



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

Evaluación *in vitro* de el efecto inhibitorio de los principios activos de *Eryngium carlinae* y *Lupinus montanus* en microorganismos patógenos del hombre

TESIS QUE PARA
OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

Presentan

Maximina Martínez Romero

Gabriel Ramírez González

Director de tesis:

M. en C. María de Jesús Sánchez Colín

Septiembre, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

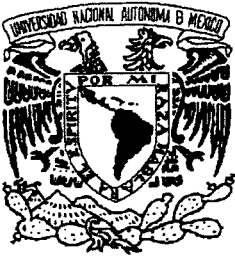


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que la alumna MARTINEZ ROMERO MAXIMINA, con número de cuenta 40109373-5 de la carrera de Biólogo se le ha fijado el día 12 del mes de septiembre de 2006 a las 14:00 hrs. para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. MANUEL FAUSTINO RICO BERNAL.

VOCAL M. en C. MARÍA DE JESÚS SÁNCHEZ COLÍN.

SECRETARIO BIÓL. RUBÉN ZULBARÁN ROSALES.

SUPLENTE M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES.

SUPLENTE M. en C. PATRICIA RIVERA GARCÍA.

Handwritten signatures on horizontal lines corresponding to the jury members.

El título de la tesis que presenta es: Evaluación in vitro de el efecto inhibitorio de los principios activos de Eryngium carlinae y Lupinus montanus en microorganismos patógenos del hombre.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
México, D.F., a 11 de agosto de 2006

Vertical stamp: FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES with a small crest.

MTRO. JUAN FRANCISCO SÁNCHEZ RUÍZ
DIRECTOR D I R E C C I O N

Handwritten signature and stamp: VO. BO.

BIÓL. MARICELA ARTEAGA MEJÍA
JEFA DE CARRERA

RECIBI
OFICINA DE EXAMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno RAMÍREZ GONZÁLEZ GABRIEL, con número de cuenta 9517954-2 de la carrera de Biólogo se le ha fijado el día 12 del mes de septiembre de 2006 a las 16:00 hrs. para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE M. en C. MANUEL FAUSTINO RICO BERNAL.

VOCAL M. en C. MARÍA DE JESÚS SÁNCHEZ COLÍN.

SECRETARIO BIÓL. RUBÉN ZULBARÁN ROSALES.

SUPLENTE M. en C. BÁRBARA SUSANA LUNA ROSALES.

SUPLENTE M. en C. PATRICIA RIVERA GARCÍA.

Handwritten signatures on horizontal lines corresponding to the jury members.

El título de la tesis que presenta es: Evaluación in vitro de el efecto inhibitorio de los principios activos de Eryngium carlinae y Lupinus montanus en microorganismos patógenos del hombre.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
México, D. F., a 11 de agosto de 2006.



MTRO. JUAN FRANCISCO SÁNCHEZ RUÍZ
DIRECTOR DIRECCIÓN

Handwritten signature of Maricela Arteaga Mejía.

VO. BO.
BIÓL. MARICELA ARTEAGA MEJÍA
JEFA DE CARRERA

RECIBI
OFICINA DE EXAMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la vida por tener la oportunidad de conocer este mundo tan maravilloso.

A mis padres:

Juan Martínez Romero y Natividad Romero Bernabé

y a mis hermanos;

Alejandra, Félix, Juan, Leticia, Matilde, Olivia y Rolando

Por haberme apoyado incondicionalmente en las decisiones de mi vida, por su paciencia, comprensión, por los valores y principios de la vida, por su amor, por haber confiado en mí, ya que sin su apoyo no lo hubiera podido lograr.

A **Toda mi familia** por ser lo más importante que tengo en la vida y por todos sus consejos.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por haber proporcionado los medios para mi formación profesional.

A la **Carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** y a **sus profesores** que participaron con enseñanzas y consejos en mi formación profesional.

A los profesores que me apoyaron para llevar a cabo este trabajo; **M. en C. Manuel Faustino Rico Bernal, M. en C. María de Jesús Sánchez Colín, Biol. Rubén Zulbarán Rosales, M. en C. Bárbara Susana Luna Rosales y M. en C. Patricia Rivera García.**

A **todos mis amigos** de la generación 2001-2005, por haberme acompañado y aconsejado en los momentos de duda en mi vida.

A **todos aquellos que participaron en mi vida cotidiana durante mi carrera universitaria**, y que por no dejar a nadie fuera de una larga lista y por falta de espacio no los menciono esperando me disculpen.

**CON GRAN RESPETO Y CARIÑO, A TODOS
GRACIAS**

MAXIMINA MARTÍNEZ ROMERO

A la persona más importante en mi vida:

Las palabras no alcanzan, y aún en la retórica más bella, las frases se vuelven tontas e insuficientes para decir, lo que día a día sin decir, te dice mi corazón:

*Gracias a ti, mamá, por haberme dado la dicha de vivir para conocerte,
por haberme dado la oportunidad de conocer, aprender y vivir.*

*Gracias por soportar y perdonar mis errores,
por estar siempre a mi lado,
por pensar en mí.
por creer en mí.*

*Gracias a la vida,
que me ha dado tanto;
me ha dado la risa
y me ha dado el llanto.*

*Así yo distingo
dicha de quebranto,
los dos materiales
que forman mi canto;
y el canto de ustedes,
que es el mismo canto;
y el canto de todos,
que es mi propio canto.*

Gracias a la vida que me ha dado tanto.

Con el más eterno amor... tu hijo:

Gabriel

DEDICATORIAS

A todas aquellas personas que tengan la oportunidad de consultarlo pues estoy segura que servirá como base para realizar otro trabajo.

A las dos personas que más admiro y respeto en este mundo mis padres: *Juan Martínez Romero y Natividad Romero Bernabé* por haberme brindado la oportunidad de superarme.

Con admiración, respeto y alegría dedico este trabajo a mis *hermanos y hermanas, tíos y tías, primos y primas, sobrinos y sobrinas*.

A todos *mis compañeros y amigos*, tanto de la escuela como fuera de ella, por que todos necesitamos confiar en alguien.

A cinco personas que empiezan a conocer el maravilloso mundo y que espero ayudar de alguna manera para que sean prósperos en el camino de la vida:

*Víctor Manuel, mi sobrino
Hugo Armando, mi sobrino
Jorge Armando, mi sobrino
Juan Daniel, mi sobrino
y Valeria Carolina, mi sobrina*

CON AMOR, CARIÑO Y RESPETO

MAXIMINA MARTÍNEZ ROMERO

“Dedico este trabajo a toda mi familia, por ser el pilar sobre el cual se erigen mis sueños”

Gabriel

A mi madre por haberme dado la vida y con ello el regalo más preciado que uno puede tener.

A mis hermanos Rosa, Domi, Soila, Guadalupe y Jesús, por todos sus esfuerzos y sacrificios, los cuales espero compensar en parte, con este logro que también es suyo. A mi tía (mi única tía), por haberme brindado su apoyo cuando la necesite.

A mi hermana Domi, por todo cuanto sacrifico por nosotros, sus hermanos. A Lupita, por tener ese corazón tan noble, compasivo y lleno de fe. A mi hermano Jesús, por su coraje y determinación.

A todos mis niños (mis sobrinos y sobrinas), por que cada una de sus sonrisas es una inyección de alegría e ilusiones en mi corazón.

A todos mis amigos (no, acabo la lista), por todos los momentos (ahora recuerdos) que compartimos juntos, y por que espero vengan muchos más.

A mis maestros, por todo cuanto me enseñaron y olvidaron enseñarme.

A todo aquel que cree en si mismo, y que lucha por lograr sus sueños dedico este trabajo y comparto este poema.

¡Piu avanti!

No te des por vencido, ni aún vencido,
no te sientas esclavo, ni aún esclavo;
trémulo de pavor, piénsate bravo
y arremete feroz, ya mal herido.

Ten el tesón del clavo enmohecido,
que ya viejo y ruin vuelve a ser clavo;
no la cobarde intrepidez del pavo
que amaina su plumaje al primer ruido.

Procede como Dios, que nunca llora,
o como Lucifer, que nunca reza,
o como el robledal cuya grandeza
necesita del agua y no la implora

¡ Que muerda y vocifere vengadora,
ya rodando en el polvo tu cabeza!

Almajuerte

INDICE

	Página
LISTA DE IMÁGENES	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE GRAFICOS	xi
RESUMEN	1
ABSTRAC	3
INTRODUCCION	5
CAPITULO I:	
MARCO TEORICO	
Importancia de las áreas naturales protegidas	8
Plantas medicinales	9
Las plantas medicinales a través de los siglos	12
La medicina moderna y el resurgimiento de las plantas medicinales en México	14
Perspectivas	16
CAPITULO II:	
DEL EXTRACTO VEGETAL AL PRINCIPIO ACTIVO	
El principio activo	18
Métodos de extracción de los principios activos en las plantas	20
Métodos de identificación de los principios activos	23
Efecto antimicrobiano de los principios activos (antibióticos)	25
El antibiograma	26
Antecedentes de la acción antimicrobiana de las plantas medicinales	28
CAPITULO III:	
CARACTERISTICAS DE LAS PLANTAS	
<i>Eryngium carlinae</i>	
Nombres comunes	31
Clasificación científica	31
Descripción botánica	31
Composición química	32

Uso medicinal	32
Hábitat	33
Distribución	33
<i>Lupinus montanus</i>	
Clasificación científica	34
Descripción botánica	34
Composición química	34
Uso medicinal	35
Otros usos	35
Hábitat	35
Distribución	35
CAPITULO IV:	
CARACTERISTICAS DE LOS MICROORGANISMOS	
Bacterias	37
Hongos	39
Medios de cultivo	40
Técnica de siembra	42
CAPITULO V:	
ZONA DE RECOLECTA	
Parque Nacional Izta –Popo	44
Ubicación geográfica	45
Clima	46
Tipo de vegetación	47
Tipo de suelo	49
Problemática del parque	50
CAPITULO VI:	
OBJETIVOS	
General	52
Particulares	52
CAPITULO VII:	
HIPOTESIS DE TRABAJO	
Caso 1: <i>Eryngium carlinae</i>	54
Caso 2: <i>Lupinus montanus</i>	54

CAPITULO VIII:

FASE DE CAMPO

Sitio de muestreo	56
Recolecta del material vegetal y muestreo del suelo	56

CAPITULO IX:

FASE DE LABORATORIO

Determinación de propiedades físicas y químicas del suelo	58
Determinación de especies vegetales presentes en el área de estudio	58
Procesamiento de las plantas y obtención de la tintura vegetal	59
Obtención de extracto en peso seco	60
Preparación de concentraciones e impregnación de sensibilizadores	60
Cepas de microorganismos	60
Estandarización del inóculo microbiológico	61
Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	62
Análisis de espectroscopia de infrarrojo	62

CAPITULO X:

FASE DE GABINETE

Análisis estadístico	64
----------------------	----

CAPITULO XI:

RESULTADOS Y DISCUSION

Determinación de las propiedades físicas y químicas del suelo	66
Rendimiento estructura vegetal – extracto (peso seco)	67
Pruebas de sensibilidad con extractos vegetales obtenidos a partir de <i>Eryngium carlinae</i>	69
Espectros IR de <i>Eryngium carlinae</i>	85
Pruebas de sensibilidad con extractos vegetales obtenidos a partir de <i>Lupinus montanus</i>	90
Espectros IR de <i>Lupinus montanus</i>	100

CAPITULO XII:

CONCLUSIONES	108
---------------------	-----

BIBLIOGRAFIA	111
---------------------	-----

APENDICE

Datos estadísticos (<i>Eryngium carlinae</i>)	119
Datos estadísticos (<i>Lupinus montanus</i>)	125
Antibiogramas obtenidos con <i>Eryngium carlinae</i>	129
Antibiogramas obtenidos con <i>Lupinus montanus</i>	130

LISTA DE IMÁGENES

Número	Página
1. <i>Eryngium carlinae</i>	32
2. <i>Lupinus montanus</i>	35
3. Parque Nacional Izta-Popo	45
4. Zona de muestreo en la región Paso de Cortés	56
5. Espectro Infrarrojo de los extractos de flor (<i>Eryngium carlinae</i>)	86
6. Espectro Infrarrojo de los extractos de raíz (<i>Eryngium carlinae</i>)	87
7. Espectro Infrarrojo de los extractos de tallo (<i>Eryngium carlinae</i>)	88
8. Espectro Infrarrojo de los extractos de flor (<i>Lupinus montanus</i>)	100
9. Espectro Infrarrojo de los extractos de fruto (<i>Lupinus montanus</i>)	101
10. Espectro Infrarrojo de los extractos de hoja (<i>Lupinus montanus</i>)	102
11. Espectro Infrarrojo de los extractos de raíz (<i>Lupinus montanus</i>)	103
12. Espectro Infrarrojo de los extractos de tallo (<i>Lupinus montanus</i>)	104

