microdilución en placa de microtitulación empleando INT como revelador de la actividad enzimática.

HIPÓTESIS

Dado que se ha comprobado que algunos compuestos que contienen grupos fenólicos tienen actividad antibacteriana y que los flavonoides aislados de *Tephrosia crassifolia* son compuestos que los poseen se espera que éstos tengan actividad antibacteriana.

MATERIAL

MATERIAL DE LABORATORIO

Asa bacteriológica

Cajas de Petri de vidrio

Gradilla

Mechero Fisher

Portaobjetos

Puntas para micropipeta desechables

Tubos de ensayo con tapón de baquelita

Pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL Costar

Jeringa Plastipak de 5 mL, 10 mL y 20 mL

Membrana tipo HA 0.45 μ m Milipore

Microplacas de 96 pozos Nunclon Surface

Micropipeta 100 μ L Finnipipette

Vasos de precipitados 100 mL

Matraces Erlenmeyer 125 mL y 250 mL

Equipo

Sonicador. Sonics Vibracell Modelo VC 130PB

Microscopio óptico Leica Modelo DME

Espectrofotómetro de microplacas. Awareness Technology INC. Modelo Stat Fax 3200

Potenciómetro Cole-Palmer Intrument

Cámara digital Fotográfica. Sony MVC-FD7. Digital Mavica

MATERIAL BIOLÓGICO

Compuestos de *Tephrosia crassifolia*

Crassifolina (sustancia A), PM 660. $C_{42}H_{44}O_7$

Hildgartol (sustancia B), PM 338. $C_{21}H_{22}O_4$

Tephromicrocarpanona (sustancia C). PM 336. $C_{21}H_{20}O_4$

Metil glabranina (sustancia D). PM 338. $C_{21}H_{22}O_4$

Metil hildgartol (sustancia E). PM 340. $C_{22}H_{24}O_4$

Cepas de referencia

Escherichia coli ATCC 25922

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Enterococcus faecalis ATCC 29212

Reactivos

Agua destilada

Violeta p-iodonitrotetrazolium (INT) (Sigma)

BaCl₂ (JT Baker)

H₂SO₄ (JT Baker)

NaOH (JT Baker)

Na₂HPO₄ (JT Baker)

KH₂PO₄ (JT Baker)

HCl (JT Baker)

Medios de cultivo

Agar Müeller Hinton (Bioxon)
Caldo Müeller Hinton (Bioxon)
Agar Soya Trypticaseína (Dibico)

Antibióticos

Ampicilina Schering-Plough Lote: 20042566
Gentamicina Sulfato USP Schering-Plough Lote: 050339
Trimetropina BP 93 HELM DE MÉXICO Lote: 200404272
Sulfametoxazol BP/USP HELM DE MÉXICO Lote: 12920404

MÉTODOS

Preparación de los compuestos a evaluar

Para cada una de las cinco muestras realizar el procedimiento siguiente:

Colocar 20 μg de la muestra en un vial, adicionar 1 mL de acetona, 9 mL de agua y 0.1 g de goma Gathi, para posteriormente emulsionar en un sonicador, de ésta solución tomar un mL y diluir con 9 de agua. Para obtener una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Preparación de los antibióticos

Ampicilina

Pesar 20 μg de ampicilina, diluir en 10 mL de Buffer de fosfatos pH 8.0, 0.1 M, después tomar un mL, hacer una dilución 1:10 con Buffer de fosfatos pH 6.0, 0.1 M. Para obtener una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Trimetroprima

Pesar 20 μg de trimetroprima, diluir en 10 mL de ácido clorhídrico 0.05 N, posteriormente tomar un mL y hacer una dilución 1:10 con agua (concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Sulfametoxazol

Pesar 20 μg de sulfametoxazol, diluir con 5 mL de agua caliente y una cantidad pequeña de NaOH 2.5 M para disolver, después adicionar agua para completar 10 mL, posteriormente tomar 1 mL y hacer una solución 1:10 con agua (concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Gentamicina

Pesar 20 μg de gentamicina, diluir en 5 mL de agua, posteriormente tomar un mL de ésta solución y hacer una solución 1:10 con agua (concentración de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Cultivo de bacterias

