



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Laboratorio de Biología de Suelos

Evaluación del efecto antimicrobiano y Toxicidad del extracto de *Alnus acuminata*
subspecie arguta (Schlecht), H.B.K.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

JUAN ROMERO CUENCA

DIRECTORA DE TESIS: *M. en C. Maria de Jesús Sánchez Colín*

México D.F. 2008



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

Doy gracias a dios por darme la oportunidad de conocer este mundo tan maravilloso y por encaminar mis pasos para concluir un sueño en mi vida.

Son tan numerosos y a veces tan difíciles de discernir los consejos y las observaciones que me han ayudado en la redacción de esta tesis, que no me es posible nombrar a todas las personas que me estimularon y auxiliaron. Solamente puedo mencionar aquí a quienes en forma más directa me han favorecido con sus críticas y sus opiniones, permitiéndome así eliminar fallas y aclarar conceptos. Agradezco las valiosas opiniones de mis sinodales: M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales, M. en C. Maria De Jesús Sánchez Colín, Biól. J. Rubén Zulbarán Rosales, Biól. Juan Romero Arredondo y al Biól. Juan Manuel Valderrabano Gómez. Por sus aportaciones para enriquecer este trabajo.

Debo también el reconocimiento a mi Directora de tesis a la M. en C. *Maria de Jesús Sánchez Colín* por darme la oportunidad de trabajar con ella y a quien debo gran parte de mi formación profesional.

Así mismo quiero agradecer a mis padres *Domingo Romero López y Patricia Cuenca Paz* por el gran sacrificio que han hecho para que yo logre una meta más en mi vida. Por otra parte quiero agradecer a mis hermanos *Iván Romero Cuenca, Sara Romero Cuenca e Isaac Romero Cuenca* por el gran apoyo que me han dado, espero algún día gratificar de alguna manera lo que han hecho por mi.

A todos mis amigos con los que he compartido gran parte de mi vida: Muñoz Gómez Dan Eduardo, Norma Sosa Hernández, Soledad Guevara Chávez, Karmina, Edmundo, Dulce, Nayeli, Sergio, Mariana Samudio, Adriana, Brenda etc. Pero muy en especial a *Roció Montiel Bustos* por los grandes consejos y por ser una persona maravillosa.

También quiero agradecer a la *familia Romero* por el gran el apoyo que me brindan: a mis abuelitos *Domingo Romero Morales, Sara López De Romero* y a mis tíos Javier Romero, Reina Alcántara, Anamaria Romero, Rafael Olvera, Leticia Romero, José Jiménez, pero muy en especial a *Armado Romero López y Norma Jiménez Canales* por darme la oportunidad de conocerlos, por el apoyo que me han brindado. Así mismo quiero agradecer a todos mis primos pero muy en especial a *Armando Romero Cedillo* por apoyarme, por trasmitirme parte de sus conocimientos etc.

Estoy agradecido también a toda la *familia Cuenca*, pero muy en especial a mis tíos *Oscar Cuenca Paz y Leticia Cuenca Paz* por el gran apoyo a mi familia y a mí, así mismo por los grandes consejos que me han dado y el estímulo para seguir adelante.

A todas las personas que me han ayudado en una u otra forma en la elaboración y correcciones de este texto, las haya o no podido nombrar aquí, quiero expresar nuevamente mi profundo agradecimiento.

Índice

	Pág.
I. RESUMEN	8
II. ABSTRACT	9
III. INTRODUCCIÓN	10
IV. JUSTIFICACIÓN	11
V. MARCO TEÓRICO	12
PLANTAS MEDICINALES A TRAVÉS DE LA HISTORIA	12
LAS PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO	13
5.1. IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES	15
• UN BANCO DE FUTURAS MEDICINAS POR DESCUBRIR	15
• MEDICINA SINERGÉTICA	15
• APOYO DE LA MEDICINA OFICIAL	15
• MEDICINA PREVENTIVA	16
5.2. MANEJO DE LAS PLANTAS MEDICINALES	17
RECOLECCIÓN	17
CUANDO	17
DESECACIÓN	17
CONSERVACIÓN	18
5.3. PRINCIPIOS ACTIVOS	19
LOS PRINCIPIOS ACTIVOS QUE PRESENTAN LAS PLANTAS SON	20
Los flavonoides o bioflavonoides	20
Alcaloides	20
Glucósidos	21
Taninos	21
Aceites esenciales	21
Mucílagos	21
5.4. FACTORES ABIÓTICOS Y BIÓTICOS QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS	22
FACTORES CLIMÁTICOS	22
FACTORES EDAFOLÓGICOS	23
FACTORES TOPOGRÁFICOS	23
5.5. EXTRACCIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS	24
5.6. METODOS DE EVALUACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS	27
CROMATOGRAFÍA	27
RESONANCIA DE ENERGÍA NUCLEAR	27
ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	28
5.7. PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA	29
AGENTES ANTIMICROBIANOS	29

5.8. ANTIBIOGRAMAS	31
5.9. ORGANISMOS PATÓGENOS DEL HOMBRE	32
BACTERIAS	32
<i>Mycobacterium phlei</i>	32
<i>Corynebacterium xerosis</i>	32
<i>Escherichia coli</i>	32
<i>Staphylococcus aureus</i>	32
HONGOS	33
<i>Candida albicans</i>	33
<i>Candida Tropicales</i>	33
<i>Cryptococcus neoformans</i>	33
<i>Candida krusei</i>	33
<i>Candida Stellatoidea</i>	33
<i>Geotrichum sp</i>	34
6. MEDIOS DE CULTIVO	35
6.1. TÉCNICA DE SIEMBRA	36
TÉCNICA DE KIRBY-BAUER	36
TÉCNICA DE BARRY	36
6.2. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA	36
6.2. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA	38
FIJACIÓN DE NITRÓGENO	38
REPRODUCCIÓN	39
DESCRIPCIÓN	39
DISTRIBUCION	39
HABITAT	40
ASPECTOS FISIOLÓGICOS	40
ITERACCIÓN BIOLÓGICA	40
USOS	40
6.3. ZONA DE MUESTREO	42
V. HIPÓTESIS	43
VII. OBJETIVOS	44
7.1. GENERAL	44
7.2. PARTICULARES	44
VIII. METODOLOGÍA	45
FASE DE CAMPO	45
Recolección del material vegetal y muestreo de suelo	45
FASE DE LABORATORIO	45
PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	46
OBTENCIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO	46
PREPARACIÓN DE CONCENTRACIONES E IMPREGNACIÓN DE SENSIDISCOS	46
CEPAS MICROBIANAS	46
ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO MICROBIOLÓGICO	47
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA	47
ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO	48
TOXICIDAD	48

IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS	49
X. CONCLUSIONES	64
XI. APÉNDICE	65
XII. BIBLIOGRAFÍA	69

Índice de figuras

Fig.	Nombre	Pág.
1	Métodos extractivos	24
2	Estado de Morelos México	42
3	Métodos para la determinación de las propiedades físicas y químicas de suelo	45
4	Escala de Mc. Faland	47
5	Determinación de la toxicidad para <i>Artemia salina</i> Leach	48
6	Resultados promedios de las propiedades físicas y químicas del suelo	49
7	Rendimiento del principio activo en peso seco de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. de cada una de sus estructuras (hoja, rama y corteza)	50
8	Respuesta de la actividad antimicrobiana de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. de cada estructura (hoja, rama y corteza) frente a los microorganismos probados	51
9	Espectro de infrarrojo para la estructura de hoja de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K.	60
10	Espectro de infrarrojo para la estructura de rama de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K.	61
11	Espectro de infrarrojo para la estructura de corteza de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K.	61
12	Actividad biológica frente a <i>Artemia salina</i> Leach	63

Índice de Graficas

Graf.	Nombre	Pág.
1	Tamaño promedio del halo de inhibición con extracto de hoja de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. frente a <i>Geotrichum sp.</i>	52
2	Tamaño promedio del halo de inhibición con extracto de rama de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. frente a <i>Geotrichum sp.</i>	52
3	Tamaño promedio del halo de inhibición con el extracto de corteza de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. frente a <i>Geotrichum sp.</i>	53
4	Tamaño de los halos de inhibición en hoja, rama y corteza de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. para la concentración mínima inhibitoria frente a <i>Geotrichum sp.</i>	54
5	Resultados promedio del tamaño del halo de inhibición en las concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg mL ⁻¹ , en hoja de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	54
6	Resultados promedio del tamaño del halo de inhibición en las concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg mL ⁻¹ , en corteza de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	55
7	Comparación del tamaño de los halos de inhibición en cada una de las estructuras de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. en la concentración (CMI), frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .	55
8	Resultados promedio del tamaño del halo de inhibición en las concentraciones de 30, 60, 90 y 120 mg mL ⁻¹ , en hoja de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. frente a <i>Corynebacterium xerosis</i> .	56
9	Resultados promedio del tamaño del halo de inhibición en las concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg mL ⁻¹ , en rama de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. frente a <i>Corynebacterium xerosis</i> .	56
10	Resultados promedio del tamaño del halo de inhibición en las concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg mL ⁻¹ , en corteza de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. frente a <i>Corynebacterium xerosis</i> .	57
11	Comparación del tamaño de los halos de inhibición en cada una de las estructuras de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. en la concentración (CMI), frente a <i>Corynebacterium xerosis</i>	57
12	Resultados promedio del tamaño del halo de inhibición en las concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg mL ⁻¹ , en Corteza de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K. frente a <i>Mycobacterium phlei</i> .	58
13	Tamaño de halo en la concentración mínima inhibitoria (CMI), para <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Corynebacterium xerosis</i> , <i>Geotrichum sp.</i> y <i>Mycobacterium phlei</i> , en hoja, rama y corteza de <i>Alnus acuminata subespecie arguta</i> (Schlecht), H.B.K	59

I. RESUMEN

Las plantas medicinales constituyen una fuente natural importante en la búsqueda de nuevos compuestos con actividades farmacológicas. *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. (Aile) es de gran importancia ecológica, debido a su capacidad de fijar nitrógeno por medio de la asociación simbiótica con los actinomicetos del género *Frankia* y medicinal por su capacidad de astringencia entre otros atributos, de ahí el interés de esta investigación, para probar si tiene efecto antimicrobiano, contra algunos patógenos causantes de enfermedades en el hombre.

El sitio de muestreo fue en el municipio de Tétela del Volcán en el estado Morelos, donde se realizó la colecta del material vegetal (hoja, rama y corteza). El cual se desinfecto, secó y peso, para preparar las tinturas por medio de una maceración alcohólica (Método Galénico) y así obtener el peso seco del principio activo. Se evaluaron 4 concentraciones: 30, 60, 90 y 120 mg/mL (con cada estructura) sobre las siguientes cepas *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea*, *Geotrichum sp.* y *Cryptococcus neoformans*. Se realizaron los antibiogramas en medio de cultivo Mueller Hinton para bacterias y Dextrosa Sabouraud para hongos, por el método de difusión en agar Kirby-Bauer y la técnica de Barry. Así mismo se determinó la concentración mínima inhibitoria para cada microorganismo; se realizó una espectroscopia de infrarrojo al principio activo de cada estructura de la planta (hoja, rama y corteza), en un espectrofotómetro con transformados de fourier, se realizaron pruebas de toxicidad para cada estructura con *Artemia salina* y finalmente se realizaron los análisis físicos y químicos del suelo donde crece el Aile.

El suelo donde crece *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. (Aile), no presentan problemas de salinidad, poseen buena aeración, son ácidos y presentan un alto contenido de materia orgánica.

De los microorganismos evaluados, presentaron sensibilidad antimicrobiana tres bacterias, *Corynebacterium xerosis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei* y un hongo, *Geotrichum sp.*; Para *Corynebacterium xerosis* en las estructuras de hoja y rama con una concentración de 60 mg/mL y en corteza con una concentración de 30 mg/mL en *Staphylococcus aureus* en la estructura de hoja con una concentración de 90 mg/mL y en corteza con una concentración de 30 mg/mL, no habiendo respuesta en rama, finalmente para *Mycobacterium phlei* sólo se presentó sensibilidad antimicrobiana en la estructura de corteza con una concentración de 120 mg/mL. Para el hongo *Geotrichum sp.* en las estructuras de hoja y rama a una concentración de 120 mg/mL. y en corteza con una concentración de 90 mg/mL.

La corteza presenta mayor acción antibacteriana que antimicótica. El espectro de infrarrojo reveló la presencia de grupos funcionales: alcoholes asociados, huellas de benceno, compuestos aromáticos, ácidos carboxílicos, compuestos nitrogenados entre otros, finalmente la prueba de toxicidad a la cual se sometió el principio activo de cada una de las estructuras de la planta (hoja, rama y corteza) reveló no ser tóxica frente a *Artemia salina* Leach.

Palabras clave: Planta medicinal, principio activo, concentración mínima inhibitoria (CMI), espectro de infrarrojo (IR), toxicidad.

II. ABSTRACT

The medicinal plants constitute an important natural source in the search of new made up with pharmacological activities. *Alnus acuminata subspecies arguta* (Schlecht), H.B.K (Aile) it is of great ecological importance due to their capacity to fix nitrogen by means of the association simbiotic with the actinomycetos of the gender *Frankia* and medicinal for their capacity of astringency among other attributes, of there the interest of this investigation, to prove if has effect antimicrobiano, against some causing pathogens of illnesses in the man.

The sampling place was in the municipality of Tétela of the Volcano in the state of Morelos, where was carried out the collection of the vegetable material (leaf, branch and bark). which you disinfects, dry and I weigh, to prepare the dyes by means of an alcoholic maceration (Method Galénico) and this way to obtain the dry weight of the active principle. 4 concentrations were evaluated: 30, 60, 90 and 120 mg/mL (with each structure) on the following stumps *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei*, *Cándida albicans*, *Cándida tropicalis*, *Cándida krusei*, *Cándida stellatoidea*, *Geotrichum sp.* and *Criptococcus neoformans*. They were carried out the antibiogramas amid cultivation Mueller Hinton for bacterias and Dextrosa Sabouraud for mushrooms, for the diffusion method in agar Kirby-Bauer and the technique of Barry. Likewise the inhibitory minimum concentration was determined for each microorganism; was carried out an infrared espectroscopia at the beginning active of each structure of the plant (leaf, branch and bark), in an spectrophotometer with fourier transformations, likewise they were carried out toxicity tests for each structure with *Artemia saline* and finally they were carried out the physical and chemical analyses of the ground where the Aile grows.

The ground where *Alnus acuminata subspecies arguta* grows (Schlecht), H.B.K (Aile), they don't present problems of salinity, they possess good aeration, they are acid and they present a high content of organic matter.

Of the evaluated microorganisms, they presented answer antimicrobiana three bacterias, *Corynebacterium xerosis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei* and a mushroom, *Geotrichum sp.*; For *Corynebacterium xerosis* in the branch structures and leaf with a concentration of 60 mg/mL. and in bark with a concentration of 30 mg/mL. in *Staphylococcus aureus* in the leaf structure with a concentration of 90 mg/mL. and in bark with a concentration of 30 mg/mL. there not being answer in branch, finally for *Mycobacterium phlei* alone you presents sensibility antimicrobiana in the bark structure with a concentration of 120 mg/mL., For the mushroom *Geotrichum sp.* In the leaf structures and branch with a concentration of 120 mg/mL. and in bark with a concentration of 90 mg/mL.

The bark presents bigger action antimicrobiana that antimicótica. The infrared spectrum revealed associate alcohols, prints of benzene, compound aromatic, acid carboxílicos, compound nitrogenados among other, finally the toxicity test to which underwent the active principle of each one of the structures of the plant (leaf, branch and bark) revealed not to be toxic with *Artemia saline* Lench.

Key words: medicinal plants, active principle, inhibitory minimum concentration (CMI), infrared spectroscopy (IR), toxicity.

III. INTRODUCCIÓN

El interés por las plantas medicinales, ha resurgido una vez más en el ámbito de la ciencia. Es frecuente en la literatura científica la inclusión de especies vegetales como uno de los recursos importantes a considerar en la búsqueda de nuevos medicamentos (Lozoya, 1999).

Este fenómeno también ha cobrado fuerza en México y esa medicina empírica a la que recurre un porcentaje elevado de la población mexicana aún no posee suficientes estudios que validen sus propiedades terapéuticas, es por ello que las Ciencias de la Salud se inclinan por investigar y considerar la permanencia del uso de ciertos vegetales con propiedades medicinales y con ello pretenden validar su eficacia terapéutica (Linares, 1996).

Siguiendo este procedimiento el estudio farmacológico de extractos crudos constituye una parte integral importante en la investigación fármaco-terapéutica de las plantas. Los extractos íntegros, denominados también extractos crudos, son la forma de preparado más cercana al producto usado habitualmente por la población. La detección de sus efectos biológicos permite, en cierta medida, explicar y sustentar el uso medicinal atribuido al recurso herbolario, presumir cierto grado de toxicidad en algunos casos, o bien detectar un efecto biológico no esperado, pero de relevancia (Kumate, 1993).

La fase ulterior en el proceso de investigación de una planta, es el aislamiento e identificación del compuesto responsable de la actividad. Encontrar una nueva molécula biológicamente activa, o descubrir una novedosa estructura que sirva de modelo para la síntesis de compuestos con efecto biológico, permite ahondar en el conocimiento de los mecanismos de acción de este principio activo y efectuar una correcta evaluación farmacológica de ellos, para definir luego sus potencialidades como medicamentos (Kumate, 1993).

La investigación experimental de plantas medicinales en México se ha destacado por un notable y sostenido avance en el estudio fitoquímico de las especies botánicas del país. La literatura científica internacional refleja claramente el trabajo de excelencia y alta tecnología que desarrollan los expertos nacionales. Es significativa la información existente sobre la composición química de las plantas usadas con fines terapéuticos; sin embargo, un escaso número de plantas medicinales han sido evaluadas en sus propiedades biológicas y sus potencialidades como medicamentos. Tal es el caso de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. (Aile) al cual se le atribuyen propiedades medicinales como antifúngicas y antibacteriales entre otras (Martínez, 2000), es por ello que este trabajo pretende evaluar el efecto antimicrobiano, mediante el estudio de la sensibilidad *in vitro* de patógenos que afectan a la salud humana, así mismo evaluar su toxicidad frente a *Artemia salina* Leach y así obtener un parámetro que valide su eficacia terapéutica.

IV. JUSTIFICACIÓN

Desde tiempos inmemoriales las plantas han sido empleadas para aliviar los males de la humanidad, y sólo después de muchos años, su conocimiento empírico fue acumulándose y posteriormente, formó parte integral de sistemas y tradiciones curativas de pueblos tan distantes como diversos (Ibarra, 2001).

En México, las plantas medicinales han sido y siguen siendo un recurso importante para buscar alivio a las enfermedades más comunes. El país geográficamente es privilegiado, pues posee una de las floras más ricas del planeta. El área designada a Tétela del Volcán, ubicada en el estado de Morelos, en el cual predominan diferentes tipos de bosques, así como hierbas y arbustos creciendo bajo los árboles; nos da un elevado número de objetos de estudio (Gómez, 2001).

Según datos de la organización Mundial de la Salud, más del 80% de la población del planeta depende del uso de plantas silvestres para la atención de enfermedades. Como es de esperarse, la distribución de esa población no es homogénea, se concentra en los países menos industrializados y que coincidentemente, poseen una importante riqueza florística y cultural (Martínez, 2000).

De las casi 260 mil especies de plantas vasculares conocidas por la ciencia, es decir, aquellas que han sido colectadas, catalogadas, nominadas científicamente y depositadas en algún herbario en el mundo, son fundamentalmente desconocidas desde cualquier otro punto de vista. En otras palabras, sus características fisiológicas, químicas, sus requerimientos ecológicos entre otros aspectos, se conocen en sólo un uno o dos por ciento (Ochoa., 1996).