LISTA DE CUADROS

Número		Página
1.	Estado actual y perspectivas de las plantas medicinales en México	9
2.	Escala de McFarland	61
3.	Resultados del análisis de muestras compuestas de suelo	66
4.	Cantidad y rendimiento obtenido para <i>Eryngium carlinae</i> (tintura vegetal)	67
5.	Cantidad y rendimiento obtenido para <i>Lupinus montanus</i> (tintura vegetal)	67
6.	Resultados del tamaño promedio de los halos de inhibición en pruebas de sensibilidad con bacterias y hongos, utilizando los extractos obtenidos a partir de <i>Eryngium carlinae</i> .	69
7.	Resultados del tamaño promedio de los halos de inhibición en pruebas de sensibilidad con bacterias y hongos, utilizando los extractos obtenidos a partir de <i>Lupinus montanus</i> .	90

LISTA DE GRAFICOS

Número	Página
Gráfico 1. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Mycobacterium phlei</i> causados por extractos de flor.	71
Gráfico 2. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Mycobacterium phlei</i> causados por extractos de hoja.	71
Gráfico 3. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Mycobacterium phlei</i> causados por extractos de raíz.	72
Gráfico 4. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Mycobacterium phlei</i> causados por extractos de tallo.	72
Gráfico 5. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Mycobacterium phlei</i> .	73
Gráfico 6. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Streptococcus β-hemolítico</i> causados por extractos de flor.	74
Gráfico 7. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Streptococcus β-hemolítico</i> causados por extractos de hoja.	74
Gráfico 8. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Streptococcus β-hemolítico</i> causados por extractos de raíz.	75
Gráfico 9. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Streptococcus β-hemolítico</i> causados por extractos de tallo.	75
Gráfico 10. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Streptococcus β-hemolítico</i> .	76
Gráfico 11. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida albicans</i> causados por extractos de flor.	77
Gráfico 12. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida albicans</i> causados por extractos de raíz.	77
Gráfico 13. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida albicans</i> .	78
Gráfico 14. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida krusei</i> causados por extractos de flor.	79

Gráfico 15. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida krusei</i> causados por extractos de hoja.	79
Gráfico 16. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida krusei</i> causados por extractos de raíz.	80
Gráfico 17. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida krusei</i> causados por extractos de tallo.	80
Gráfico 18. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida krusei</i> .	81
Gráfico 19. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Cryptococcus neoformans</i> causados por extractos de raíz.	82
Gráfico 20. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Geotrichum spp.</i> , causados por extractos de flor.	83
Gráfico 21. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Geotrichum spp.</i> , causados por extractos de raíz.	83
Gráfico 22. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Geotrichum spp.</i>	84
Gráfico 23. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Corynebacterium xerosis</i> causados por extractos de flor.	92
Gráfico 24. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Corynebacterium xerosis</i> causados por extractos de fruto.	92
Gráfico 25. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Corynebacterium xerosis</i> causados por extractos de hoja.	93
Gráfico 26. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Corynebacterium xerosis</i> causados por extractos de raíz.	93
Gráfico 27. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Corynebacterium xerosis</i> causados por extractos de tallo.	93
Gráfico 28. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Corynebacterium xerosis</i> .	94
Gráfico 29. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Streptococcus β-hemolítico</i> causados por extractos de flor.	95

Gráfico 30. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Streptococcus β-hemolítico</i> causados por extractos de raíz.	95
Gráfico 31. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Streptococcus β-hemolítico</i> .	96
Gráfico 32. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida krusei</i> causados por extractos de fruto.	97
Gráfico 33. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida krusei</i> causados por extractos de hoja.	97
Gráfico 34. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida krusei</i> causados por extractos de raíz.	98
Gráfico 35. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida krusei</i> causados por extractos de tallo.	98
Gráfico 36. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de <i>Candida krusei</i> .	99

RESUMEN

En los países desarrollados se observa un creciente interés en la generación de medicamentos de origen vegetal, a su vez, en países como el nuestro se realiza desde hace tiempo, investigaciones cuyo objetivo es conocer el potencial terapéutico de la flora mexicana.

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto inhibitorio de los principios activos de dos especies vegetales que crecen dentro de un Área Natural Protegida, conocida como Parque Nacional Izta-Popo, *Eryngium carlinae* y *Lupinus montanus* en microorganismos patógenos del hombre. La zona de muestreo de la presente investigación se sitúa en Paso de Cortés, en las coordenadas geográficas: latitud N. 19° 05' 0.4'', longitud oeste 98° 37' 8.15'' a una altitud de 3700 msnm.

Las plantas colectadas se sometieron a un proceso de desinfección, posteriormente se pesaron por estructura (flor, hoja, raíz, tallo y fruto) y se preparó una tintura mediante el Método Galénico, de cada una de las estructuras por planta. Se preparó una serie de diluciones (por planta y estructura) hasta alcanzar las concentraciones de 30, 60, 90 y 120 mg / ml, para después realizar los antibiogramas con las cepas bacterianas: *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus β-hemolítico*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium phlei*; y los hongos: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea*, *Cryptococcus neoformans* y *Geotrichum sp.* Todo lo anterior se realizó en medio de cultivo Mueller Hinton (bacterias) y Agar Dextrosa Saboraud (Hongos), mediante el Método de Difusión Kirby-Bauer y la técnica de Barry, con un total de 7 repeticiones para cada antibiograma. En cada caso se evaluó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en la que tuvo efecto el extracto vegetal sobre el patógeno.

Los resultados fueron los siguientes: *Eryngium carlinae* y *Lupinus montanus* crecen en suelos de tipo Andisol compartiendo el nicho ecológico con *Pinus hartwegii* y pastos del género *Muhlenbergia*.

Se encontró que los extractos obtenidos raíz de *Eryngium carlinae* presentaron un mayor efecto inhibitorio de tipo fungicida al inhibir el crecimiento de *Candida albicans* (CMI 30 mg/mL), *Candida krusei* (CMI 60 mg/mL), *Cryptococcus neoformans* (CMI 90mg/mL) y *Geotrichum sp.* (CMI 90mg/mL), y sólo presentaron efecto antibacteriano sobre las especies *Mycobacterium phlei* (CMI 30mg/mL) y *Streptococcus β-hemolítico*. (CMI 60mg/mL). Por otra parte, en los antibiogramas realizados con extractos de las estructuras de *Lupinus*

montanus, se encontró que se presenta efecto antimicrobiano, ya que la bacteria *Corynebacterium xerosis* y el hongo *Candida krusei* fueron sensibles a los extractos de todas las estructuras vegetales (CMI 30 mg/mL), mientras que la bacteria *Streptococcus β -hemolítico* solo fue inhibida por los extractos de raíz (CMI 30 mg/mL).

Finalmente, se realizó un análisis de espectroscopia de infrarrojo a los diferentes extractos de cada planta, encontrando la presencia de los siguientes grupos funcionales: alcohol, alcano, amina, amonio, aminoácidos, cetonas, éteres, ésteres, grupos metilo y grupos aromáticos.

Palabras Clave: Plantas medicinales, Principio activo, Antibiogramas, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

ABSTRACT

In the developed countries a growing interest is observed in the generation of medications of vegetable origin, in turn, in countries like ours is carried out for some time, investigations whose objective is to know the therapeutic potential of the mexican flora.

This work had as objective to evaluate the inhibiting effect of the active principles of two vegetable species that grow inside a Protected Natural Area, well-known as National Park Izta-Popo, that is; *Eryngium carlinae* and *Lupinus montanus* in pathogenic microorganisms of the man. The zone of sampling of the present investigation is located in Paso de Cortés, in the geographical coordinates: latitude N. 19 ° 05' 0.4'', west longitude 98 ° 37' 8.15'' to an altitude of 3700 msnm.

The plants collected were put under a disinfection process, later were weighed by structure (flower, leaf, root, shaft and fruit) and got ready a dye by means of the Galénic Method, of each one of the structures for plant. Has prepares a series of dilutions (for plant and it structures) until reaching the concentrations of 30, 60, 90 and 120 mg / ml, stops later to carry out the antibiograms with the bacterial strains: *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus - β-hemolítico*, *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium phlei*; and the fungus: *Cándida albicans*, *Cándida tropicalis*, *Cándida krusei*, *Cándida stellatoidea*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum sp.* All the previous mentioned one carries out medium cultivation Mueller Hinton (bacteria) and Agar Dextrosa Saborand (fungus), by means of the Diffusion Method Kirby-Bauer and the technique of Barry, with a total of 7 repetitions for each antibiograma. In each case the Inhibiting Least Concentration was evaluated (ILC) in the one that had effect the vegetable extract on the pathogen.

The results were the following: *Eryngium carlinae* and *Lupinus montanus*, grows in Andisol type soils, sharing the ecological niche with *Pinus hartwegii* and grasses of the gender *Muhlenbergia*.

It was found that the extracts obtained root of *Eryngium carlinae* presented a bigger effect inhibiting of fungicidal type when inhibiting the growth of *Cándida albicans* (ILC 30 mg/mL), *Cándida krusei* (ILC 60 mg/mL), *Cryptococcus neoformans* (ILC 90mg/mL) and *Geotrichum sp.* (ILC 90mg/mL), and they only presented antibacterial effect on the species *Mycobacterium phlei* (ILC 30mg/mL) and *Streptococcus β-hemolítico*. (ILC 60mg/mL). In the antibiograms carried out with extracts of the structures of *Lupinus montanus*,

it was found that antimicrobial effect is presented, since the bacteria *Corynebacterium xerosis* and the fungus *Cándida krusei* were sensitive to the extracts of all the vegetable structures (ILC 30 mg/mL), while the bacteria *Streptococcus β - hemolytic* was inhibited by the root extracts (ILC 30 mg/mL).

Finally, one carries out an analysis of infrared spectroscopy to the different extracts of each plant, finding the presence of the following functional groups: alcohol, alkane, amine, ammonium, amino acids, cetones, ether, esters, groups methyl and aromatic groups.

Key Words: Medicinal plants, Active principle, Antibio grams, Inhibiting Least Concentration (ILC).

INTRODUCCIÓN

Las Áreas Naturales Protegidas son un elemento clave para lograr la conservación y protección de la biodiversidad y de los recursos naturales de un país (Domínguez, 2002). Estos territorios se dedican fundamentalmente a la protección de las especies silvestres y a la investigación científica más que al disfrute público, y se convierten en verdaderos “laboratorios vivientes” donde los científicos observan a los organismos en su hábitat natural (CONABIO, 2002). En estas áreas existen gran cantidad de especies y fenómenos que no han sido estudiados a fondo, a esto hay que añadir que muchas de estas especies resultan ser únicas de una región en particular.

Desde hace ya mucho tiempo la comunidad científica a nivel mundial centra su atención en este tipo de regiones, teniendo como base en sus investigaciones, la conservación de estos espacios, pero de igual manera, evaluando posibles beneficios que puede obtener el hombre de organismos que en ellas se encuentren, lógicamente, esto último a través de la generación de conocimiento y no de la explotación del sistema. Sin embargo, a pesar de la protección oficial que les garantizan los gobiernos, los parques y reservas nacionales de todo el mundo se enfrentan a amenazas procedentes más allá de sus límites. Estas amenazas van desde la explotación forestal, la actividad minera y el pastoreo hasta el crecimiento de la presión demográfica en sus alrededores. (CONANP, 2004). Frente a este panorama, países con gran biodiversidad como el nuestro, requieren de una mayor investigación científica, capaz de integrar no sólo los aspectos de funcionalidad de un ecosistema u organismo, sino también su posible utilidad en beneficio del hombre.

En este sentido desde hace algunas décadas, la investigación de plantas medicinales a nivel mundial ya no es vista como un simple (sin que lo sea) rescate cultural sino; como una relevante actividad científica, constituyéndose como una alternativa viable en el desarrollo de nuevas técnicas terapéuticas y en la obtención de moléculas bioactivas que se manifiestan en diferentes mecanismos de acción (FAO, 1997, Bye y Linares, 1999).