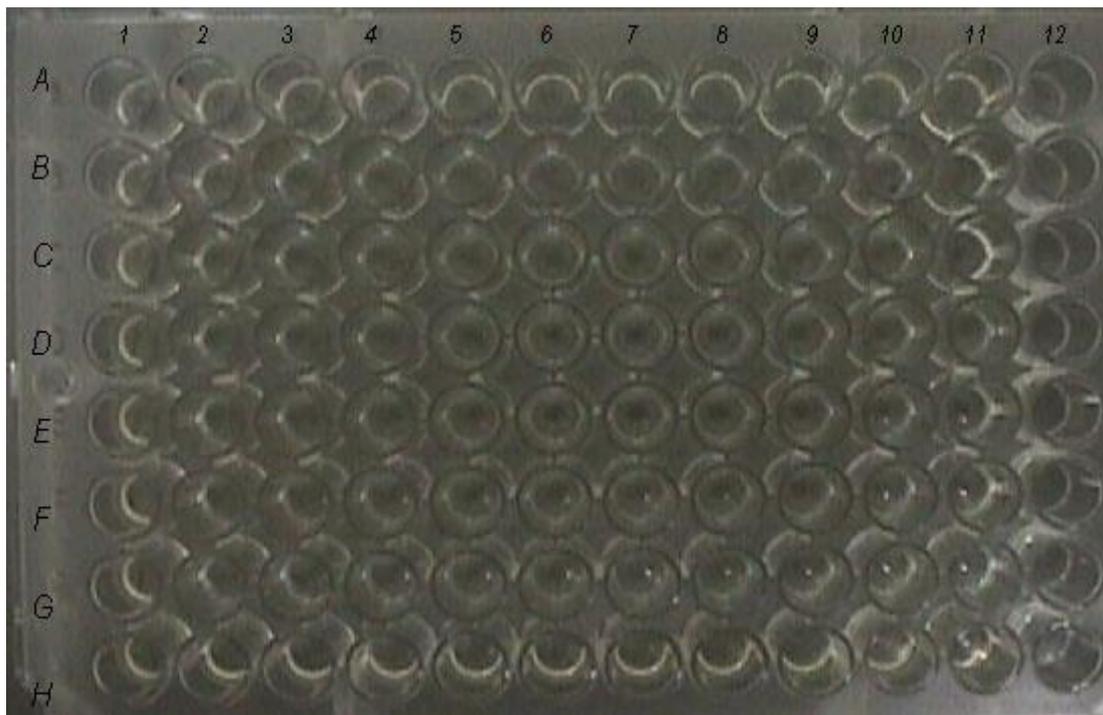
Las cepas de referencia conservadas en criotubos a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, fueron activadas en cajas de agar Müeller Hinton sometidas previamente 24 horas a prueba de esterilidad, mediante una siembra masiva.

Incubar por 24 horas a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, realizar frotis de los cultivos con la tinción Gram y examinar al microscopio.

Tomar una asada de la caja de petri y colocar en caldo Müeller Hinton e introducir a incubación hasta que alcanzar 0.5 de la escala de McFarland.

Determinación de actividad antibacteriana

A cada uno de los pozos de la columna 1 a la 10 de una microplaca adicionar $50\text{ }\mu\text{L}$ de caldo Müeller Hinton y $100\text{ }\mu\text{L}$ a la columna 11.



Después añadir al pozo A1 $50\text{ }\mu\text{L}$ de (I), al pozo A2 $50\text{ }\mu\text{L}$ de (II), $50\text{ }\mu\text{L}$ de (III) al pozo A3, $50\text{ }\mu\text{L}$ de (IV) al pozo A4 y $50\text{ }\mu\text{L}$ de (V) al pozo A5.

Al pozo A6 añadir 50 μ L de la solución de ampicilina, al pozo A7 50 μ L de la solución de gentamicina, al pozo A8 50 μ L de la solución de sulfametoxazol y al pozo A9 50 μ L de la solución de trimetoprima.

Del pozo A1 transferir 50 μ L al pozo B1 después aspirar y eyectar tres veces, con una micropipeta, del pozo B1 transferir 50 μ L al pozo C1 repetir el mismo procedimiento en los pozos siguientes y al llegar al pozo H1 descartar 50 μ L.

Realizar el mismo procedimiento con las columnas 2 a la 9.

Añadir a cada pozo de la columna 1 a la 10 una alícuota de 50 μ L de suspensión bacteriana correspondiente.

Incubar la microplaca a 37 °C durante 20 horas, para evitar evaporación tapar la placa herméticamente.

A todos los pozos de la microplaca adicionar 50 μ L de INT, incubar durante 15 minutos, hacer la lectura correspondiente en el espectrofotómetro a 630 nm, interpretar los resultados.^{37, 38, 39, 40, 41,42}

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo son presentados en las siguientes tablas producto de las lecturas obtenidas por el espectrofotómetro de microplacas, los cuales indican las absorbancias de cada placa.

<i>Escherichia coli</i> ensayo 1										
Crassi- folina	Hildgart ol	Tephro microcar panona	Metil glabra- nina	Metil hildgart ol	Ampi- cilina	Genta- micina	Sulfa- metoxa- zol	Trime- tropri- ma	Control +	Control -
0,462	0,369	0,395	0,323	0,582	0,464	0,55	0,387	0,514	0,755	0,016
0,536	0,426	0,552	0,516	0,403	0,454	0,483	0,458	0,569	0,707	0,022
0,624	0,471	0,528	0,51	0,511	0,509	0,501	0,496	0,475	0,591	0,011
0,664	0,53	0,488	0,582	0,562	0,531	0,523	0,418	0,51	0,63	0,012
0,591	0,48	0,51	0,539	0,46	0,523	0,407	0,47	0,458	0,53	0,028
0,634	0,529	0,537	0,476	0,472	0,497	0,496	0,476	0,581	0,423	0,012
0,68	0,597	0,524	0,473	0,52	0,533	0,619	0,53	0,597	0,592	0,006
0,71	0,521	0,741	0,723	0,671	0,711	0,717	0,618	0,639	0,785	0,021