Entre la inmensidad de compuestos químicos generados en estos eficaces y baratísimos laboratorios que son las plantas, los alcaloides tienen un lugar preeminente como defensas tóxicas contra sus depredadores naturales. Estas sustancias tóxicas para los herbívoros, tienen efectos diversos en otras especies de animales, como es el caso notable de la especie humana (Saldierna *et al*, 2000).

Todo lo mencionado, justifica realizar la presente investigación, con el fin de buscar elementos aplicables a la salud, como antimicrobiano de patógenos que atacan al hombre y con ello recuperar el conocimiento tradicional validado y reinsertándolo en la medicina científica.

V. MARCO TEÓRICO

Plantas Medicinales a través de la Historia

Hay evidencia, por los descubrimientos realizados junto a restos de los primeros homínidos, que hace unos 60,000 años ya se utilizaban hierbas como el malvasisco. En Perú se han encontrado utensilios con restos de coca que datan de hace unos 50,000 años y de hierbas medicinales tratan los primeros textos esculpidos que se conocen: jeroglíficos egipcios de hace unos 6,000 años se refieren al uso medicinal de las plantas. El papiro de Ebers, de 20 m de longitud, descubierto en 1873 por el egiptólogo alemán Georg Ebers, se reveló como el primer documento escrito sobre fitoterapia (el tratamiento de las enfermedades a través de las plantas). Se escribió 2,400 años a. de C., y sus primeras palabras son las siguientes: “Aquí comienza el libro que trata de la elaboración de remedios para curar todas las partes del cuerpo humano” (Puri, 1997).

En el siglo III a. de C., en Edfu, en el bajo Nilo (junto a los que hoy es Assuan), en el templo de Horus se creó una escuela de medicina en cuyo jardín se cultivaban plantas medicinales. Los egipcios se extendieron rápidamente por Mesopotamia y alcanzaron a Grecia. Se han calculado que en Babilonia se empleaban más de 200 plantas medicinales, entre ellas la belladona. Los griegos supieron aprovechar la herencia egipcia y dieron un cierto sentido científico al uso de las plantas medicinales: a cada enfermedad le aplicaban un remedio. Hipócrates, que vivió en el siglo V a. de C., siguió aplicando el mismo método, marcando pautas y dosis de administración. Hoy es considerado como el padre de la Medicina (Sabates, 1995).

En el otro extremo del continente euroasiático, las culturas orientales se desarrollaron paralelamente. El emperador Chino Shen Nung describe mil plantas medicinales 3000 años a. de C. Se sabe que en la India, un milenio más tarde, enfermedades como el asma o el resfriado común eran tratadas con cáñamo (Martínez, 2005).

Hay que esperar hasta el siglo I de nuestra era para que nazca Dioscórides. Si Hipócrates ha sido considerado como el padre de la Medicina. Dioscórides es, sin lugar a duda el padre de la fitoterapia. Su obra *Materia Médica* recoge todo el saber de su tiempo sobre las plantas medicinal: consta de 6 libros en el que describe 6,000 especies (más de 500 de plantas) (García, 1995).

En Roma, Galeno (nacido en Grecia) da un paso adelante en el conocimiento de las hierbas al marcar pautas para la extracción y formas de administración de los principios activos: utiliza para ello agua, alcohol o vinagre y describe las formas de administración, como los emplastos. En su honor, se ha denominado (galénica) la rama de la farmacia que trata de la preparación de medicamentos (Hoareaul, 1999).

Las expediciones del nuevo mundo dieron a conocer muchísimas plantas desconocidas en el viejo continente. Aparecieron los primeros herbarios americanos, como el manuscrito Badiano, escrito por el médico Azteca Martín de la Cruz: descubre plantas que revolucionaron la fitoterapia europea (Martínez, 2000).

Las Plantas Medicinales en México

México se distingue por su parte tradicional herbolaria. Se estima que las plantas medicinales usadas en el país ascienden a más de tres mil. La efectividad de muchas de ellas se ha probado de manera empírica, con base en pruebas y error: en cambio, pocas se han estudiado exhaustivamente, por lo que existe un vasto campo de trabajo para la investigación (Potter's, 1998).

La República Mexicana posee una flora muy diversa debido a su orografía, variedad climática y edafológica, así como por su situación geográfica en el continente Americano (Sabates, 1995). Dentro de la flora las plantas medicinales han sido parte importante en la historia y cultura de los pueblos indígenas. Su uso y aplicaciones para el remedio de enfermedades constituyen un conocimiento que aun es transmitido en forma oral de generación en generación como parte de las tradiciones heredadas.

A partir de 1521, con la colonización de los españoles, la cultura mexicana sufrió una transformación muy grande. Junto con los cambios políticos, sociales, económicos y religiosos que se suscitaron, se inició un intercambio de especies animales y vegetales entre América y Europa. Este hecho enriqueció la herbolaria medicinal de México, la cual incorporó desde entonces no solo plantas nativas sino también europeas (Linares, 1996).

Los religiosos franciscanos, entre otros, preocupados por reunir estos conocimientos y otros aspectos importantes de la antigua cultura indígena, fundaron el colegio de Santa Cruz de Tlatelolco en 1536, donde indígenas de familias ilustres adquirieron conocimientos diversos de la cultura occidental en español y el latín. Entre los indígenas ahí formados destacaron Martín de la Cruz y Juan Badiano de Xochimilco. El primero escribió en 1552 el manuscrito náhuatl denominado *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, conocido como Códice Badiano por la tradición latina que hiciera Juan Badiano (Lozoya, 1999).

En el mismo siglo XVI Fray Bernardino de Saghún escribió durante casi sesenta años con la colaboración de informantes indígenas, la *Historia general de las casas de Nueva España* en náhuatl y español. Esta obra se conoce como *Códice Florentino* debido a que se conserva en la biblioteca Medicea-Laureniana de la ciudad de Florencia.

En 1577 Francisco Hernández, protomédico enviado por Felipe II de España, llevo de regreso a su país muestras de plantas secas. Luego de una investigación de siete años publicó la *Historia de las plantas de la Nueva España*, que lamentablemente fue destruido por el fuego que consumió la biblioteca de El Escorial en 1671. Por fortuna, otras ediciones de su obra, como la *Historia Natural de la Nueva España*, vieron la luz gracias a las copias manuscritas que el propio Hernández mando hacer y que conservan en México y en España.

Muchos años pasaron sin que se hicieran trabajos de investigación sobre plantas medicinales hasta que fue creado el Instituto Médico Nacional en 1988 el cual abrió nuevas posibilidades de los remedios vegetales. Con todo, el auge de la farmacéutica y pérdida de tradiciones indígenas por un amplio núcleo de poblaciones a nivel nacional agotaron considerablemente el campo de la medicina herbolaria (Martínez, 2005).

En el presente siglo el eminente mexicano Maximino Martínez realizó trabajos de gran valor como *Las Plantas Medicinales de México*, *Las Plantas útiles de la flora mexicana*: Para la elaboración de éstos, se basó en las investigaciones reportadas en los *Anales del Instituto Medico Nacional*, la *Farmacopea mexicana* y otras fuentes importantes, así como en sus propias investigaciones y encuestas sobre el conocimiento popular. Sus trabajos contribuyeron enormemente al conocimiento botánico tradicional de nuestro país.

Actualmente, el estudio de las plantas medicinales se ha visto favorecido por investigaciones de diversas instituciones como la Universidad Nacional Autónoma de México, el Instituto Mexicano del Seguro Social, el Instituto Politécnico Nacional, la Universidad Autónoma de Chapingo y el Instituto Nacional de Antropología e Historia, entre otras.

Este hecho, además de que ha permitido enriquecer el campo de la medicina herbolaria, ha ayudado a la investigación de una parte importante de las tradiciones de México que se encuentran en vías de extinción (Potter's, 1998).

Las plantas nos resultan extremadamente útiles. Por una parte nos aportan el oxígeno necesario para poder respirar. Pero además nos aportan nutrientes para que podamos alimentarnos. El uso de las plantas como alimento ha supuesto una búsqueda desde los inicios de la humanidad de aquellas especies que resultaban comestibles de aquellas que no lo eran. En esta búsqueda el hombre ha experimentado en su propio cuerpo y ha comprobado como lo que pretendía que fuese un alimento se convertía en un mortal veneno (Hugo, 1980).

La importancia de las plantas medicinales se hace más patente en la actualidad en los países en vías de desarrollo.

Denominemos plantas medicinales a cualquier vegetal que contenga, en cualquiera de sus órganos alguna sustancia con actividad farmacológica que se puede utilizar con fines terapéuticos o que se puede emplear como prototipo para obtener nuevos fármacos por síntesis o hemisíntesis farmacéutica (Kuklinski, 2003). La evolución de este conocimiento ha sido larga y difícil, ya que ha sufrido las virtudes de la historia de la medicina en sus diversas vertientes culturales. Las plantas medicinales han acompañado al hombre en su peculiar historia ya sea para ser protegidas y preservadas o menospreciadas y destruidas; las mismas plantas consideradas en una época veneno mortal, instrumento diabólico y fuerte de hechicería en otras han sido milagrosas remedio, curación divina y fuente de salud (Martínez, 1996).

En el XX, los grandes avances científicos y tecnológicos permitieron desarrollar sustitutos artificiales a los productos naturales. Sin embargo, el nivel de deterioro del ambiente, a raíz de la contaminación, han producido un vuelco de mentalidad, sobre todo en países desarrollados, donde en los últimos años se ha beneficiado una tendencia de volver a los productos naturales, libres de contaminación, al uso de hierbas medicinales, plantas aromáticas o de esencias y plantas condimentarias (Morón y Sierra., 1982).

5.1. IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS MEDICINALES

La importancia de las plantas medicinales se hace más patente en la actualidad en los países en vías de desarrollo (Forés, 1997).

En países tecnológicamente avanzados como los Estados Unidos se estima que un 60 % de la población utilizan habitualmente plantas medicinales para combatir ciertas dolencias. En Japón hay más demanda de plantas medicinales que de medicinas oficiales (Rzedowski y Calderón, 2001).

La medicina moderna, a través de los análisis clínicos, ha conseguido precisar la validez de aquellas plantas que la tradición había utilizado a base del método de ensayo y error. Muchas resultaron ser validas; otras demostraron ser inocuas; otras potencialmente peligrosas. Han sido precisamente los análisis bioquímicos los que han podido determinar cuales son los componentes principales de las plantas medicinales. Los llamados principios activos (Pérez, 2001).

La capacidad de la moderna industria química de producir estos principios sin la ayuda de las plantas no supone negar la importancia que estas tienen y seguirán teniendo en el futuro. Entre los principales argumentos de defensa de las plantas medicinales tenemos los siguientes:

- ***Un banco de futuras medicinas por descubrir***

Existen aproximadamente medio millón de plantas con flores, la mayoría de los cuales no ha sido investigada y cuyos principios podrían ser decisivos en la curación de enfermedades actuales o venideras (Martínez, 2000).

- ***Medicina sinérgica***

Se ha comprobado en muchos casos que la aplicación de ciertos compuestos aislados no tienen un efecto deseado, bien porque no tiene el mismo poder curativo que cuando se toma en conjunto con el resto de componentes, o bien porque ha resultado ser tóxico.

Los componentes de las plantas tienen un efecto sinérgico, es decir interactúan todos a la vez, de manera que los usos pueden complementar o potenciar a otros o neutralizar sus posibles efectos negativos.

- ***Apoyo de la medicina oficial***

El tratamiento de enfermedades muy complejas puede requerir en algunos casos el apoyo de las propiedades medicinales de las plantas o de los derivados que ellas nos proporcionan.

- **Medicina preventiva**

Finalmente, no debemos olvidar el carácter preventivo que las plantas tienen con respecto a la aparición de enfermedades. En este sentido las plantas superan a los remedios químicos que se aplican fundamentalmente cuando ya ha aparecido la enfermedad.

Se ha comprobado cómo la ingestión de alimentos naturales puede prevenir muchas patologías. Se admite que la ingestión de vegetales con propiedades antioxidantes, especialmente aquellos que pertenecen al grupo de las brasicáceas, como coles, rábanos, etc., o ciertas liliáceas, como el ajo o la cebolla tienen la capacidad de contrarrestar la aparición de ciertas enfermedades degenerativas como el cáncer u otras enfermedades del aparato circulatorio (Sabates, 1995).

5.2. MANEJO DE LAS PLANTAS MEDICINALES

Recolección

Un aspecto básico a considerar es el lugar en el cual suele desarrollarse una planta. Viven allí donde las condiciones ambientales son las mejores para ella, lo cual significa que pueden vivir perfectamente en medios distintos, pero su crecimiento y desarrollo no será el mismo, y su rendimiento será mucho menor. Constituyen una excepción los cultivos industriales, en los que puede añadirse a la tierra un determinado abono para aumentar la productividad de una sustancia concreta, o manipularla genéticamente para que nos incremente la síntesis del producto que nos interesa (Volak y Standali, 1990). Así, mientras resulte posible, será preferible ir a recolectar plantas allí donde se desarrollan espontáneamente.

Cuando

Hay que escoger no sólo la fecha, sino las condiciones meteorológicas y la hora del día; luego escoger la temporada, posteriormente la fecha que se fijará en los primeros días de la época de recolección, por si debe anularse y ha de dejarse la salida al campo para otro día. Debe escogerse un día seco, en que luzca el sol, que no haya llovido el día anterior, y mucho mejor si no ha llovido durante mucho días antes, pues en ausencia de agua los principios activos se encuentran mucho más concentrados. Finalmente la hora: o por la mañana o por la tarde (excepto cuando, por circunstancias particulares, deba realizarse la operación a otras horas).

Como norma general, las raíces se desentierran en el período vegetativo, es decir, en otoño o en primavera. Los bulbos se recogen en otoño, después de haber madurado las semillas, que es cuando se acumulan en ellos las sustancias activas. Los tallos se cortan hacia finales de otoño, cuando las hojas han perdido su actividad.

La recolección de las hojas tiene lugar cuando están en pleno desarrollo, antes de la floración, al aparecer los primeros capullos. Las flores y las inflorescencias se cortan al inicio de su desarrollo, antes de que los pétalos se extiendan y tenga lugar la fecundación. Los frutos, tanto los carnosos como los secos, deben recolectarse en la madurez, pero antes de que empiecen a degradarse. Para recoger las semillas, en cambio, hay que esperar a que el fruto esté completamente maduro y la planta empiece a marchitarse (si el fruto se abre y deja caer las semillas, pueden recogerse del suelo). La corteza puede arrancarse durante todo el año, pero hay que escoger los árboles o arbustos de más de tres años, para no dañarlos (Muñoz, 1987).

Desecación

Una vez llegado al laboratorio hemos de actuar rápidamente para conservar la máxima cantidad de sustancias activas en la plantas. Excepto las plantas que contienen esencias volátiles, deben dejarse secar previamente al sol durante una hora. Luego la desecación se llevara a cabo en un lugar ventilado y seco, con las plantas esparcidas, preferiblemente colgadas, para que pueda circular el aire a través de ella y en todas direcciones. En ningún caso habrá dos plantas distintas en contacto. Las raíces y rizomas

deberán lavarse con agua para retirar el suelo y después dejarse secar al sol para que desaparezca la humedad en su superficie. Entonces se cortan en trocitos de unos dos centímetros de espesor, pues una vez secas sería muy difícil trocearlas. Ante la dificultad de colgarlas, pueden dejarse secar en cartones, cambiando la posición cada día; incluso pueden exponerse al sol durante el día y por la noche deben resguardarse para evitar la humedad. Los órganos carnosos pueden desecarse en una estufa si no se superan los 40 grados de temperatura (Alonso, 2004).

Con la desecación se elimina el agua, que comprende aproximadamente el 80% del peso de la planta fresca. La desecación se dará por terminada cuando las hojas dejen de estar húmedas al tacto y adquieran una consistencia rígida y se rompan al intentar desdoblarlas. La duración del proceso variara según el tipo de planta que se trate. Por lo general bastara con una semana, aunque pueden necesitarse 15 días.

Conservación

Si la desecación se ha realizado correctamente, pueden guardarse las plantas hasta el año siguiente. Debe buscarse un lugar seco, fresco y oscuro con poca diferencia de temperatura –mejor cuanto más constante sea ésta, entre verano e invierno. Las plantas pueden trocearse, clasificarse y colocan en frascos de color ámbar o verdes, pues evitan el paso de la luz y permiten ver su interior en todo momento (Alonso, 2004).

5.3. PRINCIPIOS ACTIVOS

La fuerza curativa y reparadora de las plantas medicinales viene dada por una amplia variedad de principios activos que son capaces de producir a partir de sustancias tan simples y tan comunes en el medio ambiente que nos rodean como el agua, el dióxido de carbono o el nitrógeno. Conocer a fondo como actúan estos componentes activos es indispensable para llegar a descubrir el comportamiento de las plantas en nuestro organismo y la manera en que inciden sobre nuestra salud (Martham, 1982).

Las plantas actúan como mini laboratorios químicos. A partir de dos sustancias inorgánicas como son el agua, que absorben del suelo, y el dióxido de carbono, que captan del aire, son capaces de producir glucosa a través de la fotosíntesis. Esta reacción química es posible gracias a un pigmento de color verde que únicamente se encuentra en las plantas (clorofila), capaz de captar energía del sol y transformarla en materia viva. Por este proceso químico del que participan el agua, el dióxido de carbono y la luz solar se obtienen la glucosa y el almidón, base de la vida química en la planta. La glucosa y el almidón producidos por las hojas se combinan con las sales minerales absorbidas por las raíces, lo que permite a las plantas sintetizar diversos principios activos como lípidos, taninos, glucósidos y vitaminas. Hasta ahora se han identificado más de 12,000 principios activos, muchos de los cuales son los responsables directos de la capacidad curativa de las plantas (Kukliski, 2003).

De tal manera denominamos principio activo a la sustancia química responsable de la actividad farmacológica y el uso terapéutico de un fármaco. Curiosamente, en muchos casos estos principios activos son metabolitos secundarios de las plantas, es decir, sustancias aparentemente importantes para la planta y que en muchos casos se consideran como desechos metabólicos. Desde que el hombre empezó a utilizar las plantas medicinales dando cierto enfoque científico, intentó descubrir cuales eran los componentes responsables de su propiedades curativas.

Por lo general, en una planta hay unos principios activos que podríamos denominar "principales", que son los responsables de la acción más importante, otros principios activos que se pueden considerar como secundarios, que actúan como coadyuvantes en unos casos o como moduladores de la acción de otros. Ello hace que la actividad terapéutica que se obtiene empleando el fitocomplemento sea en la mayor parte de los casos, muy distinta de la que se obtiene empleando un principio activo aisladamente.

Los principios activos de las plantas medicinales pueden aparecer en toda la planta, aunque, generalmente, las raíces y la corteza presentan los niveles más altos. Flores, semillas o frutos serían partes que contienen muchos de ellos. Estos principios pueden variar a lo largo en una misma especie y en una misma planta de acuerdo a muchos factores: época del año, características del suelo, etc. (Martham, 1982).

La medicina moderna, a través de los análisis clínicos, ha conseguido precisar la validez de aquellas plantas que la tradición había utilizado a base del método de ensayo y error. Muchas resultaron ser validas; otras demostraron ser inocuas; otras potencialmente peligrosas. Han sido precisamente estos análisis bioquímicos los que han podido determinar cuales son los componentes principales de las plantas medicinales (Kukliski, 2003).

Los principios activos que presentan las plantas son:

Los flavonoides o bioflavonoides

Son pigmentos vegetales no nitrogenados. Su función dentro del mundo de las plantas parece ser la de atraer a los polinizadores hacia las flores o los animales que comen los frutos con la intención de que puedan dispersar mejor las semillas.