En los países desarrollados, se observa un creciente interés en la generación de medicamentos de origen vegetal, a su vez, en países como el nuestro se realiza desde hace ya mucho tiempo investigaciones con el objetivo de conocer el posible potencial terapéutico de la flora mexicana. De tal forma, el uso de plantas medicinales lejos de verse desplazado ha cobrado fuerza

en los últimos tiempos y es previsible un gran aumento de la demanda del medicamento herbolario.

Desafortunadamente, como todas las Áreas Naturales Protegidas de nuestro país, el Parque Nacional Izta-Popo (sitio en el que se colectó el material vegetal) sufre un proceso de deterioro causado por la presión que ejercen las poblaciones aledañas por el aprovechamiento de los recursos, como lo son la tenencia de la tierra, la tala clandestina, cambios de uso de suelo, incendios forestales, entre otras tantas razones (CONANP 2004). Estos acelerados procesos de aculturación y de destrucción de ecosistemas determinan la necesidad de intensificar la investigación florística y etnobotánica en México, debido a que la pérdida de especies puede ser mucho más rápida que la generación de conocimiento.

Este trabajo pretende aportar el conocimiento básico de las propiedades medicinales de dos especies de plantas herbáceas, *Eryngium carlinae* y *Lupinus montanus* recolectadas en una ANP (Parque Nacional Izta – Popo), mediante el estudio de la sensibilidad *in vitro* de microorganismos que afectan la salud humana, a los principios activos de estas plantas. La importancia de este estudio radica en dos puntos esenciales: primeramente, se trata de dos especies vegetales que se presentan en una Áreas Naturales Protegidas, la cual pese a las adversidades a las que se enfrenta, genera las condiciones naturales adecuadas para su desarrollo. El hecho de obtener estas plantas en su estado natural es fundamental, debido a que con ello se evita algún tipo de sesgo en la información final, cosa que quizá no sucedería si se trabajase con las mismas especies cultivadas antropogénicamente, ya que estas pudiesen haber sido tratadas con fertilizantes químicos o plaguicidas que alterasen en uno u otro modo la química de la planta.

En el caso de *Eryngium carlinae* del estudio de una planta que ha sido y sigue siendo ampliamente utilizada en la medicina tradicional mexicana para la mitigación de un sinnúmero de malestares (Martínez, 1992; Argueta, 1994, SEMARNAT, 2004). Por otro lado, y en contraste a lo anterior, se estudió a la especie *Lupinus montanus*, planta de la cual no existe estudio alguno de sus propiedades medicinales, no así a nivel agrícola. El hecho de que no existan este tipo de estudios resulta desconcertante, pues desde ya hace muchos años se sabe que algunas variedades de *Lupinus* son evitadas como alimento animal por presentar un sabor amargo, el cual se debe tanto a los principios amargos que presenta, como a las altas concentraciones de alcaloides, siendo ambos, componentes activos de las plantas medicinales con acción farmacológica.

CAPITULO I
MARCO TEÓRICO

Importancia de las Áreas Naturales Protegidas

La cubierta vegetal de México es una de las más variadas de la Tierra, pues en su territorio están representados prácticamente todos los grandes biomas que se han descrito, desde los desiertos, donde la hostilidad y aridez del entorno apenas permite el desarrollo de vida, hasta las bellas y frondosas selvas; desde la vegetación netamente tropical de las zonas bajas y calientes, hasta los gélidos páramos de alta montaña. Aunado a esto, se cuenta con grandes extensiones de pastizales, bosques caducifolios y de coníferas (Rzedowski, 1983).

Esta gran diversidad, sin embargo, se ve amenazada por el crecimiento demográfico, tala clandestina, cambios de uso de suelo, entre tantos otros males. Debido a ello se han creado al igual que en muchas partes del planeta, zonas de resguardo, conocidas comúnmente como Áreas Naturales Protegidas, las cuales están sujetas a regímenes especiales de protección y desarrollo para asegurar la conservación de su biodiversidad.

La regulación de muchas áreas protegidas en el mundo prohíbe de manera estricta la caza de animales, el acopio y cosecha de vegetales o cualquier actividad dentro o fuera de un área protegida que ponga en riesgo la conservación de la misma.

Centrándonos en el tema de la flora, es evidente la importancia de este tipo de áreas, ya que si bien, el número de trabajos de investigación florística se ha incrementado, el conocimiento de la vegetación del país dista mucho de ser perfecto y queda aún mucho por hacer. Un claro ejemplo de esto es la falta de estudios experimentales acerca de las propiedades medicinales de muchas plantas que han sido utilizadas tradicionalmente de manera "empírica" (en el sentido de han sido utilizadas como remedio y no como un medicamento) y que aún más, se encuentran dentro de zonas protegidas.

De esta manera las Áreas Naturales Protegidas deben jugar un importante papel en el desarrollo nacional, en múltiples formas, como por ejemplo, y sin ser limitativo: posibilitando a través de la investigación científica un mejor conocimiento de nuestros recursos a fin de hacer más apropiado su manejo y utilización en beneficio del ecosistema y del ser humano.

Plantas medicinales

Una planta medicinal es una planta que, en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la hemisíntesis químico-farmacéutica (Cañigeral y Vila, 1998, Pérez, 2001).

“Actualmente se han registrado en México (Cuadro 1) alrededor de 4 000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total). Este número coincide con lo informado en varias regiones del mundo por especialistas en la materia, quienes consideran que una de cada siete especies posee alguna propiedad curativa. Sin embargo, se calcula que en México, y en todo el mundo, la validación química farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en 5% de estas especies” (CONABIO, 2002)

Cuadro 1. Estado Actual y Perspectivas de las Plantas Medicinales en México

Especies medicinales identificadas y registradas	4,000
Especies medicinales validadas farmacológica y clínicamente	250
Especies medicinales empleadas por la población mexicana	3,500 a 4,000
Especies medicinales utilizadas regularmente (sin procesar)	1,500
Especies medicinales usadas intensivamente (sin procesar, mezcladas o procesadas)	250
Especies medicinales silvestres que se y colectan	3,600
Especies medicinales que se cultivan en el huerto familiar o en cultivos comerciales	370
Especies medicinales amenazadas	35

*Fuente: CONABIO 2002

Dependiendo de su naturaleza química, las sustancias activas de los vegetales determinan un efecto terapéutico sobre el organismo humano. Al igual que otros productos medicinales contemplados en las farmacopeas, se dividen en grupos, según sea su campo de acción, aunque una misma planta se puede utilizar para más de un tratamiento; de hecho suele ser así en la mayoría de los casos. En muchas ocasiones se asocian con varias plantas diferentes para reforzar la acción terapéutica (Cañigeral y col., 1997).

Atendiendo a esas acciones las plantas medicinales se dividen en las siguientes clases:

Amargas: Son plantas que tienen influencia sobre la función gástrica, pero sobre todo en caso de inapetencia; son por tanto aperitivas. Existen varios tipos de ellas, las cuales se emplean siempre antes de las comidas: amargas puras como la *Genciana*, *Centaurea menor* o *Trébol acuático*; amargas aromáticas como la *Artemisa*, *Angélica* o el *Acoro*; amargas astringentes como la *Corteza de Condurango*, útiles por presentar un ligero efecto astringente eficaces en catarros y gastritis ligeras; amargas mucilaginosas como el *Tusilago* y el *Cáñamo*.

Astringente: Se trata de plantas con alto contenido en taninos, que poseen capacidad para actuar sobre la epidermis o las mucosas. También ejercen un efecto de drenado del tejido y una acción antiinflamatoria. Plantas con este tipo de sustancias son el *Arándano*, *Hipérico*, *Salvia*, *Tormentilla*, *Margarita* (útil en la dermatosis, eccemas e inflamaciones), *Verónica*, *Pulmonaria*, *Cortezas de Roble y de Sauce*, *Bardana*, *Hepática*, *Nogal*, *Orégano*, *Agripalma*, *Hisopo*, entre otras muchas.

Antidiaforética: Son plantas que reducen la transpiración excesiva. Entran en este grupo la *Salvia*, *Valeriana* y *Belladona*, en aplicaciones internas; y *Nogal* o *Corteza de Roble*, en aplicaciones externas.

Carminativas: Las plantas con efectos carminativos ejercen una beneficiosa influencia sobre la evacuación de los gases intestinales, contracciones dolorosas y los calambres que se producen en los músculos lisos del intestino. Además de reducir la tensión dolorosa, frenan el desarrollo de las bacterias responsables de las fermentaciones. A este tipo de plantas pertenecen las drogas que contienen sustancias espasmolíticas como la *Manzanilla*, *Anís*, *Hinojo*, *Enebro*, *Menta piperita*, *Salvia*, *Meliloto*, etcétera

Diaforética o sudorífica: Se trata de plantas que facilitan la transpiración. Entran en este tipo el *Gordolobo*, *Saúco negro*, *Manzanilla*, *Tilo*, *Fumaria*, *Hojas de Grosellero negro*, *Ulmaria*, *Verónica*, *Bardana*, o la *Trinitaria*.

Diuréticas: Son plantas que favorecen o aumentan la cantidad de orina eliminada. Son ligeramente desinfectantes y útiles frente a las afecciones de las vías urinarias, pequeños cálculos y sedimentos en la orina. Entre las plantas diuréticas podemos citar el *Brezol*, *Bolsa de pastor*, *Cardo santo*, *Hoja de Abedul*, *Raíz de Bardana*, *Ortiga*, *Agripalma* o *Capuchina*.

Expectorantes: Se trata de plantas medicinales que facilitan la expectoración. Son sobre todo plantas mucilaginosas (aunque también pueden contener saponinas y aceites esenciales), las cuales se hinchan en presencia de agua permitiendo humedecer la zona de la laringe; su acción reduce la tos y la inflamación.

En el caso de las sustancias con propiedades eméticas (saponinas sobre todo), permiten aumentar las secreciones de los bronquios y glándulas bronquiales, provocando náuseas que en ocasiones son incluso deseables, aunque en dosis elevadas pueden ser vomitivas.

Por otro lado, los aceites esenciales debido a su capacidad de volatilizarse a través del aparato respiratorio, excitan las mucosas y facilitan la disolución de las mucosidades y por tanto la expectoración. Son además algo desinfectantes y relajantes de las contracciones de los músculos lisos bronquiales.

Entre las plantas con propiedades expectorantes, expectorantes eméticas y expectorantes estimulantes, se encuentran el *Gordolobo*, *Malva*, *Malva visco*, *Llantén*, *Gatuña*, *Hinojo*, *Hojas de Menta*, *Tomillo*, *Serpil* y *semilla del Lino*.

Vulnerarias: Las drogas con efectos vulnerarios tienen la capacidad de reducir las inflamaciones a la vez que aceleran la renovación de los tejidos dañados. Por ejemplo, la *Manzanilla*, *Meliloto* y la *Caléndula* cicatrizan las heridas y curan las enfermedades de la piel; el *Brezol* actúa como antiinflamatorio de las vías urinarias; el *Romero* es antirreumático.

En *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* los vegetales se encuentran en la mayoría de las formas farmacéuticas, se administran por todas las vías y para todos los órganos, lo que pone de manifiesto que "la herbolaria tenía un lugar importante como fuente de principios activos para la preparación de remedios y medicamentos" (Sánchez e Islas, 1997).

Las plantas medicinales a través de los siglos

La utilización de las plantas por las sociedades humanas tiene una extensa e interesante historia; desde sus inicios los vegetales fueron clasificados y agrupados según sus diversas necesidades (Domínguez, 1979; Estrada, 1992; Gallardo, 1994; Lozoya, 1994).

El registro histórico más remoto pertenece a la cultura egipcia, de ello dan cuenta antiguos papiros que datan del año 2725 a.c. en los cuales se revela la curación de cuarenta y ocho casos clínicos con plantas medicinales. En la antigua Grecia el uso de las plantas fue ampliamente difundido por los griegos entre los cuales Hipócrates y Galeno son los más reconocidos y considerados por la historia como los padres de la medicina occidental. La herbolaria tiempo después, pasa del pueblo griego al romano, y de estos últimos a los reinos que surgieron tiempo después como el de Hispania (España).

A principios del siglo VIII, la medicina en la España se ve altamente influenciada por médicos del Asia Menor (debido a la invasión musulmana de la que son sujetos) quienes retoman los conocimientos de Hipócrates y Galeno, adhiriendo a ellos los conocimientos propios del pueblo árabe y lo difunden al mundo contemporáneo de su época (Lozoya, 1990; Aguilar y Camacho, 1994).