<i>Escherichia coli</i> ensayo 2										
Crassi- folina	Hildgartol	Tephromi crocar- panona	Metil glabra- nina	Metil hildgartol	Ampi- cilina	Genta- micina	Sulfa- metoxa- zol	Trime- tropri- ma	Control +	Control -
0,426	0,361	0,392	0,276	0,391	0,415	0,476	0,287	0,428	0,621	0,016
0,615	0,378	0,504	0,578	0,417	0,111	0,552	0,523	0,751	0,556	0,022
0,672	0,543	0,586	0,515	0,522	0,553	0,56	0,525	0,429	0,59	0,011
0,672	0,594	0,679	0,567	0,494	0,644	0,494	0,273	0,747	0,661	0,012
0,716	0,569	0,642	0,6	0,517	0,58	0,531	0,557	0,514	0,672	0,028
0,718	0,617	0,629	0,499	0,544	0,545	0,644	0,562	0,581	0,544	0,012
0,695	0,647	0,662	0,615	0,54	0,539	0,824	0,647	0,66	0,643	0,012
0,781	0,642	0,738	0,635	0,67	0,857	0,633	0,579	0,611	0,704	0,021

<i>Enterococcus faecalis</i>										
Crassi- folina	Hildgartol	Tephromi crocar- panona	Metil glabra- nina	Metil hildgartol	Ampi- cilina	Genta- micina	Sulfa- metoxa- zol	Trime- tropri- ma	Control +	Control -
0,511	0,503	0,508	0,451	0,639	0,431	0,539	0,564	0,55	0,803	0,328
0,563	0,543	0,619	0,514	0,581	0,748	0,644	0,545	0,55	0,748	0,349
0,528	0,632	0,572	0,7	0,655	0,848	0,629	0,546	0,745	0,746	0,326
0,621	0,634	0,532	0,717	0,785	0,59	0,614	0,669	0,57	0,691	0,347
0,643	0,659	0,698	0,667	0,643	0,662	0,829	0,632	0,769	0,605	0,327
0,74	0,593	0,644	0,558	0,827	0,714	0,81	0,631	0,785	0,551	0,351
0,704	0,528	0,584	0,577	0,622	0,665	0,719	0,626	0,774	0,604	0,321
0,759	0,717	0,71	0,667	0,663	0,679	0,747	0,627	0,772	0,783	0,353

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ensayo 1										
Crassi- folina	Hildgartol	Tephromi crocar- panona	Metil glabra- nina	Metil hildgartol	Ampi- cilina	Genta- micina	Sulfa- metoxa- zol	Trime- troprima	Control +	Control -
0,409	0,492	0,495	0,547	0,393	0,393	0,006	0,316	0,369	0,691	0,45
0,431	0,446	0,718	0,581	0,366	0,715	0,029	0,477	0,366	0,519	0,487
0,588	0,439	0,526	0,564	0,423	0,586	0,025	0,596	0,469	0,568	0,421
0,604	0,541	0,65	0,555	0,474	0,693	0,057	0,612	0,452	0,519	0,448
0,638	0,53	0,712	0,666	0,524	0,599	0,056	0,65	0,561	0,565	0,49
0,665	0,741	0,602	0,694	0,545	0,483	0,068	0,396	0,449	0,563	0,512
0,493	0,558	0,575	0,561	0,613	0,539	0,068	0,38	0,41	0,626	0,633
0,589	0,66	0,597	0,509	0,62	0,548	0,36	0,453	0,436	0,572	0,495

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ensayo 2										
Crassi- folina	Hildgartol	Tephromi crocar- panona	Metil glabra- nina	Metil hildgartol	Ampi- cilina	Genta- micina	Sulfa- metoxa- zol	Trime- troprima	Control +	Control -
0,383	0,379	0,299	0,359	0,361	0,502	0,002	0,356	0,312	0,765	0,55
0,61	0,525	0,391	0,614	0,306	0,676	0,05	0,571	0,413	0,886	0,446
0,65	0,572	0,588	0,624	0,391	0,612	0,044	0,602	0,392	0,742	0,501
0,612	0,561	0,763	0,714	0,447	0,728	0,079	0,556	0,509	0,659	0,499
0,548	0,633	0,632	0,652	0,525	0,613	0,054	0,562	0,431	0,541	0,496
0,673	0,684	0,623	0,582	0,479	0,573	0,067	0,558	0,537	0,765	0,533
0,596	0,587	0,637	0,465	0,485	0,566	0,153	0,53	0,361	0,519	0,467
0,618	0,625	0,691	0,524	0,382	0,533	0,321	0,392	0,456	0,6	0,407