Se han descubierto más de 600 flavonoides. Todos ellos parecen tener un papel muy importante en la alimentación humana, dado que presentan propiedades medicinales muy interesantes como antiinflamatorios y antialérgicos, por sus propiedades antitrombóticas y vasoprotectoras, por la inhibición de la promoción de tumores y como protectores de la mucosa gástrica. Estos efectos se han atribuido a la influencia de los flavonoides sobre el metabolismo del ácido araquidónico. Muchas plantas que contienen flavonoides son diuréticas (p. Ej. Buchú y retama) o antiespasmódicas (como regaliz y perejil). Algunos flavonoides poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas (Bhogaman, 1978).

Alcaloides

Desde un punto de vista farmacológico se trata de las sustancias mas activas entre las presentes en la naturaleza, porque algunas representan los venenos más potentes conocidos. Químicamente los alcaloides son sustancias orgánicas nitrogenadas de naturaleza alcalina. Algunos son líquidos, y en este caso no contienen oxígeno; la mayoría de las veces son sólidos cristalizables y contienen oxígeno. Otra característica química es la posibilidad de precipitar sus soluciones mediante reactivos específicos que sirven para determinar y evaluar su presencia. En la naturaleza, en general, están presentes en estado de sal, mas raramente como bases libres.

Todavía no esta clara la función de los alcaloides en las plantas. Descartada la hipótesis de que se trata de hormonas vegetales, pero es cierto que están ligados a factores dependientes del crecimiento vegetativo o en relación con fases de asimilación.

Es curioso el hecho de que la mayor parte están presentes y, en mayor cantidad, en las plantas vasculares superiores (dicotiledóneas) y sólo en algunas grandes familias como las apocináceas, papaveráceas, papilionáceas, ranunculáceas, rubiáceas, solanáceas y no, por ejemplo, en las rosáceas o en las labiadas. Otros grupos de alcaloides ampliamente representados tienden a presentar constituciones siempre similares reproducidas mediante técnicas de cultivo (abono oportuno, hibridación) para aumentar o disminuir la producción de ciertas partes de la planta (Bhogama, 1978).

Glucósidos

Estas sustancias, muy difundidas en la naturaleza, constituyen otro importantísimo grupo de principios activos de las plantas medicinales. Su característica química común es la de ser compuestos orgánicos derivados siempre de la unión de un azúcar con otros compuestos denominados aglicones. El azúcar en general es el d-glucosio y sólo en este caso es más apropiada la definición de glucósidos; pero muchos otros pueden ser los azúcares presentes: ramnosio, galactosio, ribosio, digitalosio. En todos estos casos es más correcto hablar de “glucósidos”.

La unión entre el azúcar y el aglicone “enlace glucosídico” son siempre la parte farmacológica activa del compuesto. En las plantas los glucósidos están ligados al metabolismo de la misma en relación a situaciones nocivas para ella: explican actividad reguladora y protectora.

Taninos

Estos compuestos están presentes con mayor frecuencia en las ericáceas, las leguminosas, las rosáceas y las salicáceas. Se utilizan mucho en medicina como astringentes en el tratamiento de diarreas, inflamaciones, enrojecimientos y, para uso externo en las heridas. Poseen otras aplicaciones como la preparación de tintes y la curtición (Martham, 1982).

En las plantas medicinales los taninos pueden formarse con azúcares y se hablara propiamente de un “tanósido” o “glucósido tanoide” o ser tanoide libre, hidrolizables, y taninos condensados. Los tanoides constituyen un grupo de derivados del ácido clorofénico, presentes en el café, té, mate, tabaco y maticán mismos que poseen propiedades astringentes. Además las plantas con taninos deben conservarse no más de dos años, siempre al resguardo de la luz, para evitar el ennegrecimiento del fármaco y la consiguiente pérdida de actividad.

Aceites esenciales

En un pasado no muy lejano, los aceites esenciales, sinónimo de “esencias” estaban conceptualmente ligados a la preparación de perfumes y bálsamos. Actualmente constituyen una rama completa de la Fitoterapia denominada Aromaterapia.

Los aceites esenciales, sustancias orgánicas entre mas variadas y complejas, están presentes en casi todas las plantas, pero de forma particular en las labiadas, coníferas, mirtáceas, liliáceas, lauráceas, umbelíferas, rutáceas y compuestas. Fundamentalmente, poseen propiedades antisépticas por el coeficiente fenólico que poseen. Constituyen productos de reserva derivados del metabolismo de la planta.

Mucílagos

Son polisacáridos glúcidos de larga cadena, difundido en algunos grupos específicos de las plantas medicinales, que precisamente, se denominan mucilaginosas. Son en parte solubles en agua en la cual se hinchan y es esta propiedad específica la que se usa en terapia. Se forman en los procesos vitales de los vegetales y aseguran a

las plantas protección contra la sequedad y el desecamiento. Entre los glúcidos podemos encontrar los almidones, la pectina, la goma y la celulosa. Es una característica común de todas las plantas comprendidas en este grupo la absorción de agua en cantidades notables (Chiereghin, 2000).

5.4. FACTORES ABIÓTICOS Y BIÓTICOS QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

Los principios activos que finalmente pasan al plano de la manufactura farmacéutica han de hacerlo a través de diversos factores. Todos los cuales pueden influir en la naturaleza y concentración de los principios activos presentes (Trese-Evans, 1998). Estos aspectos son:

Factores climáticos, atmosféricos, edafológicos y topográficos

Los factores climáticos condicionan en gran medida el establecimiento de un determinado tipo de vegetación en una región, ya que no sólo afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas, sino que inciden notablemente en la biosíntesis de sus principios activos. Se ha comprobado cómo las mismas plantas, cuando son cultivadas en zonas de diferente climatología, presentan distinta composición química, tanto en calidad como en cantidad (Evans, 1996).

Las variables climáticas que afectan al rendimiento en principios activos de las plantas medicinales son: temperatura, humedad, radiación solar en sus dos vertientes, luz y calor, y régimen de vientos.

1. **Temperatura.** La temperatura es un factor de gran importancia en el control del desarrollo de metabolitos de las plantas. Aunque cada especie ha llegado a adaptarse a su propio entorno natural, las plantas pueden ser capaces de vivir dentro de una considerable variación de temperatura. En general, la formación de esencias parece elevarse con temperaturas altas, aunque en días muy cálidos puede producirse una excesiva pérdida de esencias.
2. **Lluvia.** El grado de hidratación del suelo y de la atmósfera inciden directamente en el buen desarrollo de las plantas. El exceso y el efecto de agua en el suelo pueden ser factores limitantes para el crecimiento y el metabolismo de determinadas plantas medicinales. Se han citado resultados variables respecto a la producción de esencias bajo diferentes condiciones de lluvia y, en algunos casos, debe ello relacionarse con el desarrollo de pelos glandulosos. Una lluvia continua puede llegar a una pérdida de sustancias hidrosolubles de las hojas y raíces por maceración, hecho conocido y aplicable a algunas plantas productoras de alcaloides (especialmente de Solanáceas), heterósidos e incluso esencias. Esto se relaciona con bajos rendimientos de algunos principios activos de las plantas en estaciones húmedas, condiciones que en general, parecían aceptables.

- 3. Radiación solar.** Cada planta necesita una determinada cantidad de luz para alcanzar un buen desarrollo y para poder realizar sus funciones metabólicas. Está comprobado que este factor influye notablemente en la biosíntesis de los principios activos de las plantas medicinales. La variación diaria en la producción de metabolitos secundarios esta probablemente bajo el control de la luz (Bisset, 1994).

Factores edafológicos

Las características físicas y químicas de los suelos influyen de forma importante en la producción de las plantas medicinales.

1.- Características físicas. El suelo está formado por un agregado de partículas de tamaño diferente (textura) y por la asociación de estas partículas elementales en agregados (estructura). La textura y la estructura unidas a la composición química del suelo confieren a éstos otros caracteres como son: porosidad y grado de aireación, capacidad de retención de agua y temperatura. Estas características pueden afectar positivamente o negativamente a la producción de ciertos metabolitos en ciertas plantas (*Althaea officinalis*, como ejemplo), que producen mucílagos como producto que retiene agua, contienen menos mucílagos cuando crecen sobre un suelo de alto contenido de humedad.

2.- Características químicas. La composición química del suelo puede afectar no sólo el desarrollo y, por tanto, a la composición química de las plantas medicinales, sino también puede ser un factor que limite su crecimiento. El pH del suelo, que depende de la composición del mismo, es una importante variable a tener en cuenta. Existen plantas preferentemente acidófilas y plantas que requieren suelos alcalinos para su desarrollo. También son importantes la riqueza de materia orgánica y el contenido de nutrientes minerales. Se ha comprobado científicamente cómo la incorporación al suelo de abonos nitrogenados puede contribuir a un incremento tanto en la masa vegetal como de alguno de sus metabolitos secundarios, como el caso de los alcaloides, y como la incorporación de manganeso y molibdeno induce un incremento en el contenido de heterósidos digitálicos (Ángel, 1999).

Factores topográficos

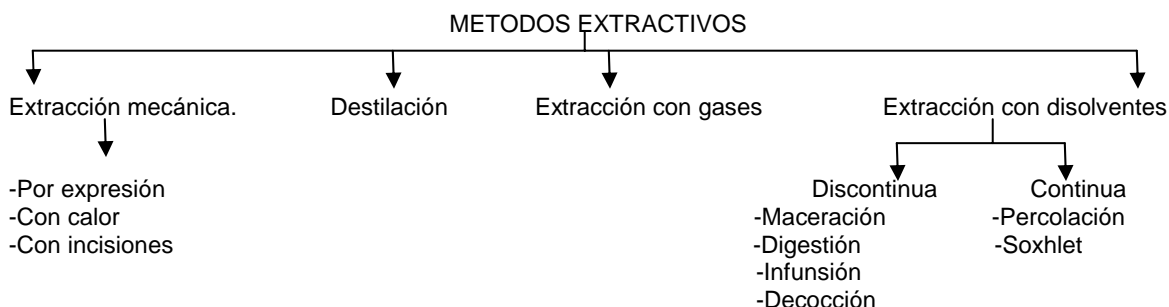
El relieve ejerce una influencia marcada sobre las condiciones térmicas originando climas locales especiales. La temperatura decrece regularmente con la altitud a razón de 0.55 °C por cada 100 m de elevación. Este gradiente altitudinal de temperatura es la causa principal de que existan distintos pisos de vegetación en las laderas de montaña.

La topografía también puede condicionar el grado de radiación solar que incide sobre la vegetación. Por tanto, los caracteres topográficos son, en muchos casos, determinantes para la producción de plantas medicinales. Así se encuentran especies cuya cantidad y calidad en principios activos están estrechamente relacionadas con la altitud como los pinares.

5.5. EXTRACCIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

Para extraer el principio activo se realiza un proceso extractivo para aislar los principios activos directamente a partir de la planta medicinal. Hay varios métodos los cuales se muestran en el siguiente diagrama de flujo (Fig 1).

Fig. 1.- Métodos extractivos (Kukliski, 2003).



Extracción mecánica: Es una técnica que permite obtener los principios activos disueltos en los fluidos propios de la planta, los cuales una vez extraídos se denominan jugo. La extracción mecánica se puede realizar:

Por expresión:

*Por calor.

*Mediante incisiones por las que fluyen los fluidos de la planta.

Destilación: Es una técnica que se basa en la diferente volatilidad de los componentes del principio activo, lo cual permite la separación de los componentes volátiles de otro que son menos o nada volátiles. Se suelen hacer destilaciones por arrastre de vapor o hidrodestilaciones que facilitan la extracción de principios activos volátiles. La destilación permite obtener la esencia del fármaco. Es un método en el que se utiliza una fuente de calor, por lo que solo se aplica a principios activos termoestables (Kukliski, 2003).

Extracción con gases en condiciones supercríticas: Se trabaja con dispositivos especiales donde es posible controlar la presión y la temperatura y a presión (P) y temperatura (T) superiores a la P y T críticas. Los gases más utilizados son el dióxido de carbono y el butano, si bien la extracción con butano es bastante peligrosa, ya que es un gas muy inflamable. La extracción con gases suele ser muy selectiva y posteriormente es relativamente sencillo eliminar el gas extractor, pero resulta muy cara y es difícil encontrar las condiciones óptimas de presión y temperatura (Kukliski, 2003).

Extracción con disolventes: Consiste en poner en contacto el fármaco con un disolvente capaz de solubilizar los principios activos. Los principios activos deben pasar del fármaco al disolvente de manera que se obtenga un extracto líquido. Posteriormente dicho extracto se puede concentrar eliminando la mayor o menor cantidad de disolvente. La extracción con disolventes es uno de los métodos que se emplean con más frecuencia para la obtención de principios activos.

Para que la extracción con solventes se lleve a cabo correctamente hay que tener en cuenta diversos factores (Bhogama, 1978).

- a. **Características de la planta medicinal:** se debe trabajar con plantas medicinales desecadas y con un grado de división adecuado (mayor en plantas medicinales duras como la corteza y menor en plantas medicinales más blandas como flores y hojas) para facilitar el máximo contacto entre los principios activos y el disolvente.
- b. **Naturaleza del disolvente:** principalmente se utilizan en las extracciones el agua y las mezclas hidroalcohólicas (agua y alcohol etílico) en proporción variable. También es posible utilizar otros disolventes orgánicos como acetona, éter etílico (poco usado actualmente), hexano, propilenglicol (muy usado en cosmética), entre otros. El agua es un buen disolvente de muchos principios activos de la droga pero por esta misma razón resulta generalmente poco selectivo. Además muchos principios activos se hidrolizan en agua. Por otra parte, los extractos acuosos tienen una estabilidad poco duradera una vez preparados y deben ser obtenidos para ser utilizados en un periodo de tiempo relativamente corto. Utilizar mezclas variables de agua y alcohol permite seleccionar las sustancias que se desea extraer. Se puede hacer extracciones sucesivas variando los disolventes y con ello se consigue separar los principios activos de las sustancias sin interés farmacológico así como separar los principios activos entre sí (Kukliski, 2003).
- c. **Temperatura :** el aumento de temperatura favorece la extracción de principios activos de las plantas medicinales porque aumenta su solubilidad en los disolventes utilizados, pero a su vez se puede favorecer la degradación de dichos principios activos, por lo que es necesario controlarla para conseguir una máxima extracción sin consecuencia indeseable para los principios activos. En ningún caso se puede utilizar temperaturas elevadas para extraer principios activos termolábiles.
- d. **Tiempo de contacto entre la planta medicinal y el disolvente:** depende de las características del fármaco (dureza, grado de división, etc.) y de la naturaleza de los principios activos (volátiles, hidrolizables, oxidables, etc.).
- e. **Control de la difusión celular:** una correcta difusión se consigue cuando la droga ofrece un grado de división adecuado (mayor superficie de difusión) y cuando se renueva correctamente el disolvente utilizado en las extracciones. Cuando la droga contacta con el disolvente, se produce una difusión de los principios activos de la droga hacia el disolvente debido a que en la droga la concentración de principios activos es superior a la concentración en disolventes utilizando en la extracción. Dicha difusión se produce hasta alcanzar el equilibrio. Conviene renovar el disolvente para evitar que se detenga la extracción porque se ha alcanzado una situación de equilibrio. Al renovar el disolvente se mantiene una diferencia de concentración de principios activos entre la droga y el disolvente, lo cual permite que se produzca la difusión celular pasiva.

Los diferentes tipos de extracción se pueden englobar en dos grupo: las extracciones discontinuas y las extracciones continuas (Bhogama, 1978).

Extracción discontinua o simultánea: Se sumerge la planta medicinal en el disolvente, por la que la totalidad de la planta este en contacto con el disolvente utilizado para la extracción y la difusión de los principios activos se producirá en todas direcciones hasta alcanzar el equilibrio.

La extracción discontinua incluye varios procedimientos de extracción:

Maceración: consiste en poner en contacto la planta medicinal seca triturada con el disolvente utilizando para la extracción a temperatura ambiente, manteniéndolo todo en agitación durante un tiempo determinado que depende de las características del fármaco y de la naturaleza de los principios activos (normalmente días). Se utilizan normalmente agua, glicerina o mezclas hidroalcohólicas. A continuación se decanta el conjunto obteniéndose por una parte el extracto líquido con los principios activos y por otro un residuo de la droga denominado marco. Para mejorar el rendimiento de la extracción es habitual volver a realizar otra maceración con el marco (Kukliski, 2003).

La maceración se utiliza cuando los principios activos son muy solubles y la estructura de la droga es muy permeable al disolvente (hojas, flores poco compactas). Es útil principalmente para la extracción de principios activos termolábiles, ya que se trabaja a temperatura ambiente (Bhogaman, 1978).

Digestión: es un método extractivo similar a la maceración pero en el que se trabaja a temperatura más elevada.

Infusión: se trabaja con un disolvente (agua) a temperatura próxima a la ebullición, en el que se introduce la droga que se quiere extraer y a continuación se deja enfriar el conjunto hasta temperatura ambiente.

Decocción o cocimiento: se pone en contacto la planta medicinal con el disolvente (agua) y el conjunto se lleva a cabo hasta la temperatura de ebullición, manteniendo dicha ebullición durante 15-30 minutos. Una vez enfriado se filtra, y se exprime el residuo. El tiempo de decocción se aplica sobre todos los fármacos vegetales duros en las que resulta difícil el contacto entre los principios activos y el disolvente debido a sus características histológicas y a drogas vegetales con principios activos difíciles de disolver que precisan una temperatura elevada y un tiempo prolongado para su disolución (Cosat y Smith, 1996).

Tanto en las infusiones como en las decocciones se utiliza como disolvente siempre el agua, por lo que no resultaran métodos adecuados para extraer principios activos hidrolizables.

Extracción continua o progresiva: el disolvente utilizado para la extracción se va renovando y actúa en una sola dirección. Son métodos que consisten en poner en contacto la droga con el disolvente adecuado y mantener en todo momento el desequilibrio entre la concentración de principio activo en el fármaco y en el disolvente para que produzca la difusión celular.

Se utilizan varios métodos de extracción continua entre los cuales se encuentran:

Percolación: es un procedimiento que se utiliza a temperatura ambiente. La planta medicinal se coloca en una columna y esta en contacto permanente con el disolvente que gotea por la parte superior de la columna, atraviesa toda la zona donde se encuentra la planta medicinal con los principios activos, lo va extrayendo y, por la parte inferior, se recogen los líquidos extractivos que contienen los principios activos. La percolación puede llegar a conseguir extracciones prácticamente completas del principio activo, pero con un elevado consumo de disolvente (Kukliski, 2003).

Soxhlet: es un sistema de extracción sólido-líquido en el que la extracción se realiza en un aparato soxhlet en donde el disolvente orgánico se va reciclando durante el proceso mientras que los principios activos se van concentrando en el matraz inferior.

El Rotavapor: La destilación a través del rotavapor es otro método de separación que se basa en la diferente volatilidad de los componentes del principio activo, lo cual permite la separación de los componentes volátiles de otro que son menos o nada volátiles. Se suelen hacer destilaciones por arrastre de vapor o hidrodestilaciones que facilitan la extracción de principios activos volátiles. La destilación permite obtener la esencia de la planta medicinal (Kukliski, 2003).

5.6. METODOS DE EVALUACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

Una vez que los extractos se han preparado, se someten a un proceso de separación utilizando una o la combinación de dos o más técnicas cromatográficas, de las cuales las más comunes son:

Cromatografía

La cromatografía es un método de separación de compuestos basado en su distinta adsorción sobre superficies adsorbentes sólidas o líquidas de tipos diversos. En los métodos cromatográficos (de papel, capa fina, en columna y de gases) la separación se consigue casi siempre haciendo fluir la mezcla a través de una columna de adsorbente. Los componentes pueden ser recogidos como fracciones separadas, para posteriormente analizar su composición química, mediante espectroscopia (Harborne, 1984).