Por su parte en la América Precolombina existía una historia herbolaria de por lo menos 3,500 años y que según diferentes autores a la fecha podría tener entre 4,000 y 5,000 años de antigüedad, sin embargo es muy probable que los primeros hombres de América seguramente venían de Asia y traían consigo una cultura herbolaria y esto se entiende si se compara la cosmovisión de sus pueblos que son muy similares (Villalba, 2000).

Después de la expulsión musulmana de España y de la unificación de los reinos de esta última (1474 -1516), se llevan a cabo viajes en busca de nuevas rutas marítimas con el fin de mejorar el intercambio comercial con Asia, la historia como se sabe marca el sorpresivo descubrimiento de un nuevo continente que más tarde sería llamado América . Es en este momento en el cual la historia mundial da un vuelco impresionante centrando su atención en la conquista del nuevo territorio, dando como resultado el mestizaje y con ello el sincretismo de culturas que por supuesto incluye su conocimiento médico donde la herbolaria indígena juega un papel fundamental en la cronología de esta historia.

A principios del siglo XVII una vez consumada la caída de Tenochtitlán, los frailes evangelizadores acompañados de indígenas traductores levantaron un importante censo de las plantas y sus propiedades curativas, situación que se documenta en el libro “ *Libellus Medicinalibus Indorum Herbis* ” mejor conocido como “*Códice Badiano*” escrito y traducido al latín por un médico indígena, sin embargo esa es sólo una muestra del conocimiento terapéutico de las plantas que tenían nuestros antepasados, ya que mayas, nahuas, mixtecos y zapotecos, por mencionar a los principales grupos de aquella época, tenían amplios conocimientos en estos tópicos (Lozoya,1999).

Producto de la mezcla de culturas, inicia el surgimiento de una nueva raza, la mestiza, desafortunadamente esto conlleva entre otras cosas a una desvirtuación del conocimiento herbolario que se tenía antes de la conquista. Afortunadamente no desaparece. De esta forma el conocimiento terapéutico de las plantas tomó dos destinos: el primero pasa a formar parte de la teoría de los principios activos que con el tiempo y una compleja historia forma parte de la medicina alópata y la otra paso a formar parte de la cultura común y es conocida como herbolaria tradicional.

Una vez que el mestizaje dio identidad nacional a todo lo largo y ancho de México, la tradición herbolaria paso a formar parte del conocimiento popular y este se albergó en los campesinos e indígenas que conocían las plantas silvestres y sus propiedades terapéuticas.

Amplios y arraigados son los conocimientos tradicionales con los que cuentan muchas comunidades de nuestro país, conocimiento que ha sido adquirido y transmitido de generación en generación en sitios donde aun hoy día se carece de centros de atención médica y donde dicho conocimiento y la conservación de sus recursos naturales siguen siendo utilizados como la primera, y en muchas ocasiones, como la única opción, para atender sus padecimientos.

La herbolaria forma parte del México que se niega a ser globalizado y emerge como un elemento operativo y viviente de nuestro patrimonio cultural, enlazando tiempos y espacios.

La medicina moderna y el resurgimiento de las plantas medicinales en México

La química de síntesis durante el pasado siglo, dio origen a una nueva alternativa para encontrar cura a un sinfín de padecimientos y por ello su uso se extendió a nivel mundial. De 1930 a 1970 se produjo una drástica disminución en el uso de sustancias naturales con propiedades medicinales. Esto fue provocado por la producción, a gran escala, de productos sintéticos con características similares o aparentemente de mayor eficacia curativa. Sin embargo, al presentarse un resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas (malaria, parasitosis diversas, tuberculosis, etcétera), así como la creciente incidencia de cáncer y la aparición del mortal sida, se ha considerado necesario y urgente intensificar la búsqueda de nuevas sustancias particularmente en las plantas de las que se tienen pruebas de sus virtudes medicinales (CONABIO, 2002).

No obstante, a finales de la década de los sesentas el mundo de la medicina se percató de las reacciones adversas que generaban algunos de sus productos, además de verse en la imposibilidad de sintetizar todos los que se requerían. Por ejemplo, hasta 1970 sólo el 20 por ciento de las medicinas se obtenían por síntesis y el resto aún utilizaba productos provenientes de las plantas medicinales (Martínez, 2000).

Bajo este contexto, México siguió los pasos modernizadores de la medicina y se unió a la corriente dominante que buscaba desarrollar solo medicamentos de síntesis. Sin embargo, la investigación en productos vegetales continuó en otros países, sobre todo, de Europa y Asia, pese a que en México la investigación médica formal de estos recursos se había iniciado durante la época del porfiriato, en las dos últimas décadas del siglo XIX. Así, como parte de la reforma educativa promovida por el gobierno, se había fundado la Sociedad Mexicana de Historia Natural. En esta institución se realizaron trabajos sobre la flora mexicana que consistió en la recolección y clasificación de algunas plantas medicinales, dando como resultado una compilación sobre las propiedades farmacológicas de las plantas mexicanas más importantes, desafortunadamente este conocimiento sólo se convirtió en un cúmulo de archivos olvidados.

No es sino hasta finales de la década de los años 70', cuando las plantas medicinales vuelven a adquirir importancia en el país, luego de que el gobierno federal a través del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), reforzó la atención de cerca de 10 millones de campesinos que carecían de los mecanismos de cotización característicos de la seguridad social. El

programa se denominó IMSS-COPLAMAR (actualmente se llama IMSS-Oportunidades) y se diseñó para proporcionar entre otras cuestiones, servicios médicos básicos a las poblaciones indígenas mas apartadas de los centros urbanos y muy dispersas en el territorio nacional, desde entonces se ha tenido acercamiento a una práctica milenaria de atención a la salud, la medicina tradicional.

El IMSS fue la primera institución del Sector Salud en incorporar un cuerpo de investigadores para atender el estudio de la medicina tradicional mexicana y especialmente la flora mexicana desde un punto de vista científico. Desde 1981 incorporó en sus espacios y presupuesto al Centro de Investigación en Medicina Tradicional y Herbolaria, actualmente, Centro de Investigación y Desarrollo de Fitomedicamentos que se ubica en Xochitepec, Morelos (Almaguer y col., 2003).

Actualmente en México el uso de plantas medicinales constituye una expresión de la diversidad étnica y cultural de nuestro país. La práctica herbolaria constituye a su vez un referente biológico, al expresar en su materia vegetal la diversidad botánica y ecológica de nuestro país. La riqueza de recursos con que trabajan nuestros curadores populares refleja la variedad de regiones fisiográficas existentes en México. Así, existen cerca de 30 000 diferentes especies de plantas con flor, de las cuales se ha calculado que no menos de una quinta parte cuenta con propiedades medicinales significativas (Bye y Linares, 1999).

Perspectivas

La evolución del desarrollo selectivo de medicamentos, luego de haberse caracterizado por partir de mecanismos meramente empíricos, implica actualmente un proceso experimental de validación. El proceso de extracción del principio activo en biomedicina se hace patente con propuestas de revaloración de las plantas medicinales planteadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual reconoció la importancia de este tipo de recursos terapéuticos y generó un programa de promoción de la medicina herbolaria.

En 1977, la OMS promovió una serie de recomendaciones para la regularización de los medicamentos herbolarios, estas propuestas reconocen la realidad del uso de las plantas medicinales en un sector muy amplio de la población mundial. Dentro de ésta serie de recomendaciones se halla un apartado concerniente a los programas de investigaciones multidisciplinarias en el que se establece entre otros puntos; la realización de diversas actividades en materia de investigaciones de las plantas medicinales tales como la identificación y clasificación de las plantas, la fitoquímica, la farmacología, y los ensayos de laboratorio clínicos con fines terapéuticos; así como la validación de los procedimientos terapéuticos tradicionales (OMS, 1979).

Hace ya casi tres décadas que la OMS ha venido planteando la revaloración de la medicina tradicional y de sus recursos; sin embargo esta revaloración ha delimitado poblacional e ideológicamente a esa medicina, sin alterar de manera sustancial el cauce de la farmacoterapia dominante en sí.

La contraposición ideal de “lo empírico” con “lo científico” en la biomedicina se expresa de manera sintética en el uso terapéutico de los vegetales; lo primero como “remedio” y lo segundo como “medicamento”; lo empírico, en la utilización integral de las plantas medicinales como extractos totales, y lo científico en la búsqueda, identificación y aplicación de los principios activos a partir de ellas (Ibíd. Pág. 11)

CAPÍTULO II

DEL EXTRACTO VEGETAL
AL PRINCIPIO ACTIVO

El Principio activo

El valor medicinal de una planta curativa se debe a la presencia en el tejido de la planta de una o algunas sustancias químicas (**principio activo**) que ejercen una acción farmacológica en el ser humano o los seres vivos en general. Los **principios activos** de las plantas medicinales son sustancias que la planta ha sintetizado y almacenado en el curso de su crecimiento. Este tipo de sustancias no se distribuyen de una manera uniforme por toda la planta, pues se concentran preferentemente en las flores, hojas, o raíces, aunque en algunas ocasiones también se pueden encontrar contenidos en semillas, frutos y corteza.

Sin embargo no todos los productos metabólicos de las plantas tienen propiedades con valor medicinal. En todas las especies están presentes al mismo tiempo principios activos y sustancias indiferentes. Muchos de los principios activos son sumamente complejos y de algunos aún se desconocen su naturaleza química (Pahlow, 1984; Rombi, 1991).

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

Los aceites esenciales tienen varios componentes tales como: terpenos o compuestos aromáticos, a menudo contienen alcoholes, cetonas, aldehídos, fenoles, ésteres, éteres, nitrógeno y azufre, así como otros compuestos. Muchos son altamente germicidas, esto debido a la volatilidad y capacidad de penetrar en el protoplasma, sin embargo algunos son insolubles en agua, como para ser importantes en medicina como antisépticos.

Las gomas son polímeros de varios azúcares, mientras que las resinas son productos generados a partir de la oxidación de los aceites esenciales; ambos se utilizan como purgantes y ungüentos. Los aceites grasos se emplean en emulsiones y como purgantes (William, Thompson, 1980).

En estudios preliminares se pueden utilizar muestras de 1 a 1000 g, y orientarse a localizar cualitativa o cuantitativamente uno o varios principios activos. Los métodos pueden ser:

- a). Histológicos, o sea, de observación del comportamiento de cortes de tejidos frente a ciertos reactivos que formen colores o den precipitados.
- b). Químicos, tratamiento de extractos con agentes cromógenos, sustancias que forman precipitados, etcétera
- c). Físicoquímicos, uso de cromatografía, localización de ciertas bandas de absorción en el infrarrojo.
- d). Biológico, evaluación del efecto de extractos sobre cultivos de microorganismos, órganos aislados, tejidos, entre otros (Domínguez, 1979). Esta se puede realizar de varias formas y a varios niveles, dependiendo del objetivo de estudio. Se puede realizar a través de un tamizado (*screening*) farmacológico, en sistemas *in vivo*, en animales íntegros normales o en aquellos a los que se les ha incluido experimentalmente un padecimiento determinado o bien en sistemas *in vitro* (Estrada, 1992).

Métodos de extracción de los principios activos en las plantas

Los protocolos de investigación establecidos por la OMS, incluyen el fraccionamiento de productos activos vegetales mediante el cual se obtienen extractos de polaridades distintas conteniendo sustancias que exhiben propiedades de solubilidad diferente a las que exhibirán de manejarse en forma pura. Por lo tanto, se debe abordar también el problema de la preparación adecuada de suspensiones para cada extracto obtenidos con disolventes comunes (agua, etanol, metanol, benceno, cloroformo, etcétera). Una regla general, útil para resolver el problema de preparar suspensiones o dispersiones acuosas de los extractos obtenidos con distintos disolventes, es que los extractos polares presentan menos problema que los disolventes no polares.

Para obtener las **sustancias activas** de las plantas medicinales, se recurre frecuentemente a la técnica de la extracción. Este proceso consiste en incorporar las sustancias activas de una planta a un líquido, de acuerdo a los lineamientos de la OMS, todos los extractos primarios que sean sometidos a evaluación biológica deben ser preparados con agua, o bien con mezclas de esta con etanol, ya que son estos los disolventes más frecuentes y disponibles.