<i>Staphylococcus aureus</i> ensayo 1										
Crassi- folina	Hildgartol	Tephromi crocar- panona	Metil glabra- nina	Metil hildgartol	Ampi- cilina	Genta- micina	Sulfa- metoxa- zol	Trime- troprima	Control +	Control -
1,06	0,741	1,056	1,23	0,814	0,319	0,302	0,43	0,653	0,517	0,58
0,731	0,591	0,937	1,317	0,925	0,378	0,288	0,487	0,684	1,345	1,468
1,359	1,022	1,415	1,424	1,352	0,329	0,44	0,405		1,503	1,706
1,434	1,204	0,68	0,733	0,832	0,501	0,425	0,436		0,698	1,411
1,623	1,368	1,329	1,197	0,884	0,56	0,483	0,519	0,977	1,517	1,451
1,042	0,76	0,788	0,788	0,787	0,381	0,446	0,529	0,845	0,808	1,526
1,501	1,435	1,2	1,244	1,196	0,458	0,922	0,883	1,126	0,978	1,319
1,386	1,071	1,17	1,126	1,198	0,575	1,023	1,441	1,404	1,414	1,695

<i>Staphylococcus aureus</i> ensayo 2										
Crassi- folina	Hildgartol	Tephromi crocar- panona	Metil glabra- nina	Metil hildgartol	Ampi- cilina	Genta- micina	Sulfa- metoxa- zol	Trime- troprima	Control +	Control -
0,992	1,015	1,066	1,119	1,174	0,33	0,473	0,993	1,173	1,42	1,091
0,975	0,979	0,952	0,933	0,762	0,287	0,305	0,686	0,777	0,716	0,732
1,062	1,01	1,001	0,937	0,868	0,754	0,413	0,681	0,693	0,909	0,773
0,913	0,842	0,915	0,695	0,787	0,494	0,203	0,559	0,612	0,657	0,573
1,077	0,944	0,888	0,799	0,82	1,06	0,83	0,646	0,676	0,744	0,793
0,952	0,852	0,92	0,705	0,672	0,497	0,473	0,716	0,766	0,651	0,573
1,038	1,081	0,957	0,76	0,892	0,918	0,817	0,868	0,915	1,09	0,668
1,022	0,969	0,989	0,971	0,988	1,001	0,892	0,843	0,915	0,923	0,733

DISCUSIÓN

Cinco flavonoides aislados de *Tephrosia crassifolia* fueron estudiados para determinar actividad antimicrobiana todos presentaron actividad significativa. La CMI no representa un valor absoluto, incluso bajo las mejores condiciones un examen de dilución no mostrará el mismo punto final cada vez que sea repetido pero da una indicación de la cantidad de antimicrobiano que al alcanzar el lugar de infección inhibirá al microorganismo.

Crassifolina (I), PM 660. $C_{42}H_{44}O_7$

Este compuesto frente a *E. coli* presentó una CMI de 25 $\mu\text{g/mL}$ a 3.12 $\mu\text{g/mL}$, 3.12 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. faecalis*, 25 a 3.12 $\mu\text{g/mL}$ contra *Ps. aeruginosa* y no presentó frente a *Staph. aureus*.

Hildgartol (II), PM 338. $C_{21}H_{22}O_4$

Este compuesto mostró actividad antimicrobiana contra *E. coli* (0.36-3.12 $\mu\text{g/mL}$) así como frente a *Ps. aeruginosa* (3.12 $\mu\text{g/mL}$), versus *E. faecalis* 0.78 $\mu\text{g/mL}$ y 25 $\mu\text{g/mL}$ contra *Staph. aureus*.

Tephromicrocarpanona (III). PM 336. $C_{21}H_{20}O_4$

La CMI contra *E. coli* fue de 1.56-25 $\mu\text{g/mL}$ y de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ frente a *Ps. aeruginosa*, 12.5 $\mu\text{g/mL}$ contra *Staph. aureus* y 0.78 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. faecalis*

Metil glabranina (IV). PM 338. $C_{21}H_{22}O_4$

Este compuesto obtuvo una actividad contra *E. coli* 0.78 $\mu\text{g/mL}$. 25 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. faecalis* 0.36 $\mu\text{g/mL}$, y a su vez 6.25 $\mu\text{g/mL}$ contra *Ps aeruginosa*.

Metil hildgartol (V). PM 340. $C_{22}H_{24}O_4$

Este compuesto tuvo una actividad importante contra *E. coli* 0.78 $\mu\text{g/mL}$, *E. faecalis* 0.36 $\mu\text{g/mL}$ y también contra *Ps. aeruginosa* de 0.78-3.12 $\mu\text{g/mL}$. La CMI contra *Staph. aureus* fue de 1.56.