Resonancia de energía nuclear

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es una de las técnicas de elucidación estructural más útiles. La técnica proporciona información sobre la estructura molecular a base de examinar las propiedades magnéticas de átomos específicos de las moléculas. La muestra a analizar se coloca en un tubo situado entre los polos de un potente imán. Las muestras se analizan por lo general en solución, y los tubos que las contienen se hacen girar rápidamente, para promediar las posibles orientaciones espaciales de las moléculas.

Durante el análisis por RMN, se perturban energéticamente los núcleos mediante una combinación del campo magnético aplicado y de la radiación de radiofrecuencias. Cuando la energía que se hace incidir sobre un núcleo iguala la diferencia de energía entre los estados del spin, se alcanza la llamada condición de resonancia, y se absorbe energía al mismo tiempo que el núcleo pasa de un estado de spin a otro (Keeler, 1983).

Espectroscopia de infrarrojo

La espectroscopia infrarroja es un método físico de análisis que se basa en la absorción de fotones y constituye también, un instrumento indispensable para la obtención de datos estructurales de sustancias orgánicas, se aplica como técnica analítica y cualitativa en sistemas orgánicos. La aplicación analítica de esta valiosa técnica se encuentra en el espectro cualitativo dentro de la máquina, para conocer compuestos químicos desconocidos y así obtener información sobre la presencia o ausencia de grupos funcionales presentes.

El espectro infrarrojo de una sustancia es único. La técnica de infrarrojo es muy útil para la comprobación de la identidad de preparaciones orgánicas a gran escala y para controlar los procesos de producción continuos (Preadeau, 1998). Para tal efecto se utiliza un espectrofotómetro de IR, registrándose a partir de una solución cloroformica en tetracloruro de carbono a la muestra preparada en lugol o en estado sólido en una pastilla de bromuro de potasio, este último consiste en pulverizar la muestra, añadir bromuro de potasio y continuar moliendo hasta que la muestra se haya mezclado por completo. La mezcla se transfiere a una matriz (papel secante), que es luego evacuada para eliminar el aire atrapado. Posteriormente se comprime hasta obtener un disco claro por aplicación de presiones entre 1000 y 3000 kg. / cm². La muestra obtenida por este procedimiento puede colocarse directamente en el espectrofotómetro. El papel secante actúa como soporte de la muestra. Después de examinar la muestra por vía espectral, la pastilla puede desecarse o conservarse en una bolsa de plástico bien cerrada.

Otra técnica que ayuda en la identificación de los principios activos son: la formación de derivados, la semisíntesis o síntesis total de los compuestos aislados, son muchas veces imprescindibles para determinar completamente su estructura, así como las relaciones específicas que presentan algunas sustancias por su grupos funcionales.

5.7. PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Las pruebas de sensibilidad son técnicas que investigan la actividad de distintos agentes quimioterapéuticos frente al microorganismo; sirven para identificar al microorganismo y para implantar la terapia más efectiva.

La prueba de sensibilidad, el antibiograma, es una técnica especializada, en la que los resultados en cuanto a su sensibilidad y resistencia se comportan paralelamente. El seguimiento periódico de la micro ecología, nos dará entre otras cosas, las pautas a seguir no sólo en el uso de antimicrobianos, sino también en la decisión sobre normas complementarias de profilaxis higiénica (Cosat *et al.*, 1996).

El antibiograma mide la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección, a uno o varios antibióticos. En efecto, la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficiencia *in vivo* de un tratamiento antimicrobiano. El antibiograma sirve, en primer lugar, para orientar las decisiones terapéuticas individuales para posteriormente seguir la evolución de las resistencias bacterianas. Gracias a este seguimiento epidemiológico, a escala de un servicio, un centro de atención médica, una región o un país puede adaptarse la antibioterapia empírica, así mismo revisar regularmente los espectros clínicos de los antibióticos y adoptarse ciertas decisiones sanitarias así como el establecimiento de programas de prevención en los hospitales (Elfo, 1988).

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) es la base de la medida de la sensibilidad de una bacteria a un determinado antibiótico. La CMI se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano frente a diferentes especies bacterianas. Las pautas para el tratamiento antibiótico están destinadas por lo común a la técnica de difusión de discos (prueba de Kirby-Bauer), en las que las interpretaciones clínicas derivan de las correlaciones con las pruebas de referencia (Koneman *et al.*, 1992).

La OMS ha establecido en sus manuales las normas y técnicas generales para la "standardización" del método. Asimismo sobre el medio de cultivo universal existe la normalización de los halos para cada antimicrobiano sometido a prueba, método de Kirby-Bauer (Cohen, 1992).

Agentes antimicrobianos

Pueden dividirse en dos grupos: quimioterapéuticos y antibióticos. Los quimioterapéuticos son compuestos que impiden el crecimiento bacteriano, compitiendo, en general, con intermediarios metabólicos. Los antibióticos son sustancias producidas por microorganismos que impiden el crecimiento de otros microorganismos (Herbert, 1990).

Los principios activos de las plantas son los precursores básicos de una gran cantidad de antibióticos presentes en la actualidad (Cohen, 1992).

El mecanismo de acción de los antibióticos puede abarcar distintos niveles desde lesionar de forma selectiva la membrana celular en algunas especies de hongos o bacterias, hasta bloquear la síntesis de proteínas bacterianas, por lo cual se habla de dos grupos:

Antibióticos bactericidas: Estos ejercen una acción lenta e irreversible sobre el microorganismo, provocando la lisis y por ende la muerte inmediata del patógeno. Este tipo de lisis se obtiene según diversos mecanismos moleculares provocados por el antibiótico en el interior del microorganismo (Herbert, 1990).

Los antibióticos bactericidas pueden lesionar de forma selectiva la membrana celular en algunas especies de hongos o bacterias; también pueden bloquear la síntesis de proteínas bacterianas (Elfo, 1988).

Antibióticos bacteriostáticos: Inhiben el crecimiento pero no matan al microorganismo, permitiendo que las proteínas de defensa del huésped puedan eliminar a la bacteria (Mendoza, 1998).

5.8. ANTIBIOGRAMAS

El aislamiento de un agente infeccioso a partir de un paciente no es con frecuencia suficiente para establecer la terapia adecuada. Muchas bacterias y algunos hongos presentan resistencia a los agentes antimicrobianos más actuales. Los patrones de resistencia cambian en forma constante y no importa lo rápidamente que se introduzcan los nuevos agentes terapéuticos porque los microbios parecen siempre dispuestos a superarlos (Hernández y Rodríguez, 2001).

Ya que no se puede predecir la susceptibilidad de las bacterias, hongos y virus a los agentes antimicrobianos, con frecuencia es necesario estudiar la sensibilidad individual de cada patógeno con la planta medicinal, pudiéndose elegir entonces el agente apropiado (el más activo contra el patógeno, el menos tóxico para el huésped, con las características farmacológicas apropiadas y el más económico), que proporcione mayor posibilidades de una evolución favorable (Hoareaul, 1999).

Una vez realizada la identificación del microorganismo, es necesario efectuar las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (antibiograma). El primer objetivo del antibiograma es medir la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección, a uno o varios antibióticos. En efecto, la sensibilidad *in vitro* de un tratamiento antibiótico (Coas y Smith, 1996).

El segundo objetivo del antibiograma es el de seguir la evolución de las resistencias bacterianas. Gracias a este seguimiento epidemiológico, a escala de un servicio, un centro de atención médica, una región o un país, es como se puede adaptar la antibioterapia empírica (González, 1992).

Se han descrito tres pruebas de gran valor para la determinación rutinaria de los antibióticos; la de dilución seriada en medio líquido, la de diluciones seriadas en un medio sólido y la de difusión de placa que utiliza el método de Kirby-Bauer el cual permite determinar la sensibilidad de un microorganismo a diferentes antibióticos. Es importante tener en cuenta que para realizar el antibiograma el microorganismo debe encontrarse puro. El método de Kirby-Bauer es el más ampliamente usado, este método es una prueba de difusión en disco de papel (sensidiscos) embebidos en concentraciones de soluciones de antibióticos y que subsecuentemente se han dejado secar (Hernández, 1996).

Al sembrar una placa con un cultivo en particular de bacteria u hongos se colocan discos con antibiótico sobre la superficie de la placa, el antibiótico se difundirá hacia el medio de cultivo. Si el cultivo es sensible a un antibiótico se presenta una zona de inhibición de crecimiento, alrededor del disco que contenga ese antibiótico, si el microorganismo es resistente al antibiótico se observará desarrollo hasta llegar al disco y en algunos casos, por debajo de este (Cosat *et al.*, 1996).

5.9. ORGANISMOS PATÓGENOS DEL HOMBRE

Las infecciones del ser humano son producidas por una gran variedad de organismos patógenos. Muchos de ellos son microorganismos (microbios), los microorganismos de importancia médica se encuentran reunidos en cinco grupos: rickettsias y clamidas, virus, protozoarios, hongos y bacterias (Levy, 1998).

A continuación se hará mención de los diez microorganismos que se utilizaron frente al principio activo de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K.

BACTERIAS

Mycobacterium phlei

Se encuentra en el heno, pasto, suelo y polvo. Anaerobios, son cepas saprofitas que elaboran *micobactina*, son acidorresistentes. Se encuentran en casi todos los tejidos orgánicos.

Corynebacterium xerosis

Al género *Corynebacterium xerosis* que se les da a los abultamientos en forma de clave que con frecuencia se ven en los extremos de los bacilos, en especial de cultivos viejos. *Corynebacterium xerosis* es un comensal habitual que coloniza la piel humana normal, la nasofaringe y el saco conjuntival. Este microorganismo es una causa rara de infecciones humanas, incluidas bacterias clínicamente importantes, endocarditis, infecciones de heridas, neumonía y osteomielitis vertebral. *C. xerosis* es habitualmente sensible a penicilina, cefalosporinas y vancomicina, pero se ha informado resistencia a múltiples antibióticos (Devienne y Raddi, 2002).

Escherichia coli

Es la especie bacteriana más comúnmente recuperada en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que involucran virtualmente todos los tejidos humanos y sistemas de organismos. Las infecciones del tracto urinario y las heridas, la neumonía en pacientes hospitalizados inmunosuprimidos y las meningitis en los neonatos son otras formas comunes de infecciones causada por *E. Coli* (Levy, 1998).

Staphylococcus aureus

Es un coco que crece agrupado en racimos (de ahí su raíz "Staphylo"), que responde positivamente a la tinción de Gram, es aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmósfera con oxígeno y también sin el mismo, no presenta movilidad ni forma cápsula. Es capaz de crecer hasta con un 10 % en sal común. Por esto puede crecer en el agua del mar (Tomas *et al.*, 1988).

Causa infección de piel y partes blandas así como la Neumonía (Varma, 1995).

HONGOS

Candida albicans

Hongo dimorfo que forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidios (células gemantes subesféricas de 3-8 x 2-7 μm). Asimilan y fermentan azúcares. Colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas, de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura (Allen, 1997).

Candida albicans está asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente. Su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C. Los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital (vagina), son los reservorios más importantes en los seres humanos y origen de candidiasis endógenas. *Candida albicans* no sobrevive durante mucho tiempo en superficies secas pero su supervivencia es mayor cuando hay humedad. Se ha aislado de los cepillos dentales, cremas de manos, cosméticos y ropa (Varma, 1995 y Stainer, 1996).

Candida tropicales

Infección más frecuente es el tracto gastrointestinal debido a que se encuentra alterada la integridad del epitelio por el uso de agentes quimioterápicos. La forma de presentación de la candidiasis diseminada comprende la forma aguda y la crónica (Stainer, 2000).

Cryptococcus neoformans

C. neoformans. Es una levadura cuyo hábitat natural es el suelo en particular los desechos con pH alcalino y ricos en nitrógeno. Estas condiciones se cumplen en forma óptima en suelos mezclados con deyecciones de pavos, palomas, gaviotas y otras aves (Esteban y Fernandez, 2000). Los arqueólogos y los exploradores que frecuentan cuevas infestadas por murciélagos también tienen mayor riesgo (Brock, 1991).

Candida krusei

Se considera como un hongo oportunista, pues da origen a la candidiasis o monoliasis (cutánea y peroniquia) en individuos débiles y diabéticos. Ocasionalmente produce infecciones como la endocarditis o diarrea infantiles, afectando la piel (Mendoza, 1998).

Candida Stellatoidea

Ocasionalmente produce infecciones como la endocarditis o diarreas infantiles, afecta la piel (González 1996).

Geotrichum sp.

En el organismo humano se han aislado del aparato respiratorio, cavidad bucal y aparato digestivo, pero también se han encontrado en otras partes del cuerpo, este organismo patógeno causa graves lesiones sobre todo a nivel bucal. Produce la geotricosis que es una enfermedad por lo general crónica y poco frecuente, es un habitante micótico común de la parte superior de los aparatos respiratorios y digestivo (Robinson, 2000).

6. MEDIOS DE CULTIVO

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial deben de reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe de contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante (Leal, 1986).

La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y pepsina a la que se añaden otros ingredientes. El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo (Berridge *et al.*, 1996).

Los medios de cultivo pueden ser:

Medios para aislamiento primario: Para usos generales, no selectivos, para cultivos de una amplia variedad de organismos difíciles de hacer crecer. A menudo están enriquecidos con materiales como: sangre, suero, hemoglobina, glutamina, u otros factores para el crecimiento de las bacterias. Este tipo medio de cultivo es el más usado en las pruebas de sensibilidad, debido a su riqueza de nutrientes, lo cual permite la pronta proliferación de bacterias y hongos. Dentro de este tipo de medios de cultivo tenemos el Agar de Sabourand (para hongos) y Muller-Hinton (para bacterias).

Selectivos: pueden ser de moderada o alta selectividad; se añaden sustancias que inhiben el crecimiento de ciertos grupos de bacterias, pero permitiendo a la vez el crecimiento de otras (Cowan, 1991).

6.1 TÉCNICA DE SIEMBRA

Técnica de Kirby-Bauer

Esta técnica consiste en la estandarización del inóculo de cultivo, mediante una escala turbidimétrica, en la cual, se enumeran varios tubos de ensayo, dependiendo de la concentración de microorganismos que contengan cada tubo de la escala. El inóculo se ajusta a un patrón de referencia mediante la comparación visual, o por espectrofotómetro, haciendo coincidir la absorbancia (Lynch, 1997). La escala utilizada y aceptada mundialmente, es la de Mc. Falang.

Técnica de Barry

Consiste en la siembra inmediata tras el vertido del medio de cultivo en la placa. Para ello, se tienen un medio de cultivo fundido, específico para bacterias (Agar Muller-Hinton) y hongos (Agar de Sbouraund), en el cual se vertirá el inóculo microbiológico estandarizado con la escala antes mencionada y se dejara solidificar. Esta técnica es utilizada para sacar la concentración mínima inhibitoria (Koneman y Allen, 1997).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) no presenta un valor absoluto, incluso bajo los mejores condiciones un examen de dilución no mostrara 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.

6.2. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA

Realizar estudios de toxicidad para evaluar los posibles efectos tóxicos de los principios activos son indispensables. De hecho, en los últimos veinte años han demostrado un vertiginoso crecimiento en el interés de lo efectos que pueden causar los principios activos, su posible valor y su uso en nuestra moderna sociedad industrial y urbanizada (Frank, 1998).

Es imprescindible establecer los efectos tóxicos de los farmacos y sus principios activos y para ello se realizan estudios de toxicidad aguda, toxicidad subaguda y toxicidad crónica sobre animales de experimentación.

1.- Toxicidad aguda. Son ensayos que se realizan a corto plazo de forma prácticamente inmediata, generalmente por administración de una dosis a animales de experimentación. Se pueden determinar los parámetros:

- A) *Dosis mortal mínima:* Cantidad de droga o principio activo necesario para matar un kilogramo de animal.
- B) *Dosis letal media o dosis letal 50 (DL₅₀):* Cantidad de droga o principio activo necesario para producir la muerte de la mitad de los animales de experimentación a los que se ha administrado la dosis.

2.- Toxicidad sub-aguda o sub-crónica: son ensayos que se realizan a mediano plazo, generalmente a 30 días (un mes) pero también en muchos casos a 90 días (3 meses). Se administran dosis terapéuticas y trascurriendo el periodo de tiempo se evalúan los posibles casos de intoxicación.

3.- Toxicidad crónica: Son ensayos que se realizan a largo plazo, y en periodo de tiempo pueden oscilar entre varios meses y 3 años. Se administran dosis terapéuticas de forma continuada. La principal finalidad es evaluar posibles efectos teratogénicos, (capacidad para producir alteraciones en el feto) efectos carcinógenos (capacidad para desarrollar cánceres) y efectos mutagénicos (capacidad para producir mutaciones) (Ted, 1998).

Micro técnica con *Artemia salina* Leach

Una vez que las fuentes potenciales han sido preseleccionadas se realizan las pruebas biológicas de selección. Estas pruebas conciben en la determinación del efecto biológico de los extractos naturales mediante la aplicación de los bioensayos apropiados. Los extractos que demuestren respuestas positivas en los ensayos biológicos se concederán idóneos para la realización de estudios químicos biodirigidos.

Es importante descartar que los ensayos simples de carácter general solo se podrán realizar para la prueba de selección y para realizar estudios biodirigidos con la finalidad de aislar compuestos activos, pero posteriormente será necesario realizar evaluaciones biológicas más complejas y de carácter específico. Entre las evaluaciones biológicas de carácter general destaca por su sencillez y economía la determinación de la letalidad o toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach. En general los compuestos bioactivos son tóxicos a dosis bajas, por tanto la toxicidad de extractos vegetales para el organismo antes mencionado, puede ser empleado como una guía para aislar sustancias bioactivas. El método consiste en evaluar extractos, fracciones o compuestos puros en concentraciones de 10, 100 y 1000 mg/mL. El material objeto de la evaluación se coloca en viales (tres viales por cada concentración). Posteriormente a cada vial contenido la concentración adecuada del material de prueba se le adiciona un volumen determinado de medio salino y 10 a 50 larvas del crustáceo con 48 horas de desarrollo. Al cabo de 24 horas se cuentan los organismos sobrevivientes y se determina el porcentaje de mortandad para cada dosis. Por último, se determina la dosis letal media. La toxicidad para *Artemia salina* Leach ha corregido en múltiples ocasiones con actividad biológica más complejas, por ejemplo citotoxicidad *in vitro* para células cancerígenas, actividad antihelmíntica y actividad antipalúdica, entre otras.

En 1982, Meyer y otros reportaron un éxito notable mediante un bioensayo simple con *Artemia salina*. El método es rápido, confiable, barato, y puede ser convenientemente aplicado por químicos, botánicos, u otros que carecen de recursos. El ensayo ha mostrado buena correlación con la citotoxicidad.

6.3. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA

Alnus acuminata subespecie arguta (Schlecht), H.B.K.

Nombres comunes en México. Aile, Llite, Aliso (Rep.Mex.); Abedul (Ver.); Aile (Hgo., Oax.); Aliso (Sin.); Elite, Palo de águila (Oax.)

La palabra Aile proviene del vocablo náhuatl a-ylin. Con este nombre se le conoce tradicionalmente al árbol perteneciente al género *Alnus*, una especie típica de bosques húmedos, que se le encuentra mayoritariamente en el sur de México (Rzedowski, 1994). También se le conoce con el nombre de abedul y frecuentemente se le encuentra formando parte de diversos tipos de vegetación como es el caso de los bosques de *Quercus*, pinares, bosque mesófilo de montaña y bosques de galería, constituyendo comunidades sucesionales de encinares y pinares.

El Aile pertenece a la familia botánica Betulacea y el género *Alnus*, comprende de 26 a 30 especies que presentan variaciones morfológicas y diferentes preferencias ecológicas. Actualmente el Aile se encuentra de manera natural en el hemisferio norte y de manera limitada en algunas partes de Sudamérica. Su hábito de crecimiento es de arbusto y árbol, con mayor frecuencia se localiza en lugares húmedos (Rzedowski, 1994).