En los extractos hidroalcohólicos, el alcohol se debe eliminar del percolado mediante concentración *in vacuo*, manteniendo la temperatura del baño por debajo de los 60° C. Conforme se evapora el alcohol, se puede precipitar algo de material insoluble, dado que no es posible predecir si el material insoluble es o no activo, se deberá utilizar el concentrado completo (Estrada 1992). Al someter un extracto a prueba biológica, este deberá presentar de preferencia en forma sólida, ya que permite la estandarización de las dosis.

De igual manera también existen otras técnicas de extracción, dependiendo de la textura o componentes de las plantas. A continuación se describen brevemente algunas técnicas de uso frecuente.

Tisanas: Las tisanas se obtienen tratando las partes vegetales de interés medicinal preferentemente con agua como vehículo extractivo (en ocasiones también se recurre a alcoholes y aceites). Las plantas que se destinan a la preparación de tisanas, se deben acondicionar previamente con los utensilios adecuados, ejemplo con tamices o mallas; para picar, moler o pulverizar al tamaño adecuado para el uso que se le vaya a dar. El polvo formado durante la operación de fraccionar las plantas no se debe aprovechar. Las dosis suelen estar prescritas en la farmacopea; para ello se deben pesar los

ingredientes por separado, empezando por las drogas más abundantes que no contengan frutos y semillas, y mezclándolas al final. Se debe tamizar adecuadamente y volver a mezclar, despreciando el polvo resultante.

Según como se aplique el agua, las tisanas se pueden obtener de varias formas, las más comunes son la infusión, maceración y decocción.

Infusión: Es una de las formas más populares y clásicas de extracción para obtener una tisana. Es muy adecuada para las drogas aromáticas, ya que los aceites esenciales que contienen se evaporan a temperaturas mayores que las precisas para preparar la infusión.

La infusión se realiza sumergiendo las partes troceadas de la planta en una cantidad de agua hirviendo (dependiendo de la planta pueden ser partes enteras, como las semillas del lino); se deja reposar unos 15 minutos removiendo de vez en cuando y se filtra a continuación mediante un tamiz o papel de filtro. Las dosis generales (excepto para drogas tóxicas que deberán determinarlas un médico) son aproximadamente de un gramo de planta por cada 10 ml de agua.

Maceración: Es una extracción que se realiza a una temperatura ambiente de entre 15° y 20°. El líquido para la solución puede ser agua o alcohol, pero en ocasiones también se emplean vinos blancos o tintos. Normalmente, la maceración en alcohol o vino se puede alargar sin temor a interferencias bacteriológicas, no así en agua, que puede fermentar o formar moho; de todas formas los tiempos concretos de maceración vienen también determinados por el tipo de droga a extraer. En líneas generales las drogas que contengan mucílagos, como el *Malvanisco* o el *Lino*, se macerarán durante una media hora aproximadamente; por su parte, las amargas y aromáticas entre las dos y doce horas. Las dosis a macerar, siempre en términos generales, será a razón de una parte de planta por veinte de líquido.

Decocción: se trata de una extracción en agua de determinadas partes vegetales, a la cual se le da un cierto tiempo de ebullición. Dependiendo de la consistencia de las partes a extraer, se darán tiempos de decocción más o menos largos; generalmente, las raíces, hojas, flores y pedúnculos foliados se hierven en agua durante unos 15 minutos, mientras que las ramas y otras partes más duras pueden precisar hasta una hora, tiempo durante el cual deberá ir reponiéndose el agua evaporada. Una vez hecha la decocción hay que filtrar el líquido mediante un paño, exprimiendo bien el líquido de las partes cocidas.

Digestión: este procedimiento es adecuado con aquellas partes vegetales más duras, o que contienen sustancias poco solubles. Para ello se introducen las partes a extraer en un recipiente con el líquido previamente calentado a las temperaturas indicadas; se mantiene durante un periodo que puede oscilar entre media hora y 24 horas, agitando el envase regularmente.

Extractos: los extractos son sustancias, más bien concentradas, obtenidas mediante maceración en determinados líquidos, como agua, alcohol, éter, o mezcla de éstos.

Aguas aromáticas: son aguas medicinales con alto contenido en aceites esenciales, a las cuales se les añaden líquidos alcohólicos; se utilizan a partir de los 30 días de su preparación.

Método Galénico: Consiste en la extracción de los principios activos de plantas frescas a través de la obtención de la tintura vegetal mediante la maceración con alcohol durante un determinado tiempo (dependiendo de la parte vegetal a tratar, por ejemplo: flores, tallos, corteza, etcétera). Una vez hecho lo anterior, se procede a obtener el principio activo mediante un proceso de destilación.

Métodos de identificación 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 (Harborne, 1984), de las cuales las más comunes son:

Cromatografía en papel (PC): se aplica a constituyentes solubles en agua como carbohidratos, aminoácidos, ácidos nucleicos, ácidos y bases orgánicas y compuestos fenólicos.

Cromatografía en capa fina (TLC): es aplicable para separar los componentes lipídicos, esteroides, carotenos, terpenos, y quinonas simples.

Cromatografía gas-líquido (GLC): aplicable principalmente a compuestos volátiles como ácidos grasos, hidrocarburos, monoterpenos, sesquiterpenos y azufrados.

Cromatografía de líquidos altamente presurizada (HPLC): análoga a la cromatografía de gases en su sensibilidad y habilidad de proveer datos cualitativos en una sola operación. Pero difiere en que la fase estacionaria está unida a un polímero poroso y la fase móvil es forzada a una presión alta, su ventaja es que su operación se realiza a temperatura ambiente por lo que los compuestos no están sujetos a una posible descomposición térmica en su manejo.

Además, el uso de técnicas cromatográficas con distintos adsorbentes, la inclusión de otras técnicas como la diálisis y la electroforesis han permitido aislar principios activos muy polares como glicanos y glicoproteínas de los extractos acuosos de varias plantas (Estrada 1992). Para la identificación y caracterización de los compuestos se utilizan fundamentalmente la espectrometría de masas, la espectrometría infrarroja, ultravioleta y de resonancia magnética nuclear, que en conjunto dan información de las características estructurales de un compuesto (Selemink, 1980, Creswell y col., 1979) y para sólidos cristalinos, la difracción de Rayos X.

Espectroscopia Infrarroja

La espectroscopia infrarroja 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 centra en el espectro cualitativo dentro de la química orgánica, 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 (Levine, 1986; Morcillo, 1972; Manfred, 1997; Pretch, 1998). Para tal efecto se utiliza un espectrómetro de IR, registrándose a partir de una solución clorofórmica en tetracloruro de carbono o la muestra preparada en nujol 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.

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

Efecto antimicrobiano de los principios activos (antibióticos)

El concepto de antibiótico se emplea para definir sustancias que presentan actividad antimicrobiana, extraídas de estructuras orgánicas vivientes o sintetizadas de manera artificial.

Los principios activos de las plantas son los precursores básicos de una gran cantidad de antibióticos presentes en la actualidad (Fernández y Nieto, 1982, Cowan, 1999). Una vez que el principio activo ha sido aislado y ha sido probada su eficacia en cualquiera de los ensayos previamente mencionados, el paso siguiente consiste en identificar la(s) molécula(s) causantes de tal efecto y sintetizarla de manera artificial.

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 (Bergoglio, 1993).

En líneas generales y en función sobre su forma de actuar sobre los microorganismos, se habla de dos grandes grupos de antibióticos.

Antibióticos primariamente bactericidas: Estos ejercen una acción letal 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.

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, por ejemplo, la anfotericina, un fármaco antifúngico, altera la estructura química de la membrana celular de algunos hongos, permitiendo la entrada de algunas toxinas e impidiendo la entrada de ciertos nutrientes vitales para el hongo. Otros actúan inhibiendo la síntesis de moléculas bacterianas intracelulares como el ADN (Ácido Desoxirribonucleico), el ARN (Ácido Ribonucleico), los ribosomas o las proteínas.

Antibióticos primariamente bacteriostáticos: Inhiben el crecimiento pero no matan al microorganismo, permitiendo que las propias defensas del huésped puedan eliminar a las bacterias (Bergoglio, 1993)

El antibiograma

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 y algunos virus han desarrollado resistencia a los agentes antivirales 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.

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 a estas drogas, 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 proporciona mayores posibilidades de una evolución favorable.

Una vez efectuada 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* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico (Reyes y col., 1998, Crespo, 2002). El antibiograma sirve, en primer lugar, para orientar las decisiones terapéuticas individuales.

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, revisarse regularmente los espectros clínicos de los antibióticos y adoptarse ciertas decisiones sanitarias, como el establecimiento de programas de prevención en los hospitales (Cacho,1997).

Se han descrito tres pruebas de gran valor para la determinación rutinaria de los antibióticos; la de diluciones seriadas en un medio líquido, la de diluciones seriadas en un medio sólido y la de difusión en 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 discos de papel (sensidiscos) embebidos en concentraciones de soluciones de antibióticos y que subsecuentemente se han dejado secar.

Cuando se siembra una placa con un cultivo en particular de bacterias u hongos y 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 observa desarrollo hasta llegar al disco y en algunos casos, por debajo de éste. Este es acaso, el método más común para probar el efecto antimicrobiano de los extractos de plantas medicinales (Estrada, 1992).

Algunos de los microorganismos que se utilizan con mayor frecuencia son: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureaginosa*, *Mycobacterium smegmatis* y *Candida albicans*, (Guerrero y col., 1988, González y col., 1988, Estrada, 1992).

Antecedentes de la acción antimicrobiana de las plantas medicinales

- **Martínez y col. (1996)**, evaluaron la actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 40 % de *Psidium guajava* L., utilizando una batería mínima de cepas de microorganismo que incluyeron *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* como Gram-positivo, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* como Gram-negativo y la levadura *Candida albicans* mediante el método de difusión en agar. Los resultados obtenidos indicaron una respuesta antibacteriana baja y un ausente efecto antifúngico.
- **Martínez y col. (1999)**, estudian la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones de un extracto fluido (etanol al 80 %) de hojas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal), utilizando una batería mínima de cepas de microorganismos que incluyeron *Staphylococcus aureus*, como Gram-positivas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, como Gram-negativa y la levadura *Candida albicans*, mediante el método de difusión en agar. Los resultados obtenidos indicaron que aún a la menor concentración del 1 % se aprecia inhibición del crecimiento de todos los microorganismos y la respuesta se incrementa gradualmente con la concentración hasta el 80 %.
- **Rivero y col. (1997)**, demuestran la actividad antifúngica *in vitro* frente a hongos filamentosos de los extractos acuoso y alcohólico de hojas de pino macho (*Pinus caribaea*), se realiza un estudio por el método de difusión en agar y se enfrentan éstos a diferentes especies de hongos como *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Trichophyton rubrum*, llegando a la conclusión de que el extracto acuoso y los extractos fluidos alcohólicos al 25 y 50 % no presentaron actividad antifúngica frente a estas especies de hongos y que los extractos fluidos alcohólicos al 75 y 100 % presentaron actividad antifúngica estadísticamente similar a la nistatina frente al *M. canis* y *T. rubrum*.
- **Nieva y col. (2000)**, realizan una serie de análisis de sensibilidad (antibiogramas) con extractos etanólicos de propóleos de diferentes regiones fitogeográficas de la República Argentina, aplicando el método de Kirby -Bauer a cultivos de las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Todos los propóleos estudiados mostraron actividad antibacteriana sobre las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* y *Enterococcus faecalis*.

- **Hernández y Rodríguez** (2000), evalúan la actividad antimicrobiana de 3 especies vegetales que crecen en Cuba (*Ocimum basilicum* L., *Ocimum tenuiflorum* L. y *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.), aislando extractos fluidos mediante el método de diluciones seriadas dobles en medio líquido. Los resultados obtenidos con el extracto de *O. Basilicum* L pusieron de manifiesto que de las especies microbianas estudiadas las más sensibles resultaron ser las bacterias Gram-positivas. También resultaron sensibles la levadura *Candida albicans*, el dermatofito *T. mentagrophytes* y de los Gram-negativas solo *Ps. aeruginosa* y *P. vulgaris*.

Respecto *O. tenuiflorum* L. las bacterias Gram-positivas fueron las más sensibles, siendo el *B. subtilis* el germen más inhibido. Finalmente con el extracto de *C. citratus* (DC) Stapf también *B. subtilis* mostró mayor sensibilidad, seguido en orden decreciente por el hongo dermatofito *T. mentagrophytes*. Con relación a las bacterias Gram-negativas solo *P. vulgaris* resultó inhibido por dicho extracto.