REFERENCIAS

1. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; 12(4):564-582.
2. Biblioteca de Consulta Microsoft. Encarta 2005. © 1993-2004 Microsoft Corporation.
3. Hoareau L, DaSilva EJ Medicinal plants: a re-emerging health aid. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1999; 2(2):56-70
4. Robinson R. *Encyclopaedia of food microbiology*. Vol. III, Great Britain: Academic press; 2000. p. 1576-1581.
- 5 Herbert R. *The biosynthesis of secondary metabolites*. 2ª ed. New York: Chapman and Hall; 1990. p. 111-115.
6. Scott T, Eagleson M. *Enciclopedia concisa de bioquímica*. España: Acribia; 1983 p 329, 330.
7. Rice-Evans C. *Flavonoids in health and disease*. 2ª ed. USA: Marcel Dekker inc; 2003. 43 y 44.
8. Markham K. *Techniques of flavonoid identification*. New York: Academia press; 1982. p. 1-12
9. Matínez CV. El mundo de las plantas. [serial on line] [citado 21 de sep 2005] Available from: URL: <http://www.botanical-online.com/medicinalesflavonoides.htm>
10. Reyes-Chilpa R, Gomez-Garibay F, Moreno-Torres G, Jiménez-Estrada M, Quiroz-Vasquez RI. Flavonoids and isoflavonoids with antifungal properties from *Platymiscium yucatanum* heartwood. *Holzforschung* 1998; 52: 459-462.
11. Kutchan TM. Alkaloid biosynthesis-The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The plant cell* 1995; 7:1059-1070.
12. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 2003; 66:1022-1037.
13. Rouhi M. Rediscovering natural products. *Chemical and Engineering News*. 2003;81(41): 77-91.
14. Gómez F. *Plantas mexicanas. Género Tephrosia*. México. UNAM. Instituto de Química. 2001. p. 10-11.
15. Bradley MJ. Legume Genetic Resources with Novel "Value Added" Industrial and Pharmaceutical Use [serial on line] [citado 2006 junio 5] Available from: URL:<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1999/v4-196.html>
16. Kunin CM. Resistance to antimicrobial drugs-a worldwide calamity. *Annals of interna* 1993; 118(7): 557-561.
17. Levy SB. The Challenge of Antibiotic Resistance. *Scientific American*. [serial on line] 1998 marzo [citado 2006 junio 5]; 46-53. Available from: URL: <http://www.sciam.com>
18. Amyes SBG. The rise of the bacterial resistance. *British medical journal*. 2000; 320:7229.
19. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. 2001. WHO/CDS/CRS/DRS/2001.2.

20. Wise R. Science, medicine, and the future: The development of new antimicrobial agents. *BMJ* 1998; 317: 643-644.
21. World Health Organization. Counterfeit drugs: report of a joint WHO/IFPMA workshop 1-3 April 1992. Geneva, 1992. WHO/DMP/CFD/92.
22. Smith RD et al. Cost effectiveness analysis: interventions against anti-microbial resistance. Interim report to the Global Forum for Health Research. 2001 (in preparation).
23. Rice LB et al. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum beta-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, 34:2193-2199.
24. Seppälä H et al. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics of erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. *N Engl J Med*, 1997, 337:441-446.
25. Coast J, Smith RD, Millar MR. Superbugs: should antimicrobial resistance be included as cost in economic evaluation? *Health Econ*, 1996, 5:217-226.
26. Coast J, Smith RD, Millar MR. An economic perspective on policy to reduce antimicrobial resistance. *Soc Sci Med*, 1998, 46:29-38.
27. Finegold SM, Baron E. Bayley y Scott. *Diagnóstico microbiológico*. 7ª ed. Argentina: Panamericana; 1996. p 191-209.
28. Brooks GF, Batel JS, Ornston LN. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Alberg*. 15ª ed. México: Manual moderno; 1996. p 171.
29. Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. *Procedimientos en microbiología clínica. Métodos básicos para el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos*. 2000. España
30. Cohen ML: Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 1992; 257: 1050-5.
31. Mendoza MT. What's new in antimicrobial susceptibility testing? *Phil J Microbiol Infect Dis* 1998; 27(3): 113-115.
32. Poinas A, Gaillard J, Vignails P, Doussiere J. Exploration of the diaphorase activity of neutrophil NADPH oxidase, critical assessment of the interaction of iodinitrotetrazolium with the oxidase redox components. *Eur J Biochem* 2002; 269:1243-1252.
33. Alley M, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cells lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research* 1988; 48: 589-601.
34. Smith JJ, McFeters GA. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *J. Microbiol Method* 1997; 29:161-175.
35. Berridge MV, Tan AS, McCoy K, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996; 4:14-19
36. Eloff JN. Antibacterial activity of Marula (*Sclerocarya birrea* (A. rich.) Hochst. Subsp. Caffra (Sond.) Kokwaro)(Anacardiaceae)bark and leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 76: 305-308.
37. Suffredini IB, Sader HS, Goncalves AG, Reis AO, Gales AC, Varella AD, et al. Screening of antibacterial extracts from plants native to the brazilian Amazon rain forest and atlantic forest. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(3): 379-384.