Los Ailes se desarrollan en las zonas montañosas donde con frecuencia existen grupos indígenas, que lo aprovechan de diversas formas. Los nombres comunes de esta especie son además "ilite", "ahilite" (Veracruz y Puebla), "cuatlapal" y "tapamu" (Michoacán), "palo de águila", en la Sierra Mixe de Oaxaca.

El Aile es una especie importante en los procesos de regeneración de los bosques, ya que son los primeros colonizadores después de disturbios causados a los ecosistemas de manera natural o antrópica como son incendios forestales, tala, sobrepastoreo, inundaciones o erupciones. Por sus características de mejorador de suelo, el género *Alnus* representa una opción para ser utilizado en sistemas agroforestales y silvopastoriles, así como para la formación de cortinas rompevientos (Rzedowski, 1994).

FIJACIÓN DE NITRÓGENO

El Aile es una planta considerada como actinorriza, por su capacidad de fijar nitrógeno por medio de actinomicetos del género *Frankia*. En las raíces se forman nódulos en los que se establece la simbiosis entre el Aile y los actinomicetos, donde estos reducen el nitrógeno atmosférico a amonio, que es una de las formas aprovechables del nitrógeno por las plantas. Este patrón de fijación de nitrógeno coincide con los de la simbiosis de *Rhizobium* en Leguminosas, de allí que la importancia del Aile y otras especies actinorrizas de climas templados y fríos, se considere equiparable a la que tienen las leguminosas en las áreas tropicales. Por esta capacidad de fijar nitrógeno, el Aile puede crecer en suelos de disturbios, desprovistos de amonio y nitratos (Rzedowski y Calderón, 2001).

REPRODUCCIÓN

El Aile es una planta alógama y monoica que alcanza su madurez sexual en un corto tiempo (de 3 a 6 años en condiciones naturales). Cada individuo produce varios cientos de semilla anualmente, las cuales si permanecen en los conos pueden ser viables por más de un año. La semilla se desprende del fruto y es dispersada por el viento y el agua (Anibal, 1990). Existe propagación vegetativa de manera natural mediante estolones.

DESCRIPCIÓN

Forma. Árbol o arbusto perennifolio / caducifolio, de 10 a 25 m (hasta 30 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 35 a 40 cm. (hasta 1 m). Algunos individuos llegan a superar los 42 m de altura en plantaciones. (Hawkes, 1980).

Copa / Hojas. Copa estrecha (angosta) y piramidal (en plantaciones), en bosquetes sucesionales toma formas irregulares. Hojas con la lámina ovada, de 6 a 15 cm de largo y 3 a 8 cm. de ancho, margen agudamente biserrado; el haz y el envés glabros en la madurez (Pérez, 2001).

Tronco / Ramas. Tronco cilíndrico a ligeramente ovalado. Generalmente con varios troncos. En campo abierto desarrolla ramas gruesas desde la base mientras que en bosque denso alcanza una mayor proporción de tronco libre de ramas y nudos por una poda natural.

Corteza. Corteza lisa o ligeramente rugosa, escamosa en individuos viejos, con frecuencia marcada con arrugas transversales o constricciones circundantes.

Fruto(s). Fruto elíptico a obovado, papiráceo a coriáceo, con el margen alado y estilo persistente. Las alas angostas de 2 a 2.3 mm de largo y 0.2 a 1 mm de ancho, el cuerpo de 1.5 a 3 mm de largo y 1.5 a 1.8 mm de ancho (Nieto de Pascual y Zamora, 1989).

Raíz. Sistema radical poco profundo, amplio y extendido (Rzedowski, 1988).

DISTRIBUCIÓN

Distribuido en casi toda la República. Altitud: de los 1,300 a 2,800 msnm.

Estados. CHIS. CHIH. D.F. DGO. GRO. GTO. HGO. JAL. MICH. MOR. NAY. OAX. PUE. QRO. SIN. S.L.P. SON. TLAX. VER.

EXTENSIÓN

Especie originaria de México y Centroamérica. Se extiende desde el noroeste de México hasta el norte de Argentina y los Andes de Perú y Bolivia. Se ha introducido con éxito en el sur de Chile y en Nueva Zelanda (Hawkes, 1980).

HÁBITAT

El género *Alnus* se puede encontrar en laderas montañosas muy inclinadas con condiciones secas. Prospera en las riberas de los ríos y en pendientes húmedas. Se desarrolla en áreas de nubosidad, con neblina frecuente. Su rango de temperatura va de 4° a 27 °C y puede soportar temperaturas que bajan temporalmente a 0 °C. Precipitación de 1,000 a 3,000 mm o más. Suelos: limoso o limo-arenoso de origen aluvial o volcánico, profundo, bien drenado, amarillorocoso, cambisol vértico y eútrico, de textura mediana, regosol, rojizo, rico en materia orgánica, grava, arena, arcilla, toba andesítica.

Vegetación Asociada. *Pinus* spp., *Quercus* spp., *Abies* sp., *Bacharis* sp., *Pteridium aquilinum*, *Mirica cerifera*, *Fraxinus* sp., *Salix* sp., *Prosopis* sp., *Acacia* sp., *Salís* sp., *Tilia* sp., *Astianthus* sp., *Cornus* sp., *Liquidambar styraciflua*, *Crataegus pubescens*.

Zona(s) Ecológica(s). Templada húmeda. Templada subhúmeda.

FENOLOGÍA

Follaje. Perennifolio / Caducifolio. Los árboles llegan a tirar sus hojas en forma total o parcial durante la época seca.

Floración. Florece de febrero a abril.

Fructificación. Fructifica de junio a diciembre (marzo).

ASPECTOS FISIOLÓGICOS

Asociación. Nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces. Simbionte: *Frankia* (*Franki alni*). Los grupos de nódulos se presentan a la edad de 2 meses (Hawkes, 1980).

Crecimiento. Especie de rápido crecimiento. En plantaciones puede alcanzar 25 m de altura en 10 años, con 20 cm de diámetro. La altura comercial del fuste puede llegar a más de 20 metros.

Establecimiento. El factor más importante para su establecimiento parece ser la humedad tanto del suelo como del ambiente. No presenta problemas de supervivencia.

INTERACCIÓN BIOLÓGICA

Forma asociaciones con hongos micorrícicos *Glomus Intraradices*.

USOS

Artesanal [madera]. Se emplea en la fabricación de varios artículos artesanales e instrumentos musicales.

Combustible [madera]. Se utiliza como leña y carbón.

Construcción [madera]. Construcción rústica. Puentes y pilotes.

Curtiente [corteza]. La corteza contiene taninos que pueden emplearse en curtición de cueros.

Implementos de trabajo [madera]. Mangos para herramientas.

Industrializable [madera]. Pulpa para papel de buena calidad.

Maderable [madera]. Gran potencial para producción de madera. Puertas, pisos y cercas, muebles, palillos y cabos de fósforos, zapatos ortopédicos, moldes para fundición de metales, molduras, ataúdes, lápices, madera en rollo, aserrío, embalajes, ebanistería. El *Alnus* no se recomienda para estructuras y construcciones que requiera alta resistencia, dado que la madera es muy suave.

Medicinal [corteza]. La corteza esta considerada como un magnífico astringente natural adecuado para trabajar hemorragias internas y externas, para tratar encías sangrantes, úlceras, llagas, rasguños, magulladuras, rozaduras, para cicatrizar heridas superficiales en la piel y propiedades antifúngicas y antibacteriales. Menos eficaz contra las típicas diarreas estivales producidas por un cambio de agua o de tipo de alimentación. Posee un efecto analgésico capaz de mitigar el dolor de neurologías, torceduras, esguinces, contracturas musculares e inflamaciones osteoarticulares y reuma. Es un buen remedio para el dolor de muelas, de garganta y las úlceras bucales. Se ha usado como remedios contra la sarna.

Presentación y dosis: En decogciones de la corteza, hasta tres tazas al día, o bien para lavados y gargarismos en uso externo; en tintura, hasta 50-60 gotas.

6.4. ZONA DE MUESTREO

Tétela del Volcán se ubica en los $18^{\circ}57'48''$ de latitud norte y los $99^{\circ}15'12''$ de longitud oeste, en el estado de Morelos (Fig 2) a una altura de 2,040 metros sobre el nivel del mar. Al norte colinda con el Estado de México; al sur con Zacualpan de Amilpas; al este con el Estado de Puebla; y al oeste con el municipio de Ocuituco.

El clima es húmedo y frío con invierno seco, con excepción de la parte norte, cuyo clima es típicamente de montaña. Se caracteriza por frecuentes precipitaciones nublosas y de carácter tempestuoso, generalmente acompañados de granizo. La precipitación pluvial es de 2,341.63 milímetros por año y el período de lluvias es de junio a octubre.

Principales ecosistemas.

La flora está compuesta principalmente por coníferas tales como pino, cedro, oyamel, encino etc. El tipo de suelo que presenta la zona son Andosoles y regosoles.

Fauna: La constituye venado cola blanca, mapache, zorrillo, ardillas, ratón de los volcanes, puma o león americano, codorniz moctezuma, gallinita de monte, paloma bellotera, urraca azul, jilguero, mulato floricano, primavera roja, víbora de cascabel y víbora ratonera, ranas y lagartijas; entre otras especies.

Recursos naturales.

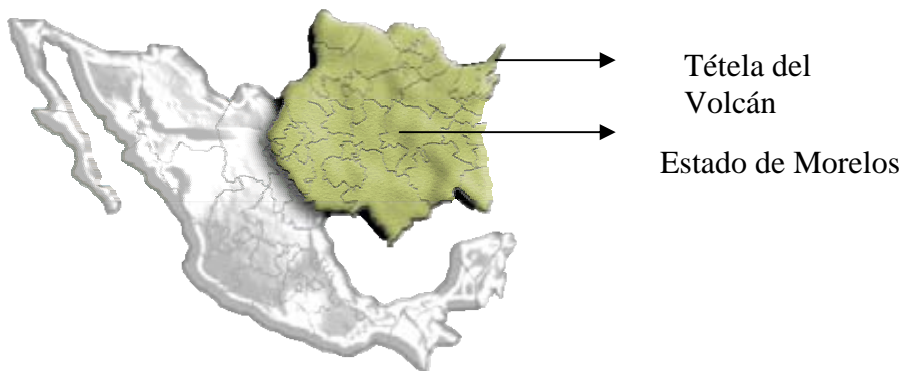
Estos se localizan en la parte norte, los cuales desgraciadamente y debido a la tala inmoderada se encuentran en estado de degradación que ayudado por la erosión y los incendios forestales, incrementan el problema de su devastación.

Características y uso de suelo

El municipio cuenta con una superficie aproximada de 98.61 km^2 , de los cuales en forma general se utilizan: 3,035 hectáreas para uso agrícola y 6,0602 ha para uso forestal.

En cuanto a la tenencia de la tierra, se puede dividir en: 3,574 ha propiedad ejidal, 3,275 ha propiedad comunal y 3,727 ha propiedad particular.

Fig. 2 Estado de Morelos (México).



VI. HIPÓTESIS

Dado los conocimientos medicinales que se reportan para *Alnus acuminata* subespecie *arguta* (Schlecht), H.B.K (Aile), al cual se le atribuye un efecto antiséptico, astringente entre otras propiedades; se espera que para las estructuras de hoja, rama y corteza presenten un efecto antimicrobiano frente a los siguientes microorganismos causantes de enfermedades en el hombre:

Bacterias: *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei*.

Hongos: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea* *Geotrichum* sp. *Criptococcus neoformans*.

Asimismo se espera que los principios activos de *Alnus acuminata* no sean tóxicos para el crustáceo *Artemia salina* Leach.

VII. OBJETIVOS

7.1. GENERAL

- Evaluar el efecto antimicrobiano y toxicidad de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K.

7.2. PARTICULARES

- Evaluar los parámetros físicos y químicos del suelo donde crece el Aile. (Materia orgánica, Textura, Densidad aparente, Densidad real, Conductividad eléctrica, pH potencial y activo).
- Obtener el rendimiento del peso seco del principio activo en cada una de las estructuras (hoja, rama y corteza).
- Evaluar la acción antimicrobiana del principio activo de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. en las concentraciones de 30, 60, 90, 120 mg•mL⁻¹, de hoja, rama y corteza en: *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea*, *Geotrichum sp.* y *Criptococcus neoformans*.
- Obtener la concentración mínima inhibitoria del principio activo de cada estructura.
- Obtener los grupos funcionales que constituyen el principio activo de las estructuras de la planta medicinal mediante un análisis de espectroscopia de infrarrojo.
- Evaluar la toxicidad del principio activo con *Artemia salina* Leach.

VIII. METODOLOGÍA

Fase de campo

Recolección del material vegetal y muestreo de suelo

Se efectuó la recolección del material vegetal; se seleccionaron 5 árboles de *Alnus acuminata* H.B.K. sanos, de los cuales se tomaron tres estructuras (hoja, rama y corteza), en los cuatro puntos cardinales (norte, sur, este y oeste) del árbol. Después se guardaron en bolsas de papel estraza, para su transportación al laboratorio a fin de evitar algún tipo de contaminación. Finalmente se prensó un ejemplar para su posterior determinación (Forés, 1997).

Además se colectaron muestras de suelo obtenidas de 5 sitios distintos distribuidos en zig zag, considerando el espesor de 0-20 cm., cada suministro tuvo un peso de 1 kg., con el total de suministros se formó una muestra compuesta de la cual se tomaron dos kg que fueron transportados al laboratorio en bolsas de plástico para el análisis de las propiedades físicas y químicas del suelo donde crece *Alnus acuminata* H.B.K. (NOM-021-RECNAT-2000).

Fase de laboratorio

En el laboratorio las muestras de suelo se colocaron en charolas de plástico para su secado. El secado se realizó con el propósito de facilitar su manejo, mejorar la homogenización y disminuir los cambios químicos indeseables. Posteriormente se tamizó, para lo cual se hizo pasar por un tamiz con abertura de dos mm de diámetro (malla 10) de acero inoxidable. Una vez tamizado el material se separó 1.5 kg de suelo, cantidad suficiente para realizar las determinaciones químicas y físicas que permitirán caracterizar el suelo (NOM-021-RECNAT-2000).

Se determinaron las propiedades físicas y químicas del suelo mediante diversos métodos (Fig. 3):

Fig. 3 Métodos para la determinación de las propiedades físicas y químicas de suelo.

<i>Análisis</i>	<i>Nombre del método</i>	<i>Bibliografía</i>
pH (potencial y activo).	Potenciométrico	Black 1975, Thompson 1982, Foth 1998
Textura	Bouyoucos	Bear 1980
Densidad aparente	Probeta	Bohn 1993
Densidad real	Picnómetro	Gaucher 1971
Conductividad eléctrica	Conductividad eléctrica de la solución de suelo relación 1:5	Richard 1990
% De materia orgánica	Walkley and Black	Jackson 1964, Tamhane 1979

Preparación del material vegetal

La planta a estudiar se desinfectó con hipoclorito de sodio al 10% (para eliminar contaminantes superficiales), asimismo se separó en cada una de sus estructuras (hoja, rama y corteza), para que posteriormente se pusieran a secar por un lapso de 15 días a temperatura ambiente. Una vez cumplido el plazo, se pesó cada estructura y finalmente se sometieron a un proceso de extracción para obtener la tintura madre mediante el método Galenico el cual consiste en colocar el material vegetal seco en frascos de color ámbar y añadir alcohol de 96° hasta cubrir, sellar y dejar reposar por 15 días en la oscuridad y agitar cada tercer día (Sincholle *et al.*, 1987).

Trascurrido el plazo de 15 días se realizó el filtrado de la tintura, de cada estructura obtenida, para posteriormente depositarla dentro de frascos color ámbar (Alfaro *et al.*, 2000).

Obtención del principio activo

Se obtuvo el extracto en peso seco de cada estructura a través de la destilación de la tintura vegetal previamente obtenida, para lo cual se utilizó un rotavapor, una canastilla de calentamiento y un reóstato, la temperatura a la cual se destiló fue de 60°C, a una presión de vacío de 10⁻⁴ bares. El extracto obtenido se colocó en cajas de Petri estériles y previamente pesadas, se dejó secar y finalmente se pesó para obtener el rendimiento, para cada estructura de la planta (Robinson, 2000).

Preparación de concentraciones e impregnación de sensidiscos

Se preparó una serie de cuatro disoluciones (por estructura vegetal) del principio activo seco el cual se disolvió en alcohol bajo las siguientes concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg/mL. Al mismo tiempo se prepararon sensidiscos de papel Whatman N^o 41 con un diámetro de 6 mm, los cuales fueron esterilizados en la autoclave y posteriormente impregnados con las concentraciones antes mencionadas (Collins y Lyne, 1989).

Cepas microbianas

Las cepas utilizadas en las pruebas de inhibición antimicrobiana, se obtuvieron del banco de cepas de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Las bacterias y hongos utilizados fueron:

Bacterias: *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei*.

Hongos: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea*, *Geotrichum sp.*, *Cryptococcus neoformans*.

Estandarización del inóculo microbiológico

Una vez hecho todo lo anterior, se realizó la estandarización del inóculo microbiológico mediante el método de Kirby-Bauer y la escala de Mc. Faland (Finegold y Martín, 1983). Para lo cual se vertió un mililitro de solución salina a un tubo de ensayo y en seguida se le agregó el microorganismo, generando así una turbidez blanquecina la cual se comparó con el tubo uno de la escala de Mc Faland que corresponde a 3×10^8 UFC/mL. (La turbidez del microorganismo debe ser la misma que la del tubo uno de la escala de Mc Faland) (Koneman y Allen, 1992).

Fig. 4.- Escala de Mc Faland. (Koneman y Allen, 1997).

No de Tubo	BaCl ₂ 1.0% MI	H ₂ SO ₄ 1.0% MI	No aproximado de bacterias representada X 10 ⁶ / mL.
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1,200
5	0.5	9.5	1,500
6	0.6	9.4	1,800
7	0.7	9.3	2,100
8	0.8	9.2	2,400
9	0.9	9.1	2,700
10	1.0	9.0	3,000

En seguida se llevó a cabo la siembra del inóculo por medio del método de Kirby-Bauer y la técnica de Barry (utilizando los medios de cultivos Agar Muller-Hinton para bacterias y Agar Sabouraud para hongos).

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Así mismo se evaluó el efecto antimicrobiano del extracto de cada estructura de la planta en cada una de las concentraciones antes mencionadas. Para ello se aplicó una prueba de sensibilidad por el método de Difusión en Agar (realizándose una serie de ocho repeticiones por ensayo). En este paso se colocaron en cada una de las cajas Petri cuatro sensibilizadores impregnados con las cuatro concentraciones antes mencionadas para cada estructura más un sensibilizador testigo impregnado con alcohol (Allen, 1976; Cacho, 1997). Finalmente se incubaron las cajas Petri a 37 ° C durante 24 h para bacterias y 48 h para hongos y por último se prosigió a medir los halos de inhibición.

Finalmente se procesaron los datos en el paquete estadístico STATGRAPHICS, donde se realizó un ANDEVA y se aplicó la prueba de Tukey, que consiste en una comparación de medias con un nivel de confianza del 95% y un α de 0.05.