- **Rojas y col.**, evaluaron en el año 2003, la presencia de actividad antibacteriana de un extracto acuoso al 20 % de las hojas de *Boldoa purpurascens* frente a cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se empleó el método de difusión radial en medio agarizado con cortes cilíndricos. Si bien, no se detectó actividad inhibitoria sobre ninguno de los 22 cultivos bacterianos probados se llegó a la conclusión de que el efecto beneficioso obtenido en las enfermedades renales se debe a la propiedad diurética de los extractos y no a una acción directa sobre los microorganismos.
- **Guerra y col.**, en el año 2003 evalúan la actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes formulaciones elaboradas a partir de *Senna alata* (Caesalpinaceae), empleando el método galénico y el método de diluciones en medio líquido. Demostrando el potencial antimicrobiano de *S. alata*, frente a los dermatofitos *M. canis* y *T. mentagrophytes* y la levadura *C. albicans*.

CAPÍTULO III
CARACTERÍSTICAS DE LAS
PLANTAS

Características de las plantas a estudiar

Eryngium carlinae Delar

Nombres Comunes

Hierba del sapo

Kokixukurhi (purépecha)

Motita de sapo

Tiamo Kuatr (purépecha)

Clasificación Científica (USDA, 2006)

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Apiales
Familia: Apiaceae
Género: *Eryngium*
Especie: *Eryngium carlinae*

Descripción Botánica

Planta perenne, glabra, por lo general baja, a veces caulescente y entonces decumbente a erecta, de 5-50 cm. de alto; raíz pivotante, en ocasiones dividida o en fascículos; tallos uno o varios, sencillos o con ramificaciones divaricadas; hojas basales en roseta densa, sobre pecíolos alados, envainadores en la base, hasta de 2 cm. de largo, mucho más cortos que la lámina, que es oblanceolada, de 3-10 cm. de largo por 0.5-2 cm. de ancho, ápice obtuso, borde setoso o espinuloso-aserrado a pinnatifido, caloso, base atenuada, enervación pinadamente reticulada, hojas caulinas semejantes a las basales, las superiores opuestas, sésiles, a veces profundamente partidas, inflorescencia cimosa, en ocasiones repetidamente ramificada, cabezuelas pedunculadas, de color azul, violetas o blancas, ovoides, de 6-10 mm de largo por 5-7 mm de diámetro, brácteas 8 a 12, extendidas, ovadas a oblanceoladas o linear-lanceoladas, de 8-18 mm de largo por 2-7 mm de ancho, agudas, enteras o espinoso-aserradas cerca del ápice, con la cara abaxial verde y la adaxial blanquecina o amarillenta, de largo igual o mayor que las cabezuelas, bractéolas subuladas, de 2-4 mm de largo, curvadas, más largas que el fruto, como de 1 a 3 bractéolas, por lo general enteras o casi

enteras, a veces ausentes; sépalos ovados, de 1-2 mm de largo, pétalos espatulados, de alrededor de 1 mm de largo; estilos un poco más cortos o poco más largos que los sépalos; fruto ovoide o subgloboso de 1-2 mm de largo, densamente papiloso, con las papilas iguales o subyúgales (Imagen 1)

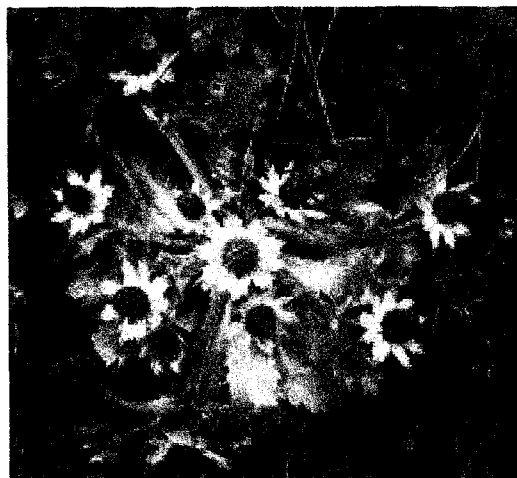


Imagen 1. *Eryngium carlinae*

Composición Química

Materia grasa, aceite esencial, resina ácida, resina neutra roja, principio amargo, glucosa, mucílago, potasa, sosa, cal, hierro y magnesia; ácido sulfúrico, clorhídrico, fosfórico y carbónico (Martínez, 1992)

Uso Medicinal

La parte aérea de la planta se usa en padecimientos del riñón. Además, el té se usa contra la congestión del pecho y en padecimientos gastrointestinales. La parte aérea es usada en lavados vaginales y punzadas en el oído. Se usa también para inflamaciones causadas por golpes.

La planta completa se usa hervida y tomada como agua de uso en empachos, de esta misma manera se combaten algunas enfermedades venéreas. El cocimiento de la Hierba del Sapo más Tepozán (*Buddleia* spp.) se toma en casos de fiebre y prurito. Se usa para inflamaciones por golpes y en lavados vaginales (SEMARNAT, 2004).

El jugo de la raíz o el cocimiento concentrado de la misma, como diurético, afrodisíaco y para provocar las contracciones de la matriz. También se recomienda contra la gonorrea, para cuyo mal hacen una complicada

mixtura de esta hierba con, raíz de tejacote, hojas de pingüica, barbitas de coco, doradilla, raíz de malva, espiga de llante, golondrina, cabellitos de elote, palo de tres costillas, se toma hervido, en ayunas, en realidad es una mezcla de diuréticos y emolientes (Ibíd. Pág. 29).

Hábitat

Crece de manera arvense, ruderal y en claros donde ha sido derribada la vegetación original. Se llega a presentar en bosques de encino, pino, pino-encino, de Junípero e incluso en bosque mesófilo. Se le encuentra entre los 1700 a 2800 msnm en terrenos algo perturbados (SEMARNAT, 2004).

Distribución

Chihuahua: Reportada para el estado, pero sin registro municipal.

Jalisco: Cuautitlán.

Michoacan: Tzintzuntzan, Zacapú, Zinapécuaro, Zitécuaro, Contepec, Chilchota, Churíntzio, Erongaricuaro, Jiquilpan, Lagunillas, Madero, Anganguero, Morelia, Pátzcuaro, Quiroga, Los Reyes, Salvador Escalante, Talpujahuá.

Características de las plantas a estudiar

Lupinus montanus. H:B:K

Clasificación Científica (USDA, 2006)

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Fabales
Familia: Fabacea
Género: *Lupinus*
Especie: *Lupinus arbustus* var. *montanus*

Descripción Botánica

Planta perenne de 30 a 100 cm, tallo hueco de 4 a 15 mm de diámetro, puberulento con pelos finos, aplicados; estipulas de 3 a 10 cm de largo, anchamente membranosas, pecíolos de 6 a 20 cm de largo, folíolos 10 a 14, linear-elípticos a oblanceolados, agudos, mucronados, los mayores de 5.5 a 14 cm de largo, de 6 a 30 mm de ancho, en el haz esparcida y extendidamente estrigosos esparcidamente noduloso-canescentes a pilosos en el envés; racimo de 8 a 30 cm de largo con las flores verticiladas o esparcidas, brácteas de la parte inferior de 16 a 30 mm de largo, las superiores reducidas; labio inferior del cáliz delgado, arqueado de 8 a 9 mm de largo, lanceolado, canescente por fuera, finamente seríceo por dentro cerca del ápice, labio superior ovado, bidentado, de 7 mm de largo, bractéolas de 1.5 a 3 mm de largo; estandarte glabro, suborbicular, de 11.5 a 14 mm de largo, de 11 a 12 mm de ancho, más ancho por encima de la parte media, aplicado a lo largo de 8 mm, reflejo en 6.5 mm, a las de 12.8 a 15 mm de largo, quilla con papilas diminutas por encima de las uñas en la mitad inferior del margen del arco, el ángulo de 95 a 100° : óvulos de 6 a 8: legumbres de 4 a 5 cm de largo de 9 a 10 mm de ancho, encorvándose hacia arriba y hacia fuera, finalmente canescentes a pilosas. Plantas Herbáceas con hojas compuestas palmeadas. Inflorescencias densas con flores de color morado (Imagen 2).

Composición Química

La lupanina, lupinina, saponinas, taninos, flavonoides, terpenoides, glucósidos, gomas, ceras, resinas, mucílagos y algunos alcaloides, los cuales producen una importante hepatotoxicidad.



Imagen 2. *Lapinus montanus*

Uso Medicinal

No reportado

Otros Usos

Se utiliza como fertilizante natural, debido a su alto contenido de nitrógeno. En algunos sitios es utilizado para crear cercas vivas.

Hábitat

Crece asociado con bosque de pino y pastos alpinos como: *Mulembergia spp.*, en alturas que van desde los 2900 hasta 3980 msnm (Sánchez y López, 2003).

Distribución

Se encuentra presente en otros estados como Hidalgo, Veracruz, en el Parque Nacional el Chico, Parque Nacional Cofre de Perote entre 3500 y 4000 m de altitud, Parque Nacional de Orizaba respectivamente; Así como en las partes altas del Nevado de Colima, principalmente en bosques de coníferas entre los 3000 y 4000 msnm (Oropeza y col., 2000)

CAPÍTULO IV

CARACTERÍSTICAS DE LOS
MICROORGANISMOS

Bacterias

Corynebacterium xerosis: bacilo no esporulante, Gram-positivo. Habita en las membranas mucosas de la piel tanto en hombres como en animales a manera de parásitos, en el tracto respiratorio alto, en el gastrointestinal (flora orofaríngea) y urogenital en los seres humanos. Se considera como un patógeno que provoca infecciones oportunistas (Koneman, 1997).

Enterococcus faecalis: compuesto por cocos Gram-positivo dispuestos típicamente en parejas y cadenas cortas. Se encuentran principalmente en el tracto respiratorio alto y el intestino delgado, pero se encuentra en mayor cantidad en el intestino grueso. Es causante de infecciones en el tracto urinario. Son capaces de causar endocarditis bacteriana (Koneman, 1997).

Escherichia coli: bacilo Gram-negativo que pertenece a la familia de las Enterobacteriáceas. Esta bacteria se encuentra en el tracto intestinal de los mamíferos. La especie comprende varios grupos que se establecen según su actividad. Las especies de ***Escherichia coli*** oportunistas producen infecciones sólo si abandonan el colon. Otros grupos producen hasta el 90% de las diarreas infantiles y la denominada diarrea del viajero. Esta última no es grave, pero la gastroenteritis aguda de los niños puede provocar la inflamación de la mucosa intestinal, dando lugar a deshidratación grave y heces purulentas. ***Escherichia coli*** es un organismo adecuado para la investigación por su crecimiento rápido y porque su cultivo es sencillo (Koneman, 1997; Murray y col., 1997).

Mycobacterium phlei: células compuestas por bacilos rectos o curvos que se ramifican o forman de filamentos, Gram-positivo. Se encuentra en el ambiente, en animales de sangre fría y en los de sangre caliente. En el género *Mycobacterium* encontramos a los causantes de la tuberculosis (*M. tuberculosis*) y la lepra (*M. leprae*) (Murray y col., 1997).

Streptococcus mutans: Gram-positivo unicelular se encuentra presente dentro de la cavidad oral, en el tracto urinario, en el intestino, fiebre reumática, glomerulonefritis, endocarditis bacteriana, faringitis, participa en la formación y la patogenia de la caries dental. Se considera como el principal agente cariogénico y formador de la placa dental (Burneo y col., 1986; Mouton, 1995).

Streptococcus β -hemolítico: causante enfermedades como la amigdalitis aguda bacteriana, la fiebre escarlatina y la fiebre reumática. Pertenece a los grampositivos es responsable de la mayoría de las infecciones humanas; como la erisipela, fiebre puerperal e infecciones generalizadas, endocarditis bacteriana y faringitis (Ross, 1985; Murray y col., 1997).

Staphylococcus aureus: Gram-positivo unicelular que causa enfermedad mediante la producción de toxinas o invasión directa y destrucción del tejido. La bacteria *Staphylococcus aureus* es un patógeno común en el ser humano que se localiza principalmente en las mucosas y la piel. Puede originar abscesos y forúnculos en la piel además de provocar osteomielitis, endocarditis y otro gran número de infecciones (Koneman, 1997; Murray y col., 1997).