38. Rhajaoui M, Oumzil H, Faid M, Lyagoubi M, Elyachioui M, Benjouad. Antibacteria activity of a morccan propolis extracts. *Science Letters* 2001; 3(3)
39. Devienne K, Raddi MS. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Brazilian Journal of Microbiology* 2002; 33:166-168.
40. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, et al. *Diagnóstico microbiológico*. 3ª ed. México: Panamericana; 1997. p. 599-614.
41. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta medica* 1998; 64; 711-713.
43. Hawkes CA. Antibiotic resistance: A clinician's perspectiva. *Military Medicine* 2000

CONCLUSIONES

En este estudio cinco flavonoides aislados de *Tephrosia crassifolia* fueron estudiados para determinar actividad antimicrobiana, con base a que muchos de éstos compuestos son producidos como respuesta a una infección en las plantas.

Los resultados obtenidos fueron mas que halagadores ya que no es fácil encontrar compuestos con actividad antimicrobiana, y tanto el hildgartol (II) y el metil hildgartol (V) mostraron importantes actividades antimicrobianas contra bacterias gram negativas.

Tephrosia crassifolia es una posible alternativa terapéutica contra infecciones bacterianas sobre todo el metil hildgartol (V) ya que mostró mayor correlación con antibióticos de elección contra *E. coli* y *Ps. aeruginosa* ampicilina y gentamicina respectivamente.

Los estudios etnobotánicos de *Tephrosia crassifolia* pueden contribuir a que la ciencia medica siga adelante para mejorar la vida humana.

PROPUESTAS Y RECOMENDACIONES

El desarrollo de nuevas familias de antimicrobianos en las décadas de 1950 y 1960 y las modificaciones de esas moléculas en las de 1970 y 1980 crearon una falsa sensación de seguridad y la creencia de que siempre podríamos adelantarnos a los agentes patógenos. Al comenzar el nuevo siglo, esa complacencia nos está costando muy cara. La generación de nuevos antimicrobianos se está estancando y son pocos los incentivos para elaborar otros nuevos que permitan combatir el problema mundial de la resistencia.

Es importante que nunca nos detengamos ante un nuevo conocimiento ya que nos estancaríamos en un cúmulo de ideas obsoletas. Voltar hacia la botánica como fuente de medicamentos es sumamente importante ya que esa es la piedra angular de la salud. A su vez es importante que para mejorar nuestra salud tomemos medidas en diferentes campos: los pacientes y comunidad en general, los que dispensan los medicamentos, los laboratorios, los hospitales, los gobiernos y la industria farmacéutica, dentro de las recomendaciones que se pueden hacer al respecto están:

- Educar a los pacientes y a la comunidad en general sobre el uso adecuado de los antimicrobianos.
- Educar a los pacientes sobre la importancia de tomar medidas para prevenir las infecciones, como la inmunización, la lucha contra los vectores, y otras.
- Enseñar a los pacientes medidas sencillas para reducir la transmisión de la infección en el hogar y en la comunidad, como el lavado de manos, la higiene alimentaria y otras.
- Educar al personal que prescriba o dispense antimicrobianos (incluido el sector informal) sobre la importancia de usar adecuadamente estos fármacos y de contener la resistencia.

- Promover programas educativos sobre el diagnóstico y tratamiento correcto de las infecciones comunes destinados a todas las carreras (formación básica y de posgrado) para profesionales de la salud, veterinarios y personal que prescribe y dispensa antimicrobianos.
- Mejorar la utilización de antimicrobianos mediante la supervisión y el fomento de buenas prácticas clínicas, especialmente de las estrategias de diagnóstico y de tratamiento.
- Garantizar la disponibilidad de servicios de laboratorio microbiológicos que correspondan al tipo de hospital, por ejemplo, secundario o terciario.
- Velar por el desempeño y la garantía de la calidad de las pruebas de diagnóstico, de determinación microbiológica y de sensibilidad de los agentes patógenos fundamentales a los antimicrobianos, e informar oportunamente sobre los resultados.
- Garantizar el registro de los datos de laboratorio, de preferencia en una base de datos; el uso oportuno de los datos para elaborar informes clínicos y epidemiológicos útiles para la vigilancia de la resistencia de los agentes patógenos y las infecciones comunes, y la comunicación de los resultados a las personas que prescriben y al programa de control de infecciones nosocomiales.
- Fomentar la cooperación entre la industria farmacéutica, entes gubernamentales e instituciones académicas para investigar nuevos medicamentos y vacunas.
- Estimular los programas de desarrollo de medicamentos que traten de optimizar los esquemas terapéuticos en cuanto a su inocuidad, eficacia y riesgo de selección de organismos resistentes.
- Establecer incentivos para que la industria invierta en investigación y en el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.

- Estudiar el establecimiento o aplicación de procedimientos acelerados de autorización para comercializar fármacos nuevos que sean inocuos.
- Estudiar la aplicación de un régimen de medicamentos que no tiene interés comercial para las compañías farmacéuticas cuando se disponga de uno y sea pertinente.
- Buscar fórmulas de asociación innovadoras con la industria farmacéutica con el fin de mejorar el acceso a los medicamentos esenciales más nuevos.