Espectroscopia de infrarrojo

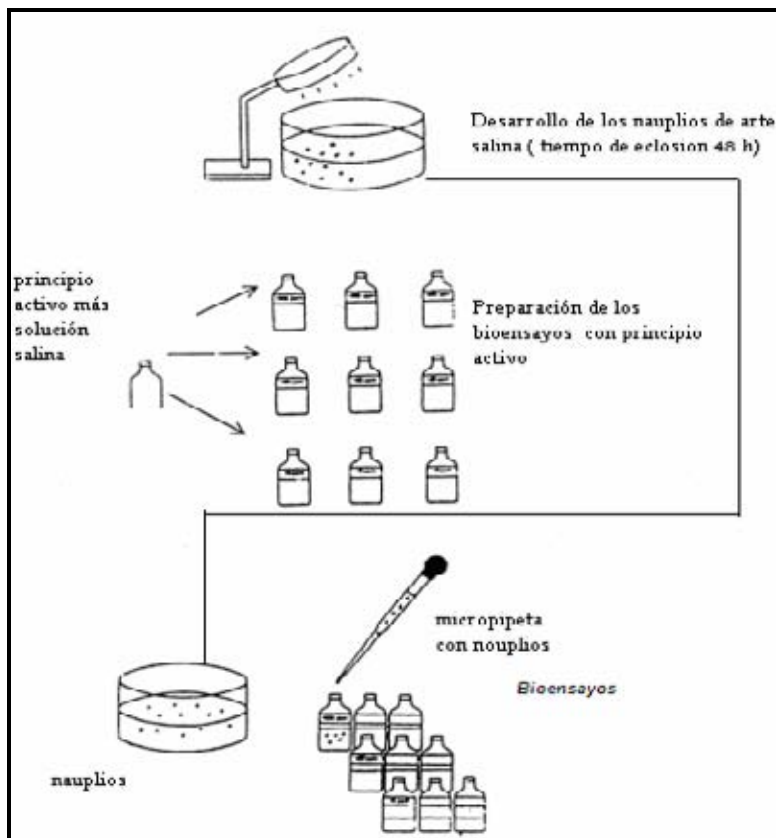
Se determinaron los espectros de infrarrojo para cada una de las estructuras (hoja, rama y corteza) de *Alnus acuminata subespecie arguta* H.B.K, en un espectrofotómetro con transformados de fourier de la marca PERKIN ELMER modelo 1600 para así obtener los grupos funcionales de los que esta constituido el principio activo.

Toxicidad

Se evaluó la toxicidad del principio activo de cada estructura de la planta (hoja, rama y corteza), con la micro técnica de *Artemia salina* Leach, la cual consiste en colocar en 60 frascos (de 100 mL), 40 mL. de solución salina (NaCl) a una concentración del 25%, de los cuales en 10 frascos se disolvió el principio activo de hoja con la concentración mínima inhibitoria (60%), en otros 10 frascos se disolvió el principio activo de rama con su concentración mínima inhibitoria (60%) y finalmente en otros 10 frascos se disolvió el principio activo de corteza con la concentración mínima inhibitoria (30%). Los frascos a los que no se les agrego principio activo (30) sirvieron como testigo. A todos los frascos se les colocaron 50 nauplios de *Artemia salina* que se contabilizaron con la ayuda de un estereoscopio y se evaluó la mortandad a las 48 hrs. (ver figura 5).

Para sacar el porcentaje de mortandad se ocupó la fórmula Abbott. $\%M = r/s * 100$
Donde M= mortandad, r= artemia muerta en el extracto y s= artemia viva en el blanco.

Fig. 5 Diseño para la toxicidad frente a *Artemia salina* Leach (Sanchez, 1999).



IX. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades físicas y químicas de suelo.

En el cuadro No 6 se muestran los resultados de los análisis físicos y químicos del suelo de Tetela del Volcán en el Estado de Morelos, donde crece *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. Observando que presentó un pH potencial de 5.3 y un pH real de 5.8 lo que indica que es un suelo ligeramente ácido según la Norma Oficial Mexicana (NOM-021- RECNAT-2000), ésto podría deberse también al aporte de materia orgánica, el cual fue elevado con un valor de 4.5 % para suelos no volcánicos según Daver (1980) y al lugar donde se tomaron las muestras, a orilla del río Amalzinag, favoreciendo una mayor infiltración de agua y por consiguiente se da una lixiviación de bases dando así la preponderancia a los iones H^+ sobre OH^- en la solución del suelo y bajo tales condiciones el suelo se vuelve ácido (Buckaman y Brady, 1991).

La conductividad eléctrica fue de 0.06 dS m^{-1} lo cual nos permite mencionar que no presentan problemas de salinidad, puesto que esta por debajo de los valores establecidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-021-RECNAT-2000) y esto puede inferirse por la lixiviación de las bases. En cuanto a la densidad real fue de 2.5 g/cm^3 y la densidad aparente fue de 1.2 g/cm^3 los cuales fueron bajos, presentando así un alto porcentaje de porosidad 52%, con ello podemos mencionar que no tienen problemas de aireación y compactación.

La textura del suelo fue arenosa; de ahí que la densidad aparente sea baja y que el porcentaje del espacio poroso sea alto, ya que contiene un alto porcentaje de arena (95%), y en general estos poros son grandes, permitiendo un buen movimiento de agua y aire dentro del mismo.

Las características analizadas corresponden a un Regosol y ésto se confirma con la carta edafológica de Tetela del Volcán (E14 B51 1: 50,000).

Fig. 6.- Resultados promedio de las propiedades físicas y químicas de suelo donde crece *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K.

PROPIEDAD	RESULTADO
pH potencial	5.3
pH real	5.8
% de materia orgánica	4.5 %
Conductividad eléctrica	0.06 dS m^{-1}
Densidad aparente	1.2 g/cm^3
Densidad real	2.5 g/cm^3
Textura	Arenosa
% de espacio poroso	52%
% arena	95%
% de limo	4.23%
% de arcilla	0.77%

Rendimiento del principio activo de *Alnus acuminata subespecie arguta* de cada una de sus estructuras (hoja, rama y corteza).

El cuadro No 7 muestra el rendimiento de cada una de las estructuras de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. mencionando que el mejor rendimiento fue para la estructura de hoja con 10.2%, seguido de corteza con un 8.1% y el menor rendimiento se observó en rama con el 3 %. Este tipo de información es muy útil debido a que sirve de base para conocer el rendimiento de los extractos que se obtendrá a partir de una cantidad determinada de material fresco, con ello se evitaría, en ensayos posteriores el desperdicio del mismo. Además que con esto se puede conocer la concentración del principio activo de cada estructura y dosificar de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria (CMI) sin producir toxicidad.

Fig. 7 Rendimiento del principio activo en peso seco de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. de cada una de sus estructuras (hoja, rama y corteza).

<i>Estructura de la Planta</i>	<i>Peso de la estructura de la planta (g)</i>	<i>Peso seco del Principio activo</i>	<i>% de rendimiento</i>
Hoja	146	14.90	10.2%
Rama	580	17.58	3.0%
Corteza	480	39.22	8.1%

Resultados generales de cada uno de los microorganismos probados frente al principio activo de *Alnus acuminata subespecie arguta*.

En el cuadro No 8 se presentan los resultados de los antibiogramas que se obtuvieron con cada una de las concentraciones probadas a partir de los extractos de hoja, rama y corteza, sobre el crecimiento de los microorganismos analizados. En la primera columna se indica el nombre de los microorganismos sometidos a las pruebas de sensibilidad, mostrando en primera instancia a las bacterias y en segundo lugar a los hongos. Mencionando así que de cuatro bacterias examinadas solo tres mostraron sensibilidad, siendo estas: *Corynebacterium xerosis*, presentando sensibilidad para las estructuras de hoja, rama y corteza; esta última manifestó sensibilidad en todas las concentraciones probadas (30, 60, 90 y 120 mg/mL), *Staphylococcus aureus* ostentó sensibilidad en la estructura de hoja y corteza; sin embargo no hubo respuesta para la estructura de rama, *Mycobacterium phlei* solo presentó sensibilidad la estructura de corteza a una concentración de 120 mg/mL, no hubo respuesta para las estructuras de hoja y rama, finalmente presento sensibilidad un hongo de los seis probados, el cual fue *Geotrichum sp.* en las estructuras de hoja y rama a una concentración de 120 mg/mL y en corteza a partir de la concentración de 90mg/mL

Las pruebas de sensibilidad resultaron negativas en todos los ensayos con las diferentes estructuras y concentraciones probadas:

Bacterias: *Escherichia coli*.

Hongos: *Candida albicans*, *Candida tropicales*, *Candida Krusei*, *Candida stellatoidea* y *Criptococcus neoformans*.

Fig. 8 Respuesta de la actividad antimicrobiana de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. de cada estructura estudiada, frente a los microorganismo probados.

Microorganismo	Estructura y concentración											
	Hoja Concentración mg/mL				Rama Concentración mg/mL				Corteza Concentración mg/mL			
	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120
Bacterias												
<i>Corynebacterium xerosis</i>	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	+	+	0	0	0	0	+	+	+	+
<i>Mycobacterium phlei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
Hongos												
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida tropicales</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida Krusei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida stellatoidea</i>	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	+	+
<i>Geotrichum sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Criptococcus neoformans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(+) Si hubo respuesta

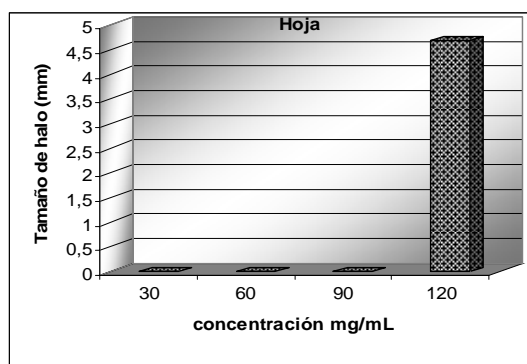
(0) No hubo respuesta

RESULTADOS PARTICULARES DE CADA UNO DE LOS MICROORGANISMOS DONDE SE PRESENTO SENSIBILIDAD MICROBIANA

Resultados obtenidos para *Geotrichium sp.*

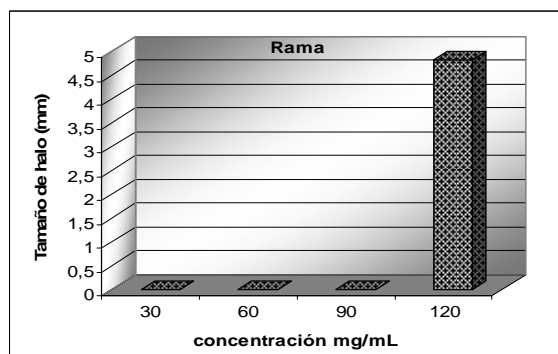
En la grafica N_o 1 se presentan los tamaños promedios de los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad aplicadas al hongo *Geotrichium sp.* con el extracto de hoja, bajo cuatro diferentes concentraciones. Observando así que para las concentraciones de 30, 60 y 90 mg/mL no se presento respuesta, por otro lado para la concentración de 120 mg/mL se presenta sensibilidad comprendiendo halos de 4.6 mm de diámetro. Por tanto la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la estructura de hoja frente al hongo *Geotrichium sp.* es de 120 mg/mL

Grafica N_o 1 Tamaño promedio del halo de inhibición con extracto de hoja de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. frente a *Geotrichium sp.*



En la grafica N_o 2 se muestran los tamaños promedios de los halos de inhibición para el hongo *Geotrichium sp.* con el extracto derivado de rama. Observando que presenta el mismo patrón que el de la estructura de hoja, ya que para las concentraciones de 30, 60, 90 mg/mL no se presento sensibilidad, sin embargo para la concentración de 120 mg/mL si se presento sensibilidad siendo esta la concentración mínima inhibitoria (CMI), comprendiendo halos de 4.6 mm de diámetro, por tanto las estructuras de hoja y rama son similares y no presenta diferencia estadística significativa ($p=0.125$ ver apéndice N_o 2).

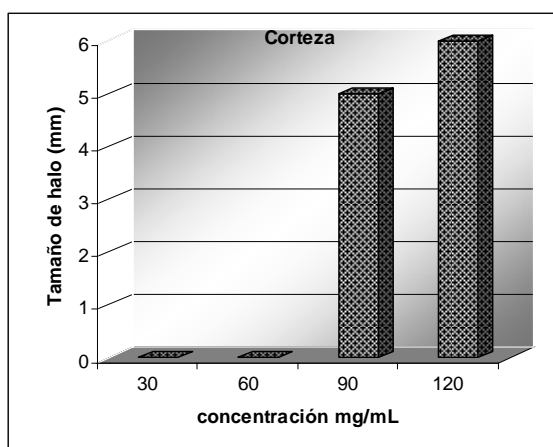
Grafica N_o 2 Tamaño promedio del halo de inhibición con extracto de rama de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. frente a *Geotrichium sp.*



En la Grafica N^o3 se muestran los tamaños promedios de los halos de inhibición para el hongo *Geotrichium sp.* con el extracto de corteza. Observando que para las concentraciones de 30 y 60 mg/mL no se presenta sensibilidad, para las concentraciones de 90 y 120 mg/mL se presenta sensibilidad comprendiendo halos que van desde los 4.8 a 6 mm de diámetro, presentando estos una diferencia estadística significativa ($p = 1.16875$ ver apéndice N^o 1).

Con esto se estableció que la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la estructura de corteza es de 90 mg/mL.

Grafica N^o 3 Tamaño promedio del halo de inhibición con el extracto de corteza de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. frente a *Geotrichium sp.*



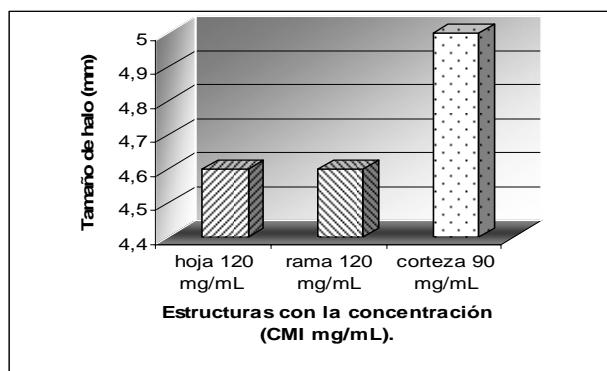
En la Grafica N^o 4 se observan los valores promedios del tamaño de los halos de inhibición obtenidos bajo la interacción de los factores estructura-concentración mínima inhibitoria (CMI) en las pruebas de sensibilidad aplicadas para el hongo *Geotrichium sp.*

Los análisis del contraste múltiple de rango aplicados a este ensayo indican que a un nivel de confianza de 95% no existe diferencia estadística significativa para las estructura de hoja y rama, esto se debe a que los halos son similares (4.6 mm de diámetro) bajo la concentración 120 mg/mL, mientras que corteza presenta halos de mayor tamaño (4.8 mm) a una concentración de 90 mg/mL, presentando diferencia estadística significativa en comparación con las estructuras de hoja y rama (ver apéndice N^o 2).

De forma general podemos mencionar que para el hongo *Geotrichium sp.* La concentración mínima inhibitoria para las estructuras de hoja y rama es de 120 mg/mL y para corteza es de 90 mg/mL por lo cual se puede sugerir que la estructura de corteza fué la más adecuada para inhibir el crecimiento de este hongo.

No se presentó sensibilidad para los siguientes hongos; *Candida albicans*, *Candida tropicales*, *Candida Krusei*, *Candida stellatoidea* y *Criptococcus neoformans*. Esto se puede deber a que presentan una mayor resistencia bajo el principio activo de *Alnus acuminata subespecie arguta* H.B.K.

Grafica No 4.- Tamaño de los halos de inhibición en hoja, rama y corteza de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. para la concentración mínima inhibitoria frente a *Geotrichum sp.*



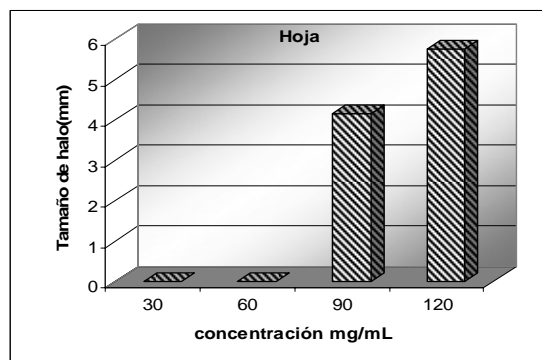
Resultados obtenidos para *Staphylococcus aureus*.

En la grafica N_o 5 se observan los tamaños promedios de los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad aplicadas a las bacteria *Staphylococcus aureus* con el extracto de hoja bajo las concentraciones de 30, 60, 90 y 120 mg/mL obteniendo así que para las concentraciones de 30 y 60 mg/mL no se presentó sensibilidad, pero si se presentó sensibilidad para las concentraciones de 90 y 120 mg/mL, comprendiendo halos de 4 a 6 mm de diámetro. Cabe señalar que las concentraciones donde hubo respuesta presenta una diferencia estadística significativa (p= -1.625 ver apéndice N_o4).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para la estructura de hoja es de 90mg/mL frente a *Staphylococcus aureus*.

Para la estructura de rama no se presentó sensibilidad en ninguna de las concentraciones probadas (30, 60, 90 y 120 mg/ mL) por lo cual este tipo de bacteria es más resistente al principio activo para esta estructura.

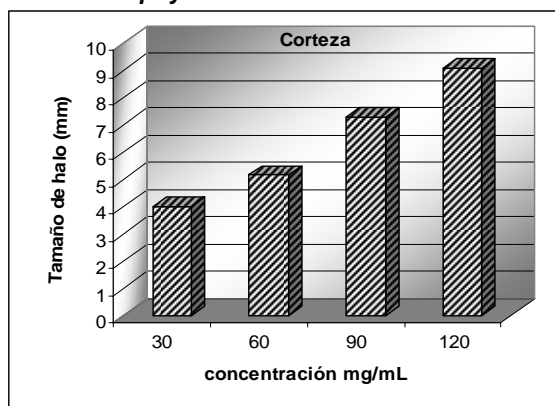
Grafica N_o 5 Resultados promedio del tamaño del halo de inhibición en las concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg mL⁻¹, en hoja de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. frente a *Staphylococcus aureus*.



En el grafico N_o6 se muestran el promedio de los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad aplicadas a la bacteria *Staphylococcus aureus* con el extracto de corteza. Observando que para todas las concentraciones probadas se presentó sensibilidad, comprendiendo halos que van de los 4 a los 8 mm de diámetro respectivamente. Así mismo se puede señalar que para las concentraciones de 30 y 60 mg/mL no se presentó diferencia estadística significativa $p= 0.525$ ni para las concentraciones de 90 y 120 mg/mL $p= 1.6125$ sin embargo para las concentraciones de 30 y 120 mg/mL se presentó diferencia estadística significativa $p= 4.0125$, así mismo para las concentraciones de 60 y 120 mg/mL con una $p= -3.4875$ (ver apéndice N_o 3) se observa que al aumentar la concentración aumenta el halo de inhibición.

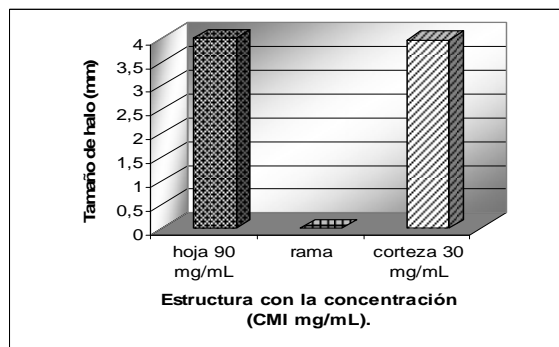
La concentración mínima inhibitoria (CMI) para la estructura de corteza es de 30 mg/mL.

Grafica N_o 6 Resultados promedio del tamaño del halo de inhibición en las concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg mL⁻¹, en corteza de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. frente a *Staphylococcus aureus*.



En el grafico N_o7 se presentan los valores promedios del tamaño de los halos de inhibición obtenidos bajo la interacción de los factores estructura-concentración mínima inhibitoria (CMI) en las pruebas de sensibilidad aplicadas a la bacteria *Staphylococcus aureus*.

Grafica N_o7 Comparación del tamaño de los halos de inhibición en cada una de las estructuras de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. en la concentración (CMI), frente a *Staphylococcus aureus*.