Hongos

Candida sp.: se trata de un grupo de hongos primitivos, miembros de la familia *Cryptococcaceae*, muy esparcidos por la naturaleza. Las infecciones por *Candida* consisten en micosis, son organismos patógenos oportunistas capaces de causar infecciones profundas. Entre las especies de *Candida* encontradas en la cavidad bucal se tienen las siguientes; *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea* y *Candida tropicalis* (Larone, 1995; Koneman, 1997; Ramírez, y col., 2003)

Candida albicans: se considera como miembro de la flora normal de las mucosas de la boca, la faringe, las fosas nasales, y la vagina. Se considera como un hongo oportunista pues da origen a la candidiasis o moniliasis (cutánea y paroniquia), en individuos débiles y diabéticos, infecciones crónicas o agudas, pueden afectar cualquier parte del cuerpo, aunque generalmente ataca meninges, piel (intertrigo, paroniquia y onicomicosis) pericardio y pulmones (González y Cameros, 1996). Esta especie es la más cultivada con mayor frecuencia para estudios en los laboratorios (Larone, 1995; Koneman, 1997; Ramírez y col., 2003).

Candida krusei: se considera como un hongo oportunista, pues da origen a la candidiasis o moniliasis (cutánea y peroniquia) en individuos débiles y diabéticos. Ocasionalmente produce infecciones como la endocarditis o diarreas infantiles, afectando la piel (Koneman, 1997; Ramírez, y col., 2003).

Candida tropicalis: presenta menos blastoconidios que *C. albicans*, por lo general nacidos individualmente o en pequeños cúmulos y más espaciados que los de *C. albicans*. Provoca infecciones en el hombre y en animales tales como; mucocutáneas: boqueras, muguet, perianal, la endocarditis o diarreas infantiles (Larone, 1995; Koneman, 1997; Sutton, 1998; Ramírez y col., 2003).

Cryptococcus neoformans: se trata de una levadura que se encuentra generalmente en el suelo y se reproduce en excretas de aves como las palomas. El contacto con este tipo de hongo puede provocar una enfermedad conocida como meningitis criptocócica muy a menudo afecta a personas inmunosuprimidas y entre los factores de riesgo se encuentran: SIDA, linfoma y diabetes. Su incidencia es de 5 por cada millón de personas, (Larone, 1995).

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 (Larone, 1995; Koneman, 1997). 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 (Velasco y Tay, 1986; Murray y col., 1997).

Medios de cultivo

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el Medio de Cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el cultivo (Jiménez, 1999).

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe 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 contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

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 Peptona a la que se añadirán otros ingredientes. El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo.

Algunas de las condiciones generales para el cultivo de microorganismos son:

a) Temperatura

Los microorganismos mesófilos crecen de forma óptima a temperaturas entre 15 y 43°C. Otros como los psicrófilos crecen a 0°C y los termófilos a 80°C o incluso a temperaturas superiores (hipertemófilos). En líneas generales, los patógenos humanos crecen en rangos de temperatura mucho más cortos, alrededor de 37°C, y los saprofitos tienen rangos más amplios.

b) Esterilidad del medio

Todos los medios de cultivo deben estar perfectamente estériles para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios. El sistema clásico para esterilizar los medios de cultivo es el autoclave (que utiliza vapor de agua a presión como agente esterilizante)

Atendiendo a su utilidad práctica, los medios de cultivo se pueden clasificar en:

Medios para aislamientos primarios: Para usos generales, no selectivos, para cultivo de una amplia variedad de organismos difíciles de hacer crecer. A menudo están enriquecidos con materiales como: sangre, suero, hemoglobina, glutamina, u otros factores accesorios para el crecimiento de las bacterias. Este tipo de medios de cultivo es el más usado en las pruebas de sensibilidad, debido a su riqueza en nutrientes, lo cual permite la pronta proliferación de bacterias y hongos. Dentro de este tipo de medios de cultivos tenemos el Agar de Sabourand (para hongos), y el Muller-Hinton (para bacterias), (Jiménez, 1999).

Selectivos: (pueden ser de moderada o de alta selectividad) se añaden sustancias que inhiban el crecimiento de ciertos grupos de bacterias, permitiendo a la vez el crecimiento de otras. Variando la sustancia añadida se modifica el tipo y grado de selectividad (Mac Conkey, Kanamicina-Vancomicina)

Enriquecidos: Ralentizan/suprimen el crecimiento de la flora competitiva normal potenciando el cultivo y crecimiento deseado (Selenito, medio con Vitamina K).

Para aislamientos especializados: Formulaciones nutritivas especiales que satisfacen requerimientos de grupos específicos de bacterias, ayudando a su identificación (Lowenstein) (Roger y col., 1996)

Diferenciales: formulaciones especiales en las que se estudian las peculiaridades fisiológicas (nutrición y respiración sobre todo) específicas de las bacterias. Seleccionando los medios adecuados se puede llegar a la identificación de casi cualquier bacteria.

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 contenga cada tubo de la escala. El inóculo se ajusta a un patrón de referencia mediante la comparación visual, o por espectrofotometría, haciendo coincidir la absorbancia.

La escala utilizada y aceptada mundialmente, es la de McFarland (Montiel y Guzman, 1997).

Técnica de Barry

Consiste en la siembra inmediata tras el vertido del medio de cultivo en la placa. Para ello, se tiene un medio de cultivo fundido, específico para bacterias (Agar Muller – Hinton) y hongos (Agar de Sabouraud), en el cual se verterá el inóculo microbiológico estandarizado con la escala antes mencionada y se dejará solidificar. Esta técnica es utilizada, por ejemplo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (Koneman, 1988)

CAPÍTULO V
ZONA DE RECOLECTA

Parque Nacional Izta –Popo

El 29 de octubre de 1935 se emitió el decreto que establece al Parque Nacional Iztaccíhuatl -Popocatepetl. El objetivo que perseguía la creación de este parque era el de proteger las cuencas altas hidrográficas relacionadas con los Valles de México, Puebla, Tlaxcala y Morelos; la conservación de los suelos, la vegetación forestal, así como la flora y la fauna de la región mencionada.

Sin embargo, el Parque Nacional Izta-Popo, pasó de 59,913.93 hectáreas a 25,679 hectáreas en 1947, cuando se emitió un segundo decreto, donde se declaraba la constitución de la Unidad Industrial de Explotación Forestal con la finalidad de abastecer las fábricas de papel “San Rafael” y “Loreto y Peña Pobre”, estableciendo que la cota de 3,600 msnm servía como límite inferior del Parque, cabe señalar que los límites del Parque se modificaron con miras a beneficiar la industria papelera del país (CONANP, 2004).

Clima

El Parque tiene una de sus características principales en torno a las diversas condiciones climáticas, debido a su topografía y ubicación. La variedad de clima abarca desde un clima de tipo templado húmedo hasta un clima frío a muy frío.

De acuerdo con su latitud, el Parque se ubica en la región de los vientos alisios en una zona donde predominan las circulaciones de tipo convectivo local, lo cual hace posible una gran estabilidad meteorológica durante la mayor parte del año. Sin embargo, a pesar de que durante el verano el país recibe la influencia de los vientos provenientes del Caribe y del Atlántico, los cuales inciden con vientos húmedos que son altamente favorables; en cambio, durante el invierno, el cinturón de altas presiones y la faja de vientos del Este, son desplazados hacia el Ecuador, con lo que se forman vientos del Oeste sobre las partes altas del país y debido a que son más secos que los vientos alisios, durante esta época la Altiplanicie tiende a tomarse más seca (CONANP, 2004).

Tipo de Vegetación

En el Parque y de acuerdo a su ubicación, los bosques responden principalmente a gradientes altitudinales y de topografía, como es el caso entre cañadas húmedas y secas, lo que hace posible encontrar una gran diversidad de hábitat, como en las partes bajas donde se presenta el bosque de pino, bosque de pino-encino, bosque de oyamel y pastizales amacollados (CONANP, 2004). De acuerdo con la clasificación de Rzedowski los principales tipos de vegetación son:

Bosque de pino: En el Parque Nacional Izta-Popo, Zoquiapan y Anexas crecen varias especies de pinos, se presentan básicamente 2 estratos: uno superior, arbóreo y otro inferior con pastos amacollados, escasos arbustos y hierbas.

En general, de los 2,500 m a los 4,000 m se encuentran bosques perennifolios del género *Pinus*, en la franja más alta predominan el *Pinus hartwegii*, seguido de *Pinus montezumae*, *Pinus pseudostrabus* y *Pinus rudis*, acompañados algunas veces por *Pinus leiophylla* y *Pinus teocote*. A veces se presentan conviviendo con *Quercus*, *Juniperos* o *Alnus*, en suelos Andosol o Litosol.

Bosque de oyamel: Entre los 2,500 m y 3,500 se encuentran bosque de *Abies religiosa* (Oyamel); acompañado en ocasiones por *Pinus ayacahuite*, *Alnus jorullensis*, *Quercus laurina*, *Salix oxylepis*, *Prunus serotina* y *Cupressus lindleyi*.

Bosques mixtos: Entre los 2,500 m y los 3,500 m también se pueden apreciar combinaciones de Bosques Mixtos como los de Pino-Aile y Aile-Pino o bien el de Pino-Encino; donde las combinaciones pueden ser de varias especies de pinos y *Alnus jorullensis*, o bien asociaciones de *Pinus* mezclados con diversas especies del género *Quercus*.

Páramo de altura: En cuanto al estrato vegetal inferior, por arriba de los 4,000 msnm, éste es formado por pastizal alpino de gramíneas amacolladas tales como *Muhlenbergia macroura*, *M. quadridentata*, *Festuca toluensis*, *F. Amplissima* y *Calamagrostis toluensis*. Así como en un nivel rasante, algunas especies de musgos. A partir de aquí se puede encontrar el llamado páramo de altura con todas las características de un ecosistema de tundra, donde se presentan las especies mencionadas entreveradas con arenas volcánicas y piroclastos.

Bosque mesófilo de montaña: Considerando el área de influencia del Parque, el bosque mesófilo progresa en las innumerables cañadas que

aparecen entre las cotas de los 2,500 a los 2,800 msnm, se presenta en manchones discontinuos protegido de la fuerte insolación y vientos. Presentan suelos profundos, ricos y húmedos durante todo el año, son perennifolios aunque con algunos elementos caducifolios. Se caracterizan por la enorme diversidad de especies vegetales y de la fauna, y por la convivencia de elementos característicos de la flora neártica y neotropical. Como resultado de esta diversidad, en la zona están representados el 44.13 % de las 2,071 especies reconocidas para el valle de México.

Estrato arbustivo: En la zona donde predominan los diversos tipo de bosques se pueden encontrar arbustos creciendo bajo los árboles entre los cuales se destacan la escobilla (*Baccharis conferta*), la jarilla verde (*Senecio salignus*), la jarilla blanca (*Senecio cinerarioides*), la hierba del ángel (*Eupatorium pascuarense*), el cardosanto (*Cirsium ehrenbergii*) y la hierba del sapo (*Eryngium carlinae*).

Estrato herbáceo: De entre los componentes herbáceos del estrato inferior se destacan los jarritos (*Penstemon roscus* y *P. gentianoides*), la hierba del pollo (*Commelina alpestris*) y algunas especies del salvias como la begonia (*Begonia gracilis*), gordolobo (*Gnaphalium oxyphyllum*) y *Lupinus montanus*.

Tipo de Suelo

Las unidades de suelo presentes en el área del Parque son (CONANP, 2004):

Litsoles: suelos someros, con menos de 0.1 m de espesor, formados sobre tepetates y que conservan las características del material parental. Aunque esos suelos pueden estar asociados con regosoles y andosoles en ciertas áreas muy restringidas, generalmente, son poco desarrollados debido a la velocidad de percolación del agua que impide el establecimiento de algún tipo de vegetación, lo que aunado al clima presente a altitudes mayores de 4,000 msnm, dificulta el desarrollo del suelo.

Regosoles: suelos formados a partir de material suelto como arena, grava o piedra; se localizan, dentro del Parque a altitudes por debajo de los 3,900 m y normalmente son pobres en contenido de materias orgánicas y nutrientes.

Andisoles: este tipo de suelos derivan de cenizas volcánicas recientes, por lo que son suelos ligeros con alta retención de humedad y buen contenido de nutrientes, así como con un alto contenido de materia orgánica; por su contenido de materia orgánica y la proporción de vidrios volcánicos presentes, pueden formar andosoles húmicos, que se presentan en áreas forestales poco alteradas; también pueden formar andosoles vítricos en zonas con vegetación de coníferas, cuando presentan más del 60% de vidrios, ceniza volcánica y texturas gruesas.