REFERENCIAS

1. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; 12(4):564-582.
2. Biblioteca de Consulta Microsoft. Encarta 2005. © 1993-2004 Microsoft Corporation.
3. Hoareau L, DaSilva EJ Medicinal plants: a re-emerging health aid. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1999; 2(2):56-70
4. Robinson R. *Encyclopaedia of food microbiology*. Vol. III, Great Britain: Academic press; 2000. p. 1576-1581.
- 5 Herbert R. *The biosynthesis of secondary metabolites*. 2ª ed. New York: Chapman and Hall; 1990. p. 111-115.
6. Scott T, Eagleson M. *Enciclopedia concisa de bioquímica*. España: Acribia; 1983 p 329, 330.
7. Rice-Evans C. *Flavonoids in health and disease*. 2ª ed. USA: Marcel Dekker inc; 2003. 43 y 44.
8. Markham K. *Techniques of flavonoid identification*. New York: Academia press; 1982. p. 1-12
9. Matínez CV. El mundo de las plantas. [serial on line] [citado 21 de sep 2005] Available from: URL: <http://www.botanical-online.com/medicinalesflavonoides.htm>
10. Reyes-Chilpa R, Gomez-Garibay F, Moreno-Torres G, Jiménez-Estrada M, Quiroz-Vasquez RI. Flavonoids and isoflavonoids with antifungal properties from *Platymiscium yucatanum* heartwood. *Holzforschung* 1998; 52: 459-462.
11. Kutchan TM. Alkaloid biosynthesis-The basis for metabolic engineering of medicinal plants. *The plant cell* 1995; 7:1059-1070.
12. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 2003; 66:1022-1037.
13. Rouhi M. Rediscovering natural products. *Chemical and Engineering News*. 2003;81(41): 77-91.
14. Gómez F. *Plantas mexicanas. Género Tephrosia*. México. UNAM. Instituto de Química. 2001. p. 10-11.
15. Bradley MJ. Legume Genetic Resources with Novel "Value Added" Industrial and Pharmaceutical Use [serial on line] [citado 2006 junio 5] Available from: URL:<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1999/v4-196.html>
16. Kunin CM. Resistance to antimicrobial drugs-a worldwide calamity. *Annals of interna* 1993; 118(7): 557-561.
17. Levy SB. The Challenge of Antibiotic Resistance. *Scientific American*. [serial on line] 1998 marzo [citado 2006 junio 5]; 46-53. Available from: URL: <http://www.sciam.com>
18. Amyes SBG. The rise of the bacterial resistance. *British medical journal*. 2000; 320:7229.
19. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. 2001. WHO/CDS/CRS/DRS/2001.2.

20. Wise R. Science, medicine, and the future: The development of new antimicrobial agents. *BMJ* 1998; 317: 643-644.
21. World Health Organization. Counterfeit drugs: report of a joint WHO/IFPMA workshop 1-3 April 1992. Geneva, 1992. WHO/DMP/CFD/92.
22. Smith RD et al. Cost effectiveness analysis: interventions against anti-microbial resistance. Interim report to the Global Forum for Health Research. 2001 (in preparation).
23. Rice LB et al. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum beta-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother*, 1990, 34:2193-2199.
24. Seppälä H et al. The effect of changes in the consumption of macrolide antibiotics of erythromycin resistance in group A streptococci in Finland. *N Engl J Med*, 1997, 337:441-446.
25. Coast J, Smith RD, Millar MR. Superbugs: should antimicrobial resistance be included as cost in economic evaluation? *Health Econ*, 1996, 5:217-226.
26. Coast J, Smith RD, Millar MR. An economic perspective on policy to reduce antimicrobial resistance. *Soc Sci Med*, 1998, 46:29-38.
27. Finegold SM, Baron E. Bayley y Scott. *Diagnóstico microbiológico*. 7ª ed. Argentina: Panamericana; 1996. p 191-209.
28. Brooks GF, Batel JS, Ornston LN. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Alberg*. 15ª ed. México: Manual moderno; 1996. p 171.
29. Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. *Procedimientos en microbiología clínica. Métodos básicos para el estudio de sensibilidad a los antimicrobianos*. 2000. España
30. Cohen ML: Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 1992; 257: 1050-5.
31. Mendoza MT. What's new in antimicrobial susceptibility testing? *Phil J Microbiol Infect Dis* 1998; 27(3): 113-115.
32. Poinas A, Gaillard J, Vignails P, Doussiere J. Exploration of the diaphorase activity of neutrophil NADPH oxidase, critical assessment of the interaction of iodinitrotetrazolium with the oxidase redox components. *Eur J Biochem* 2002; 269:1243-1252.
33. Alley M, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cells lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer research* 1988; 48: 589-601.
34. Smith JJ, McFeters GA. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *J. Microbiol Method* 1997; 29:161-175.
35. Berridge MV, Tan AS, McCoy K, Wang R. The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 1996; 4:14-19
36. Eloff JN. Antibacterial activity of Marula (*Sclerocarya birrea* (A. rich.) Hochst. Subsp. Caffra (Sond.) Kokwaro)(Anacardiaceae)bark and leaves. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 76: 305-308.
37. Suffredini IB, Sader HS, Goncalves AG, Reis AO, Gales AC, Varella AD, et al. Screening of antibacterial extracts from plants native to the brazilian Amazon rain forest and atlantic forest. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37(3): 379-384.