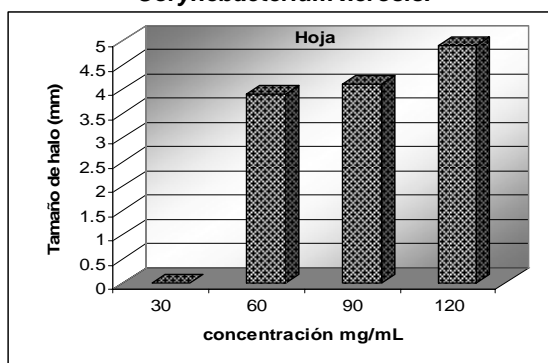
Observando que para las estructuras de hoja y corteza el halo de inhibición fue del mismo tamaño 4 mm de diámetro sin embargo la diferencia radica en la concentración siendo más alta para hoja 90 mg/mL que para corteza 30 mg/mL presentando así una diferencia estadística significativa ($p= -1.16875$ Ver apéndice N_o5).

La corteza presentó mayor eficiencia que la estructura de hoja debido a que la concentración es menor, por tanto se recomienda a corteza para inhibir a la bacteria *Staphylococcus aureus*. Cabe señalar que la estructura de rama no presentó efecto positivo para *Staphylococcus aureus* por lo cual se descarta su uso.

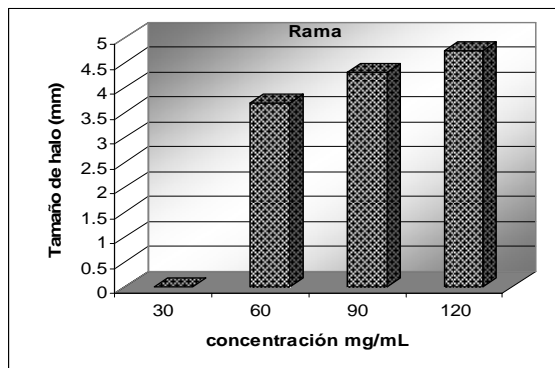
Resultados para *Corynebacterium xerosis*.

En la grafica N^o 8 y 9 se presentan los tamaños promedio de los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad aplicada a *Corynebacterium xerosis* con los extractos obtenidos a partir de las estructuras de hoja y rama.

Grafica N^o 8 Resultados promedio del tamaño del halo de inhibición en las concentraciones de 30, 60, 90 y 120 mg mL⁻¹, en hoja de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. frente a *Corynebacterium xerosis*.



Grafica N^o 9 Resultados promedio del tamaño del halo de inhibición en las concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg mL⁻¹, en rama de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. frente a *Corynebacterium xerosis*.

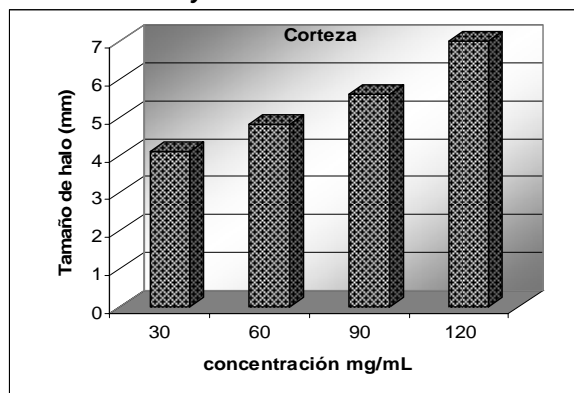


En ambas graficas se observó que para la concentración de 30 mg/mL no se presentó sensibilidad antibacteriana, por otro lado para las concentraciones de 60, 90 y 120 mg/mL si se presentó sensibilidad comprendiendo halos que van desde los 4 a los 5 mm de diámetro. Cabe señalar que estas dos estructuras presentan respuestas similares y no existe diferencia estadística significativa (ver apéndice N^o 7).

En ambas graficas se observa que al aumentar la concentración se aumenta el tamaño del halo de inhibición por lo cual presentan el mismo efecto frente a *Corynebacterium xerosis*.

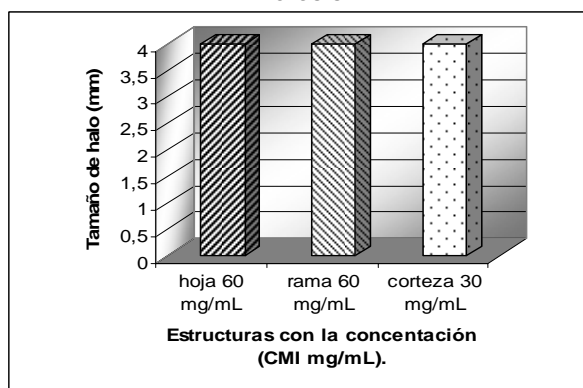
En el grafico N^o 10 se presentan los tamaños promedios de los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad aplicadas a la bacteria *Corynebacterium xerosis* con los extractos de corteza, bajo cuatro diferentes concentraciones (30, 60, 90 y 120 mg/mL) como se puede apreciar en todas las concentración probadas se presentó sensibilidad comprendiendo halos desde los 4 a los 7 mm de diámetro. Cabe señalar que se presentó diferencia estadística significativa para cada una de las concentraciones (ver apéndice N^o 6). Se observa que al aumentar la concentración aumenta el tamaño del halo de inhibición, siendo la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 30 mg/mL para esta estructura.

Grafica N^o 10 Resultados promedio del tamaño del halo de inhibición en las concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg mL⁻¹, en corteza de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. frente a *Corynebacterium xerosis*.



En la grafica N^o 11 se observan los valores promedios del tamaño de los halos de inhibición obtenidos bajo la interacción de los factores estructura-concentración mínima inhibitoria (CMI), en las pruebas de sensibilidad con la bacteria *Corynebacterium xerosis*.

Grafica N^o 11 comparación del tamaño de los halos de inhibición en cada una de las estructuras de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. en la concentración (CMI), frente a *Corynebacterium xerosis*



En la grafica N^o 11 los resultados de los ensayos muestran que no hay una diferencia estadística significativa para las estructuras de hoja y rama ($p= 0.0041$) a una concentración de 60 mg/mL, por tanto estos grupos son parecidos debido a que los halos que presentan estas dos estructuras son iguales (tamaño del halo 4 mm), corteza presenta halos de igual tamaño que hoja y rama 4 mm de diámetro, sin embargo la

diferencia radica en la concentración puesto que esta es menor 30 mg/mL por tanto se presenta una diferencia estadística con rama y hoja respectivamente (ver apéndice N.º 7).

De forma general se menciona que la concentración mínima inhibitoria para la estructura de hoja y rama es de 60 mg/mL y para corteza es de 30 mg/mL por tanto la estructura de corteza presenta mayor eficiencia para inhibir el crecimiento de *Corynebacterium xerosis* y por tanto se recomienda su uso.

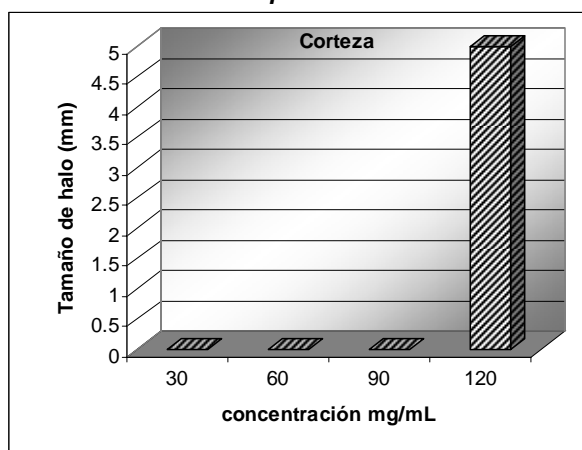
Resultados para *Mycobacterium phlei*.

En la grafica N.º 12 se muestra el promedio del tamaño de los halos de inhibición obtenidos en las pruebas de sensibilidad aplicadas a la bacteria *Mycobacterium phlei*, con el extracto de corteza. Observando así que bajo las concentraciones de 30, 60 y 90 mg/mL se obtuvo un efecto negativo, sin embargo se obtuvo un efecto positivo para la concentración de 120 mg/mL

Cabe resaltar que para las estructuras de hoja y rama no se presentó sensibilidad y esto se puede deber a que el microorganismo presenta resistencia ante el principio activo por lo cual se descarta su uso para inhibir el crecimiento de

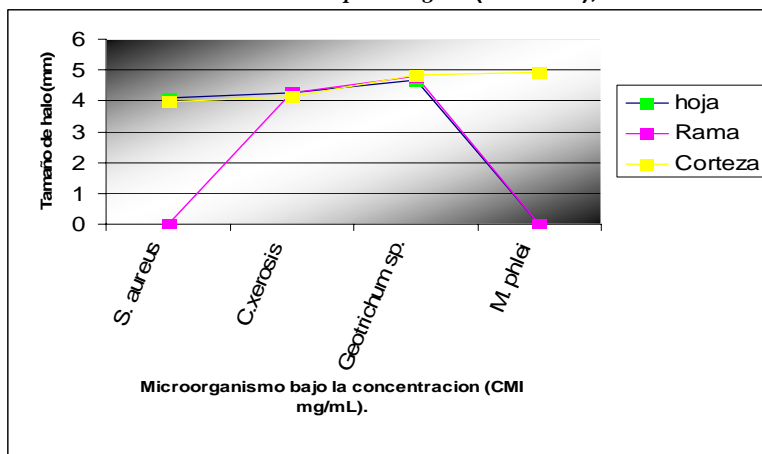
La concentración mínima inhibitoria (CMI) para *Mycobacterium phlei* es de 120 mg/mL únicamente con la estructura de corteza.

Grafica N.º 12 resultados promedio del tamaño del halo de inhibición en las concentraciones 30, 60, 90 y 120 mg mL⁻¹, en Corteza de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. frente a *Mycobacterium phlei*.



En la grafica N_o 13 se muestra el contraste múltiple de rango del halo de inhibición obtenidos para los siguientes microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium xerosis*, *Geotrichum sp.* y *Mycobacterium phlei* bajo la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada estructura a un nivel de confianza del 95%.

Grafica N_o13 Tamaño de halo en la concentración mínima inhibitoria (CMI), para *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium xerosis*, *Geotrichum sp.* y *Mycobacterium phlei*, en hoja, rama y corteza de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K



Se observa que los microorganismos más sensibles al principio activo de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K fueron *Corynebacterium xerosis* y *Geotrichum sp.*, debido a que presentan sensibilidad en las tres estructuras (hoja, rama y corteza), sin embargo *Corynebacterium xerosis* presenta sensibilidad en las concentraciones (CMI) más bajas, siendo que para hoja y rama fue de 60 mg/ mL y corteza 30 mg/mL, mientras que para *Geotrichum sp.* las estructuras de hoja y rama fue de 120 mg/mL y en corteza de 90 mg/mL. Cabe señalar que las tres estructuras (hoja, rama y corteza) para estos dos microorganismos no presentan diferencia estadística significativa, debido a que el tamaño del halo es muy parecido.

El microorganismo más resistente al principio activo fue *Mycobacterium phlei* debido a que presenta solo sensibilidad en la estructura de corteza a una concentración de 120 mg/mL

Se presentó diferencia estadística significativa para los halos de *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium xerosis* (Ver apéndice N_o 8).

Guerra reportó en el 2004 que para la especie *Senna alata* (Caesalpinaceae), comúnmente conocida como guacamaya francesa, la cual se le evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro*, probando a la bacteria *Staphylococcus aureus*, que presentó sensibilidad a una concentración de 30 mg/mL, con halos de 2.5 mm de diámetro, mientras que para *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. con el mismo microorganismo a una concentración de 30 mg/ mL se presentan halos de 4 mm de diámetro, siendo este mas efectivo para la inhibición de dicho microorganismo.

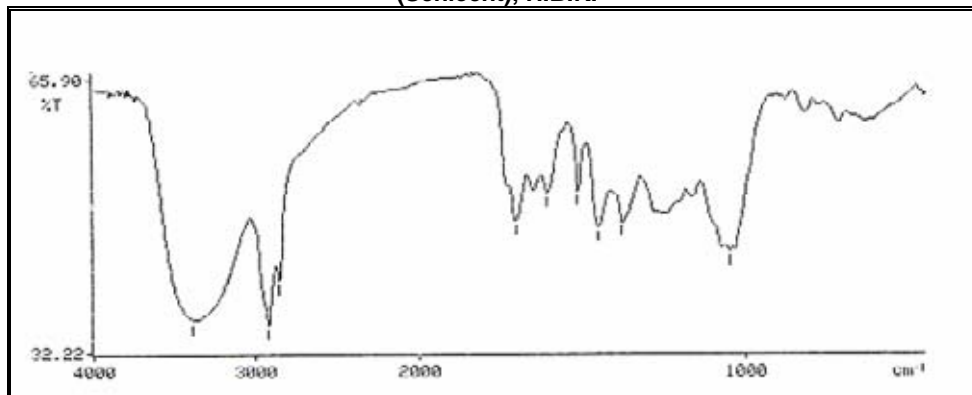
Bosch en 2005 evaluó la actividad antimicrobiana de *Diphysa minutifolia* Rose (Leguminaceae) en la estructura de corteza, reportando que para *Staphylococcus aureus* la concentración (CMI) fue de 100 mg/mL mientras que para *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. en la estructura de corteza, fue de 30 mg/mL siendo esta más efectiva.

Hernández y Rodríguez en el 2001 reportaron que para *Ocimum basilicum* L. (albacá morada) la concentración (CMI) para *Corynebacterium xerosis* fue de 40 mg/mL mientras que para *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. fue de 30 mg/mL siendo esta más baja para inhibir al microorganismo.

Análisis de espectroscopia de infrarrojo

Se analizaron los grupos funcionales que constituyen la composición química del extracto vegetal (bajo la técnica de la pastilla de bromuro) obtenido de cada estructura de la planta (hoja, rama y corteza) mediante el análisis de espectroscopia de infrarrojo con transformados de Fourier, de la marca PERKIN ELMER, modelo 1600 obteniendo las siguientes espectros.

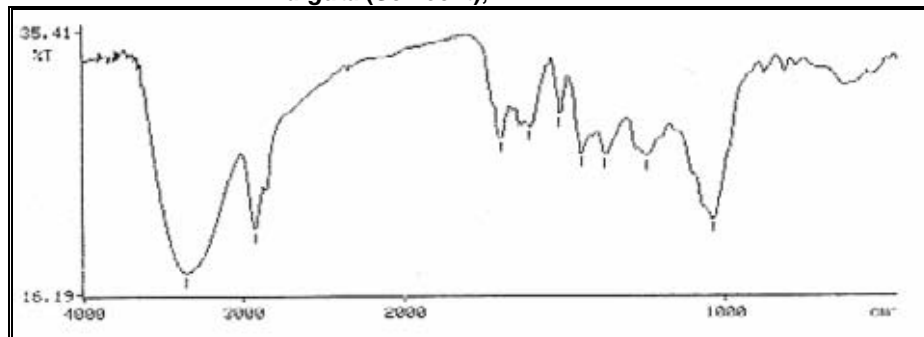
fig. 9 Espectro de infrarrojo para la estructura de hoja de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K.



El espectro de infrarrojo para la estructura de hoja que se muestra en la figura 9 muestran la presencia de grupos funcionales para la longitud de onda de 3387.9 alcoholes y polímeros, para los intervalos que van entre los 2920.9 y 2851.8 se presentaron alcoholes asociados y cetonas, para los intervalos de 1705.4, 1611.4 y 1453.6 se encontraron compuestos aromáticos, huellas de benceno y amidas y finalmente para los intervalos de 1379.7 y 1048.6 presentaron compuestos nitrogenados, eter y ester.

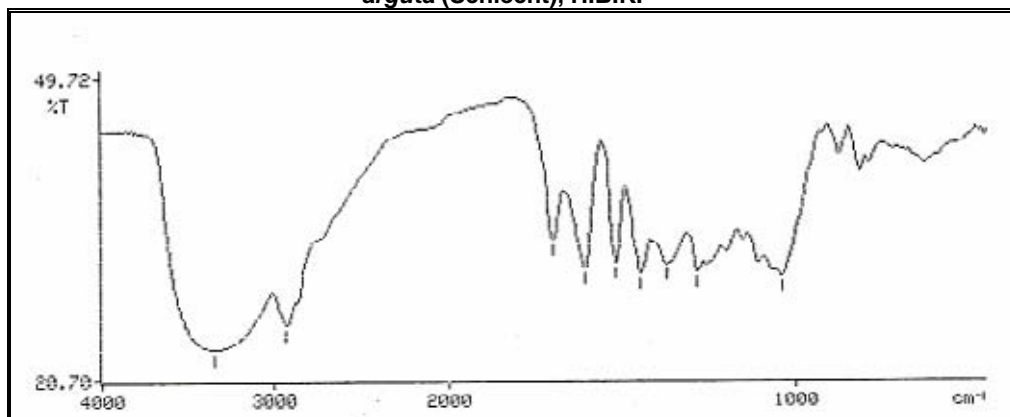
El espectro de infrarrojo para la estructura de rama que se muestra en la figura 10 revela lo siguiente; para la longitud de onda ente 3351.8 y 2925.0 se presentaron alcoholes asociados y polímeros, para la longitud de onda de 1698.3 se presentaron aldehídos y huellas de benceno, para los parámetros de 1610.6, 1515.7 y 1447.1 se presentaron compuestos aromáticos, cetonas (dicetonas quelatada) y amidas, finalmente para las longitudes de onda entre 1375.3 y 1275.8 se presentaron sulfatos y compuestos nitrogenados.

Fig.10 Espectro de infrarrojo para la estructura de rama de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K.



El espectro de infrarrojo para la estructura de corteza que se muestra en la figura (11) revela los siguiente; para la longitud de onda entre 3349.6 y 2929.6 se encontraron alcoholes asociados y grupos cetónicos, para los parámetros de 1697.8, 1606.7, 1518.0 y 1446.0 se presentaron compuestos aromáticos y α aminoácidos, finalmente para las longitudes de ondas entre 1283.0 y 1041.1 se encontraron ácidos carboxílicos, éter y esterés.

Fig.11 Espectro de infrarrojo para la estructura de corteza de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K.



Los alcoholes, aldehídos, ésteres de ácidos carboxílicos y otros compuestos (presentes en los espectros de las estructuras de hoja, rama y corteza) contribuyen a la gran diversidad química que se presenta en el grupo de los terpenos, los cuales a su vez forman parte de los aceites esenciales de muchas plantas medicinales (Kuklinski, 2003)

Los terpenos son una serie de compuestos naturales que formalmente se pueden considerar polímeros del isopreno. El isopreno (2-metil-1,3-butadieno), de fórmula empírica C_5H_8 , es un hidrocarburo doblemente insaturado (alqueno) que se emplea como bloque unidad de cinco carbonos en la biosíntesis de los terpenos (Trese-Evans, 1998)

Los glúcidos o hidratos de carbono, son compuestos orgánicos resultantes del metabolismo primario, que contienen en su estructura una función aldehído o cetona y el resto de los carbonos hidroxilados (OH). Por tanto son poli hidroxialdehídos o poli hidroxicetonas, dentro de estos se encuentran las osas como D-Glucosa, la cual se utiliza en forma anhidra o monohidratada en la preparación de soluciones parentales para rehidratar y evitar deshidrataciones. Industrialmente se preparan jarabes con elevado poder edulcorante.

Los taninos hidrolizables son ésteres formados por una molécula de azúcar (generalmente de glucosa) unido a un número variable de moléculas de ácido fenólico cuyo grupo funcional es el éster, como el tanino gálico cuyo uso es astringente, cicatrizante, antiséptico, tiene una acción bactericida y bacteriostática. También ejerce un efecto antifúngico (Trese-Evans, 1998).

Las quinonas y derivados antracénicos son compuestos con un grupo cetona, destacando las benzoquinonas con una estructura derivada del benceno. Estos compuestos tienen interés farmacológico se utilizan como antiséptico (tanto antibacteriano como antifúngico).