38. Rhajaoui M, Oumzil H, Faid M, Lyagoubi M, Elyachioui M, Benjouad. Antibacteria activity of a morccan propolis extracts. *Science Letters* 2001; 3(3)
39. Devienne K, Raddi MS. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Brazilian Journal of Microbiology* 2002; 33:166-168.
40. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, et al. *Diagnóstico microbiológico*. 3ª ed. México: Panamericana; 1997. p. 599-614.
41. Eloff JN. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta medica* 1998; 64; 711-713.
43. Hawkes CA. Antibiotic resistance: A clinician's perspectiva. *Military Medicine* 2000

ANEXO 1

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Agar Müller Hinton

Pesar 6.20 g de medio de cultivo.

Disolver en 170 mL de agua destilada.

Esterilizar a 121° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Vaciar en cajas de Petri estériles en condiciones asépticas.

Pesar 6.20 g de medio de cultivo.

Disolver en 170 mL de agua destilada.

Vaciar en tubos de ensayo, esterilizar a 121° C a 15 lb de presión durante 15 minutos e inclinar para formar el “pico de flauta”.

Preparación de Agar Soya Trypticaseína.

Pesar 3.2 g de medio de cultivo.

Disolver en 80 mL de agua destilada.

Esterilizar 121° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Vaciar en cajas Petri en condiciones asépticas.

Preparación de caldo Müller Hinton.

Pesar 1.26 g de cultivo.

Disolver en 60 mL de agua destilada

Vaciar en tubos de ensayo. Esterilizar 121° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.

NOTA: Todos los medios de cultivo se sometieron a una prueba de esterilidad de 24 horas a 37 °C.

ANEXO 2

PREPARACIÓN DEL NEFELÓMETRO DE Mc FARLAND

1. Preparar 10 tubos de ensayo del mismo tamaño que hayan sido cuidadosamente lavados y enjuagados.
2. Preparar ácido sulfúrico puro al 1%.
3. Preparar una solución acuosa de cloruro de bario puro al 1%.
4. Colocar en los tubos las cantidades de cada solución indicadas en el cuadro siguiente completando 10 mL por tubo.

La suspensión de sulfato de bario formado corresponde aproximadamente, en el intervalo estándar, a las concentraciones de una suspensión homogénea de *Escherichia coli*, según la tabla siguiente.

Estándar No	Volumen (mL)		Equivalente en número de bacterias/mL ($\times 10^8$)
	BaCl ₂ 0,048M (1,175% P/V)	H ₂ SO ₄ , 0,18 M (0,36 N) (1% V/V)	
0.5	0.05	9.95	1.5
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1.0	9.0	30

Para inocular las microplacas se utiliza un patrón de turbidez al 0.5 de la escala de McFarland.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

(GMOs)	Organismos Genéticamente Modificados
(CDC)	Centro de Control de Enfermedades
(WHO)	Organización Mundial de Salud
(TMP/SMX)	Trimetoprim-Sulfametoxazol
(ESBLs)	Beta-Lactamasas de Amplio Espectro
(CMI)	Concentración Mínima Inhibitoria
(NCCLS)	National Committee for Clinical Laboratory Standards
(PABA)	Ácido p-Aminobenzoico
(NAD)	Nicotinamida Adenin Dinucleótido
(NADP)	Fosfato de Nicotinamida Adenin Dinucleótido
(NADH)	Dihidro Nicotinamida Adenin Dinucleótido
(NADPH)	Fosfato de Dihidronicotamida Adenin Nucleótido
(UV)	Ultravioleta
(TT)	Cloruro de Trifeniltetrazolio
(MTT)	Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-Tiazolil(-2,5-Difenil-2H-Tetrazolio))
(INT)	Cloruro de Iodonitrotetrazolio
(WST1)	4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-Nitrofenil)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Bencen Disulfonato
(WST3)	4-[3-(4-Iodofenil)-2-(2,4-Dinitrofenil)-2H-5-Tetrazolio]- 1,3-Bencen Disulfonato
(WST4)	Sal de 2-Benzotiazolil-3-(4-Carboxi-2-Metoxifenil (-5-[4-(2-Sulfoetilcarbamoil) fenil]-2H-Tetrazolio))
(BT)	Azul de Cloruro de Tetrazolio
(NBT)	Azul de cloruro de Nitrotetrazolio
(XTT)	Acido 3,3,-[(Fenilamino)Carbonil]-3,4-Tetrazolio-Bis(4-Metoxi-6-Nitro) Bencensulfónico
(TNBT)	Azul de Cloruro de Tetranitro Tetrazolio