Un gran número de fármacos se obtienen de plantas que contienen alcaloides y estos se deben a las propiedades químicas debidas al nitrógeno básico. En las plantas los alcaloides pueden existir en estado libre o en estado de sales como amida o como alcaloides N-óxidos. Algunos N-óxidos por ejemplo ácido aspergílico e iodina (1,6-dihidroxifenazina dióxido) aislado de plantas medicinales posee actividad antibacteriana (Kuklinski, 2003)

Análisis de toxicidad con *Artemia salina* Leach

En el cuadro N^o 12 se observa que para la estructura de hoja bajo una concentración mínima inhibitoria del 60 mg/mL el porcentaje de mortandad fue de 33.8 % mientras que para la estructura de rama a la misma concentración mínima (60 mg/mL) el porcentaje de mortandad fue de 40% esto podría deberse a la variedad entre sus grupos funcionales expresados el espectro de infrarrojo (IR), por otro lado la corteza a una concentración mínima inhibitoria del 30 mg/mL el porcentaje de mortandad fue de 26, por tanto podríamos inferir que el principio activo de corteza es menos toxico que el de hoja y rama. Cabe señalar que las estructuras de hoja, rama y corteza no rebasan la dosis letal media LD₅₀ por lo cual las tres estructuras presentan baja toxicidad aguda frente al crustáceo *Artemia salina* Leach.

Fig. 12. Actividad biológica frente a *Artemia salina* Leach.

Estructura	Concentración (CMI mg/mL)	% mortandad
Hoja	60	33.8
Rama	60	40
Corteza	30	26
Blanco	0	0

X. Conclusiones

* El suelo donde crece *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. es un suelo ácido, alto en materia orgánica, arenoso; lo cual le confiere una buena aeración y drenaje; tales características lo clasifican como un Regosol. Por tanto se concluye que estos suelos son buenos para el desarrollo de Aile.

* El mejor rendimiento obtenido en la relación a la estructura vegetal (peso fresco) extracto (peso seco) para *Alnus acuminata* fue encontrado en la extracción realizada para hoja (10.2%), seguida de corteza (8.1%) y finalmente el menor rendimiento se observó en rama (3.0%).

* De los microorganismos estudiados, se presentó respuesta antimicrobiana en tres bacterias, *Corynebacterium xerosis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei* y un hongo, *Geotrichum sp.*; Para *Corynebacterium xerosis* en las estructuras de corteza y hoja con una concentración de 30 mg/mL. y en rama con una concentración de 60 mg/mL. En *Staphylococcus aureus* en la estructura de hoja con una concentración de 90 mg/mL. y en corteza con una concentración de 30 mg/mL. no habiendo respuesta en rama, finalmente para *Mycobacterium phlei* sólo se presentó sensibilidad antimicrobiana en la estructura de corteza con una concentración de 120 mg/mL., Para el hongo *Geotrichum sp.* En las estructuras de hoja y rama con una concentración de 120 mg/mL. y en corteza con una concentración de 90 mg/mL.

* Los microorganismos más sensibles al principio activo de *Alnus acuminata subespecie arguta* (Schlecht), H.B.K. fueron *Corynebacterium xerosis* y *Geotrichum sp.* debido a que presentó sensibilidad a todas las estructuras (hoja, rama y corteza), por otro lado el más resistente fue para *Mycobacterium phlei*. debido a que presenta sensibilidad en sólo una estructura (corteza).

* En el ensayo de antibiograma se observó que al aumentar la concentración el tamaño del halo de inhibición es mayor, de tal manera que éste es proporcional a la concentración del principio activo.

* Las pruebas de sensibilidad resultaron negativas en todos los ensayos, para los siguientes microorganismos; Bacterias: *Escherichia coli* Hongos: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea* y *Cryptococcus neoformans*

* El espectro de infrarrojo permitió conocer los grupos funcionales de los cuales está compuesto *Alnus acuminata*; encontrando así alcoholes asociados, polímeros, huellas de benceno, éter, compuestos aromáticos y cetonas en cada una de las estructuras (hoja, rama y corteza). Por otro lado la corteza presentó ácidos carboxílicos, mientras que hoja y rama presentan compuestos nitrogenados.

* El análisis de toxicidad con *Artemia salina* Leach, al cual se sometió el principio activo de cada una de las estructuras de la planta (hoja, rama y corteza) no es tóxico.

* La hipótesis se cumplió de manera parcial ya que las estructuras de (hoja, rama y corteza) sólo presentaron efecto a 4 microorganismos de 10 planteados, siendo estos *Corynebacterium xerosis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei* y *Geotrichum sp.*

XI. Apéndice

(N_o 1)

Contraste múltiple de Rango para el Halo de *Geotrichum* sp según la concentración de *Geotrichum*.

--

Método: 95.0 porcentaje LSD

ConGeo	Frec.	Media	Grupos homogéneos
90	8	4.825	X
120	8	5.99375	X
Contraste			Diferencias +/- Límites
90 - 120			*-1.16875 0.606448

* indica una diferencia significativa.

(N_o2)

Contraste múltiple de rango para el Halo de *Geotrichum* sp. según la estructura (hoja, rama y corteza).

--

Método: 95.0 porcentaje LSD

ESTRUCTUGE01	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Hoja	8	4.6625	X
Rama	8	4.7875	X
Corteza	8	5.99375	X
Contraste			Diferencias +/- Límites
Corteza - Hoja			*1.33125 0.383039
Corteza - Rama			*1.20625 0.383039
Hoja - Rama			-0.125 0.383039

* indica una diferencia significativa.

(N_o3)

_Contraste Múltiple de Rango para la concentración de Staphylococcus aureus según su Halo ..

Método: 95.0 porcentaje LSD

ConSaurus	Frec.	Media	Grupos homogéneos
30	8	3.9625	X
60	8	4.4875	X
90	8	6.3625	XX
120	8	7.975	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
30 - 60	-0.525	2.4248
30 - 90	-2.4	2.4248
30 - 120	*-4.0125	2.4248
60 - 90	-1.875	2.4248
60 - 120	*-3.4875	2.4248
90 - 120	-1.6125	2.4248

* indica una diferencia significativa.

(N_o4)

Contraste múltiple de Rango para el Halo de Staphylococcus aureus según la concentración

Método: 95.0 porcentaje LSD

CONCAURUS1	Frec.	Media	Grupos homogéneos
90	8	4.0875	X
120	8	5.7125	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
90 - 120	*-1.625	0.161496

* indica una diferencia significativa.

(N_o5)

Contraste Múltiple de Rango para el halo de *Staphylococcus aureus* según la concentración mínima inhibitoria

Método: 95.0 porcentaje LSD

Estructura Aureus	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Hoja	8	4.825	X
Corteza	8	5.99375	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Hoja-Corteza	*-1.16875	0.606448

* indica una diferencia significativa.

(N_o6)

Contraste Múltiple De Rango para el halo de *Corynebacterium Xerosis* Según la concentración (30,60,90,120 mg/mL)

Método: 95.0 porcentaje LSD

ConXerosis	Frec.	Media	Grupos homogéneos
30	8	4.125	X
60	8	4.8	X
90	8	5.7	X
120	8	6.975	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
30 - 60	*-0.675	0.614828
30 - 90	*-1.575	0.614828
30 - 120	*-2.85	0.614828
60 - 90	*-0.9	0.614828
60 - 120	*-2.175	0.614828
90 - 120	*-1.275	0.614828

* indica una diferencia significativa.

(N_o7)

Contraste múltiple de rango para el halo de *Corynebacterium xerosis* según la estructura (hoja, rama y corteza).

!

EstructuraXe	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Rama	24	4.26667	X
Hoja	24	4.27083	X
Corteza	24	5.825	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Corteza - Hoja	*1.55417	0.470561
Corteza - Rama	*1.55833	0.470561
Hoja - Rama	0.00416667	0.470561

* indica una diferencia significativa.

(N_o8)

Contraste múltiple de rango del halo de *Corynebacterium xerosis*, *Mycobacterium phlei*, *Geotrichum sp.* y *Staphylococcus aureus*, según la concentración (CMI).

Método: 95.0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
HaloXerosis	80	4.72125	X
HaloPhlei	8	4.925	XX
HaloGeo	40	5.2525	XX
HaloSaurus	48	5.43125	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
HaloGeo - HaloSaurus	-0.17875	0.616602
HaloGeo - HaloXerosis	0.53125	0.557738
HaloGeo - HaloPhlei	0.3275	1.11548
HaloSaurus - HaloXerosis	*0.71	0.52584
HaloSaurus - HaloPhlei	0.50625	1.09987
HaloXerosis - HaloPhlei	-0.20375	1.06799

* indica una diferencia significativa.

XII. Bibliografía

- Allen T.F. 1997. The Enciclopedia of pare Materia Médica Vo. I New Delhi: B. Jain Publisher.
- Allen B. y Baker F. 1976. Aislamiento e identificación y pruebas de sensibilidad. Editorial Médica Panamericana México.
- Alonso J. 2004. Tratado de fitofarmacos. Edit, Corpus. Argentina.
- Ángel M. 1999. Farmacognosia General, Editorial síntesis. México.
- Aníbal N. 1990 Árboles y Arbustos útiles de México. Ed. Limusa México
- Alfaro T., Chalala M. Rodríguez C. 2000. Lavado y desinfección de drogas vegetales. Normas técnicas. Proceso tecnológico (proyecto). Departamento de control microbiológico del centro de investigación y desarrollo de medicamentos. México.
- Bear F. 1980. Los suelos en relación con el crecimiento de los cultivos. Ediciones Omega S.A. Barcelona España.
- Berridge M.V., Tan AS, Mc Coy K, Wang R. 1996 The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium SALT. Biochemical New York.
- Bisset N.G. 1994: Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. A handbook for practice on a scientific basis". Meadpharm Scientific Publishers, Stuttgart New York.
- Bhogama N.V. 1978. Bioquímica. 1ra Edición Edit. Interamericana. México.
- Black C.A. 1975 Relaciones suelo planta 1ra Edición Edit. Hemisferio sur Argentina.
- Bohn H.L 1993 Química de suelos 1ra Edición Edit. Limusa México.
- Bosch, 2005 Actividad antimicrobiana de *Diphysa minutifolia* Rose. Rev. Cubana Plant. Med.vol.10 Ciudad de la habana May-Aug. 2005 Revisión febrero 2007.
- Brock T.D. 1991. Microbiología. 6 ta Edición. Edit. Prentice- Hall. México.
- Buckaman H. Y Brady N. 1991. Naturaleza y propiedades de los suelos. 4^{ta} Edit. Utea. México.
- Cacho J. 1997. El Antibiograma. Rev. Biomed, vol 9/No. 3/ jul-sep.
- Coas J. y Smith 1996 An economic perpective on policy to reduce antimicrobial resistance New York: Academic Press.
- Cohen M.L. 1992. Epidemiology of drog. Resistance: implication for a post-antimicrobial Edit. Clinical Microbiology Reviws New York.
- Cosat J., Van S., y Lea P. 1996. Superbugs: shoul antimicrobial resistance be included as cost in economic evaluation New York.
- Cowan M.N. 1991. Plant product as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviws Society of Europea, Vol. 25 Oxford Uni. Press.
- Collins C. y Lyne M: 1989. Métodos microbiológicos. Editorial Acriba. Zaragoza España.
- Chiereghin. 2000. Farmacia verde Manual practico; primera edición, editorial AMV. Ediciones México.
- Daver 1980. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Ed. Mundi-prensa. España.
- Devienne K. y Raddi M.S. 2002. Screenig for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer Brazilian Jornal of. Microbiology Vol.3 London New York: Longman.

- Elfo J.N. 1988. Sensitive and quick microplante thod to determine the mineral inhibitory concentration of plant excrests for bacteria.
- Esteban J. y Fernández R. 2000. Micro bacterias de crecimiento rápido en patología humana. Edit. Panamericana México.
- Evans, W.C. 1996. "Trease and Evans. Pharmacognosy" (14^a ed.). W.B Saunders Company Ltd., Londres).
- Forés R. 1997. Atlas de las plantas medicinales y curativas, La salud a través de las plantas. Editorial cultural México.
- Foth H.D. *etal.*, 1998. Fundamentos de la ciencia del suelo 4^{ta} edición. Edit. Continental México.
- Finegold M. y Martin W. 1983. Diagnostico microbiológico. 6^a Edición. Editorial medica Panamericana. Buenos Aires Argentina.
- Frank C. Lu., 1998. Toxicología básica Riesgos por exposición a sustancias toxicas. Edit; HARLA México.
- García H. 1995. Plantas curativas mexicanas descripción y uso 4^{ta} reimpresión editorial panamericana México.
- Gaucher G. 1971. El suelo tratado de pedología agrícola y sus características agronómicas Edit. Omega Barcelona España.
- Gómez F. 2001. Plantas mexicanas Edit. UNAM Instituto de química. México.
- González de Buitrago 1992. Tecnología y métodos de laboratorio clínico. Edit. Salvat. Barcelona España.
- Guerra Ordóñez M., 2004 Actividad antimicrobiana de *Senna alata* L. Rev. Cubana Plant. Med. Vol. 19 Centro de investigación y desarrollo de medicamentos http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol19_01_04pla05104.htm.
- Gonzáles Figueroa. 1996. Microbiología bucal y Clínica. Editores Fendez, S.A. de C.V. México.
- Harborne H. 1984. Phytochemical Methods (guide to moderns techniques of plants analysis) 2^{da}. Edition New York.
- Hawkes C.H. 1980. Los árboles 1^{ra} reimpresión edit. Bluce Barcelona España.
- Herbert R. 1990. The biosintesis of secondary metabolites, 2^{da} ed. New york Champan and hall.
- Hernández D. Y Rodríguez J. 2001. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en cuba Rev. Cubana Vol. 4 Plan Med.Disponible en http://bvs.sld.cu./revistas/pla/vol15_01_08/pla05204.htm.
- Hernández H. 1996. Estudios bioquimicos y fisiológicos en pre y post cosecha de la fruta del tamarindo Tesis Universidad Autónoma de Chapingo México.
- Hoareaul D. 1999. Medical plant: a reemerging health ind. Electronic jornal of biotechnology vol. 4.
- Hugo J. 1980. Los árboles. 1^{era} Reimpresión. Edit. Blume. Barcelona España.
- Ibarra A. 2001. La Herbolaria en México Natural Edit. Serial online.
- Jackson M.L. 1964. Análisis físico y químico de suelo. Traducción al español por J. Beltran. Omega Barcelona, España.
- Keeler, R. 1983 Naturally Ocurring Teratogens from Plants. En Handbook of Natural Toxic, Vol. I (eds. R.F. Keeler). New York and Basel: Marcel Dekker.
- Koneman E.W, Allen SD. 1997. Diagnostico microbiológico. 3^{ra} Ed. Edit. Panamericana México.
- Koneman E.W, Allen SD. 1992. Diagnostico microbiológico. 2^{ra} Ed. Edit. Panamericana México.

- Kumate, 1993. La investigación científica de la herbolaria Medicinal Mexicana, Edit. Conmemorativa. México.
- Kuklinski 2003. Farmacognosia, Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen vegetal, Ediciones Omega Primera reimpresión España.
- Leal F. 1986. Manual de prácticas de fruti cultivo de IICA Costa Rica.
- Levy S.B. 1998. The Challege of Antibiotic Resistente. Scientific American. (serial on line) 1998 marzo (citado 2006 junio5). Abalible from: URL:<http://www.sciam.com>
- Linares M. 1996. Selección de plantas medicinales de México edit. Limusa 5^{ta} reimpresión México.
- Lozoya X. 1999. La herbolaria en México edit. CONACULTA México.
- Lynch M.J. 1997. Métodos de laboratorio de 2^{da} edición. Edit. Interamericana México.
- Martham K. 1982. Tecniques of flavonoid identification. New york Academia press
- Martinez C.V. 2005. El mundo de las plantas (serial onli) Avalivle from flavurl:<http://www.botanicol.onine.com/medicinalesonoi> ttm.
- Martínez P. 2000. Plantas medicinales: relato de una posibilidad confiscada; El estado de la flora en la biomedicina mexicana. Instituto Nacional de Antropología e Historia. México.
- Maximino Martínez 1996. Las plantas medicinales de México Edit. Botas septima reimpresión. México.
- Mendoza M.T. 1998 What`snw in antimicrobial susceptibility tetina. Phil J. Microbial infect. New York: Academic Press New York.
- Meyer J.,1982 Artemia sp. En investigación y docencia Cuaderno 2, Editorial CBS UAM- Xochimilco México.
- Moron F. Y Sierra P. 1982. Programas de medicina tradicional Herbolaria en Cuba Med. Vol 7.
- Muñoz. F. 1987. Plantas Medicinales y Aromaticas. Estudio cultivo y procesado. Ediciones Medi-prensa, Madrid España.
- Nieto de Pascual y Zamora M. 1989. Características del aile Alnus acuminata H.B.K en el Valle de México ciencia forestal México.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000.
- Ochoa Francisco. 1996. Plantas Medicinales de México, composición, usos y actividades Biológicas. Editorial. UNAM México.
- Preadeau Dominique. 1998. Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos; editorial Uteha Noruega Editores., Limusa S.A de C.V. México.
- Pérez A. 2001. Enciclopedia de las plantas medicinales. Edimat libros. Madrid España.
- Potter´s 1998. Nueva enciclopedia de medicina herbolaria y preparados Botánicos Edit. Grijalbo México.
- Puri Ballus 1997. Atlas de las plantas medicinales y curativas. La salud a través de las plantas, Edit. Cultural S.A. México.
- Richards L.A. 1990. Diagnósticos y rehabilitación de suelos 6^{ta} edit. Departamento de Agricultura de EUA. Limusa México.
- Robinson R. 2000. Encyclopaedia of food microbiology. Vol. II, Great Britain: Academic press.
- Rzedowski J. 1994. Vegetación de México. 6^{ta} reimpresión. Edit. Limusa. México.

- Rzedowski J. y Calderón R. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2^{da} Edición. Instituto de ecología y CONABIO. Pátzcuaro, Michoacán México.
- Rzedowski, J. 1988. Vegetación de México. Ed. Limusa. México.
- Sabates R. 1995. La salud por las plantas medicinales y la medicina natural; Editorial Centro E.N. CEDAL; S.A. Barcelona España.
- Saldierna M., Suárez R., y García C. 2000. Recetario de Hierbas y plantas medicinales. Ediciones Euromexico. Colombia.
- Sanchez V, Saldoval D, Herrera P, Orquedo M. Alcaloides en especies cubanas del genro croton L,l. Estudio quimico preliminar Rev. Cubaa Farm 1999 vol.15. revisado 7 agosto 2007.
- Stainer R.G. 1996. Microbiología. 2^{da} Edición. Edt. Reverte. Barcelona España.
- Stainer. 2000. Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Procedimientos en microbiología clínica. Métodos básicos para estudios de sensibilidad a los antimicrobianos. España.
- Sincholle D., Cotta M., Guedon D., Coll R. 1987. Plantes medicinal et decontamination . Pharm Acta Helv. 1987,62(1): 17-18.
- Tamhane R. 1979. SUELOS: su química y fertilidad en zonas tropicales. Edit. Diana México.
- Ted A. 1998. Fundamentos De Toxicología. Edit; Acribia Zaragoza España.
- Thompson L.M. 1982. Los suelos y su fertilidad. Edit. Reverte. España.
- Tomas D,H. Brock, R. Michael. 1988. Biology of microorganisms. 5^{ed} New Jersey: Ed. Englewood Clifs.
- Trese-Evans 1998. Farmacognosia 13^{ra} edición; Editorial Mc. Graw-Hill México D.F.
- Varma 1995. Encyclopedia of homeopathic pharmacopea PW. Indu New Delhi:Vaid. B. Jain Publisher.
- Volak J. y Standalí J. 1990. Plantas Medicinales. TSNP Marti. Checoslovaquia.