Cambisoles: suelos mejor desarrollados, con horizontes A y B bien definidos, pero pobres en contenido de nutrientes; presentan potencial para el desarrollo forestal, con adecuadas prácticas de manejo para la conservación de suelo y captación de humedad.

Fluvisoles: suelos formados en cañadas, escurrimientos y zonas de depósitos de material reciente; de textura gruesa, su fertilidad es baja debido al escaso contenido de nutrientes.

Problemática del Parque

El Parque Nacional Izta-Popo, sufre un proceso de deterioro causado por la presión que hacen las poblaciones aledañas para el aprovechamiento de los recursos, a continuación se presentan las principales causas que según la CONANP están generando una presión para el manejo adecuado del Parque.

Tenencia de la tierra, tala clandestina, incendios forestales, cambio de uso de suelo, aunado a la cercanía con la gran metrópoli y la contaminación atmosférica que ésta genera.

CAPÍTULO VI

OBJETIVOS

General

Evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de los principios activos de *Eryngium carlinae* y *Lupinus montanus* en microorganismos patógenos del hombre.

Particulares

Determinar las características físicas (color, textura, humedad, densidad aparente y real) y químicas (materia orgánica, pH real y potencial) del suelo donde crece *Eryngium carlinae* y *Lupinus montanus* dentro de la zona de estudio.

Obtener el extracto vegetal de cada una de las estructuras (hoja, tallo, raíz, flor y fruto) de las plantas.

Determinar la estructura vegetal y su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con mayor efecto sobre la inhibición del crecimiento de los microorganismos a tratar (bacterias: *Corynebacterium xerosis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus* β -hemolítico, *Staphylococcus aureus*; hongos: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* y *Geotrichum spp.*)

Determinar cualitativamente la composición química del extracto vegetal (principio activo) obtenido en cada caso.

CAPÍTULO VII

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Caso 1: *Eryngium carlinae*

Asumiendo que en las hojas de una planta se realiza una de las más activas síntesis química, se considerara éste órgano como la estructura en donde se obtendrá la mayor concentración del principio activo en *Eryngium carlinae*, por tal motivo, está presentará un mayor efecto inhibitorio en el desarrollo de los microorganismos patógenos.

Caso 2: *Lupinus montanus*

Los alcaloides ejercen actividad farmacológica sobre diversos terrenos, entre los cuales encontramos a las enfermedades causantes por parásitos microbianos Debido a que *Lupinus montanus* presenta este tipo de compuestos, se esperara una acción inhibitoria en los microorganismos patógenos a estudiar.

CAPÍTULO VIII
FASE DE CAMPO

Sitio de muestreo

Se realizaron tres visitas mensuales al Parque Nacional Izta-Popo durante el período comprendido entre septiembre – noviembre del 2004.

El sitio de muestreo se ubicó geográficamente entre las coordenadas 19° 05' 04" de latitud norte y 98°37' 8.15" de longitud oeste, a una altitud de 3700 msnm. El área de muestreo fue de aproximadamente 314 m² (Imagen 4).



Imagen 4. Zona de muestreo en la región Paso de Cortés

Recolecta del material vegetal y muestreo del suelo

Se realizó un perfil de la vegetación que consistió en la determinación de especies vegetales presentes en el área de estudio. Algunos ejemplares fueron prensados y llevados a laboratorio para su posterior determinación (Sánchez, 1980; Rzedowsky, 2001), siguiendo la metodología clásica (Gaviño, 1975).

Una vez realizado lo anterior, se efectuó la recolecta de los organismos vegetales (entre 10:00 a.m. y 12:00 p.m.) que se analizaron en el presente estudio, a saber, *Eryngium carlinae* y *Lupinus montanus*. Después se limpiaron y fueron almacenadas en bolsas de papel estraza, a fin de evitar algún tipo de contaminación.

Para la conclusión de esta etapa, se colectaron muestras de suelo obtenidas de 5 diferentes puntos (a una profundidad de 20 cm) con la finalidad de obtener una muestra compuesta de aproximadamente 1 kilogramo, para su posteriormente análisis de propiedades físicas y químicas.

CAPÍTULO IX
FASE DE LABORATORIO

Determinación de propiedades físicas y químicas del suelo

Se realizó la determinación de las propiedades físicas y químicas de las muestras de suelo obtenidas, de la siguiente forma:

Propiedades físicas: (Chapman y Pratt, 1988)

Color (comparación con Tablas Munsell)

Textura (Método de Bouyoucus)

Densidad real y aparente (método de la probeta y picnómetro)

Humedad (Método Gravimétrico)

Propiedades químicas (Jackson y Beltrán, 1964; Chapman y Pratt, 1988),

Determinación de la concentración de materia orgánica (Walkley and Black)

pH (potenciómetro)

Determinación de especies vegetales presentes en el área de estudio

Se procedió a la determinación de las especies vegetales recolectadas en campo mediante el uso de claves taxonómicas (Sánchez, 1980; Rzedowsky, 2001).

Procesamiento de las plantas y obtención de la tintura vegetal

Las plantas a estudiar se dejaron secar a la sombra, en un periodo de 4-5 días. Se separaron en cada una de sus estructuras (tallo, hoja, raíz, flor y fruto). Se pesó cada estructura y posteriormente se lavó con jabón biodegradable y cloro, en una proporción 1:100, a fin de eliminar elementos no deseados (Sincholle y col., 1987; Alfaro y col., 2000), como bacterias y/o hongos. Finalmente se sometieron a un proceso de extracción de tintura mediante el Método Galénico, el cual consistió en la maceración alcohólica de las estructuras vegetales analizadas, en frascos de color ámbar. La cantidad de alcohol utilizado en cada caso dependió del peso y masa de las estructuras analizadas.

Transcurrido un período de 15 días se realizó el filtrado de la tintura y se midió la cantidad obtenida, para posteriormente depositarla dentro de frascos color ámbar.

Obtención de extracto en peso seco

Se obtuvo el extracto en peso seco de cada estructura a través de la destilación *in vacuo* de la tintura vegetal previamente obtenida, para ello se utilizó un equipo rota-vapor con un baño maría a una temperatura de 60° C a una presión de vacío de 10⁻⁴ bares. El sustrato obtenido fue embasado en frascos estériles y color ámbar.

Preparación de concentraciones e impregnación de sensidiscos

Se preparó una serie de cuatro diluciones (por estructura vegetal) de extracto seco disuelto en alcohol bajo las siguientes concentraciones: 30 mg/mL, 60 mg/mL, 90 mg/mL, 120 mg/mL.

Al mismo tiempo, se prepararon sensidiscos de papel Whatman No. 41 con un diámetro de 6 mm, los cuales fueron esterilizados en autoclave y posteriormente impregnados con las concentraciones arriba mencionadas.

Cepas de microorganismos

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.

Algunas de éstas forman parte de una batería mínima que se han utilizado para este tipo de estudios como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Estandarización del inóculo microbiológico

Previamente a todo lo anterior se realizó la estandarización del inóculo microbiológico mediante el método de Kirby-Bauer y la escala de McFarland (Montiel y Guzman, 1997) que se presenta a continuación en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Escala de McFarland

No. de tubo	BaCl₂ 1.0% MI	H₂SO₄ 1.0% MI	No. aprox. de bacterias representadas X 10⁶/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

Posteriormente se llevó a cabo la siembra del inóculo por medio del método de Kirby - Bauer y la técnica de Barry (Agar Muller- Hinton para bacterias, y Agar de Saboraand para Hongos) en cajas Petri, tomando como referencia el tubo número uno de la escala de McFarland.

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Posteriormente se evaluó el efecto inhibitorio 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) (Allen y Baker, 1976; Cacho, 1997). En este paso, se y colocaron en cada una de las cajas, 4 sensidiscos impregnados con las 4 soluciones mencionadas para cada estructura más un sensidisco testigo impregnado con alcohol. Finalmente se incubaron las cajas a 35-37 ° C durante 18 a 48 horas.

Transcurrido un período de 18 horas en el caso de las bacterias, y 48 horas en el caso de los hongos, se midieron los halos de inhibición (incluyendo el área del sensidisco) observando de manera casi inmediata la parte vegetal con mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de los microorganismos así como la concentración mínima inhibitoria de los mismos (bacterias: *Corynebacterium xerose*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium phlei*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus β-hemolítico*, *Staphylococcus aureus*; hongos: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* *Geotrichum sp*) (Ross, 1985; Murray y col., 1997; Koneman, 1997; Granados y Vilaverde, 1997).

Análisis de espectroscopia de infrarrojo

Finalmente se analizó la composición química del extracto vegetal (bajo la técnica de la pastilla de bromuro) obtenido en cada estructura de la planta mediante el análisis de espectrometría infrarroja en un Espectrofotómetro en el Infrarrojo con Transformados de Fourier, de la marca PERKIN ELMER, modelo 1600.

Todos los pasos que componen la fase de laboratorio se efectuaron para ambas especies vegetales.

CAPÍTULO X

FASE DE GABINETE

Análisis estadístico

Primeramente los resultados promedio fueron integrados en un cuadro a modo de resumen, al mismo tiempo se obtuvieron los histogramas correspondientes, a fin de obtener un panorama general del comportamiento de los datos.

Los resultados se examinaron mediante un análisis de varianza de dos factores fijos: **Estructura** y **Concentración**, en un diseño aleatorio de tipo factorial completo (Marques, 1988), mismo que dependió de los resultados obtenidos.

Los tratamientos en los cuales se dividieron cada uno de los factores fueron los siguientes:

A. Estructura ¹	B. Concentración
Flor	30 mg/mL
Hoja	60 mg/mL
Raíz	90 mg/mL
Tallo	120 mg/mL

Una vez conocida la existencia de diferencia entre los resultados, mediante un análisis de varianza, se aplicó una prueba de diferencia significativa mínima de Fisher (DSM), a fin de conocer cual de los pares de medias causaba la diferencia. Esta prueba se aplicó tanto para los resultados obtenidos para el factor **Estructura**, como para el factor **Concentración**.

El nivel de confianza aplicado fue del 95% con un $\alpha = 0.5$, con lo cual el margen de error se minimiza.

¹ En el caso del factor **Estructura** para *Lupinus montanus* se tuvo además, la categoría **Fruto**.

CAPÍTULO XI

RESULTADOS Y DISCUSION

Determinación de las propiedades físicas y químicas del suelo

En el cuadro 3 se observan los valores obtenidos para el análisis de las propiedades físicas y químicas del suelo presente en la zona de muestreo.

Cuadro 3. Resultados del Análisis de Muestras Compuestas de Suelo

Propiedad	Resultado
Color	Gris oscuro 10YR
Densidad aparente	0.93 g/cc
Densidad real	2.08 g/cc
Porcentaje de porosidad	55.22
Textura	Franco Arenosa
Porcentaje de arena	65
Porcentaje de limo	20
Porcentaje de arcilla	15
pH real	5.12
pH potencial	4.65
Porcentaje de materia orgánica	4

Los datos obtenidos en el análisis anterior, revelan características propias de suelos del tipo Andisol; color oscuro indicador de un alto contenido de materia orgánica; presenta una baja densidad aparente (0.93 g/cc) con un alto porcentaje de porosidad (55.22%), con lo cual se puede deducir una buena circulación de gases, aunado a esto el espacio poroso permite el crecimiento radicular mediante lo cual se favorece el establecimiento de la vegetación (Parissi, 1979; Chapman y Pratt, 1988; Moreno 1996) . La textura corresponde al tipo franco-arenoso, de ahí que la densidad aparente sea baja y el alto porcentaje de porosidad, esto implica sin embargo, una baja retención de agua. Los valores obtenidos de pH (5.12 y 4.65) son reflejo de suelos ácidos, esto se debe al elevado contenido de materia orgánica que presentan (4 %), debido también, al origen volcánico de este tipo de suelo (Jackson y Beltrán, 1964; Aubert, 1985).

La vegetación presente en el sitio de muestreo estaba conformada por la especie arbustiva: *Eryngium carlinae*, la herbácea: *Lupinus montanus* y la arbórea: *Pinus hartwegii*.

Rendimiento estructura vegetal – extracto (peso seco)

Los cuadros número 4 y 5 incluyen los resultados obtenidos para la obtención de los extractos en peso seco, a partir de la tintura vegetal de *Eryngium carlinae* y *Lupinus montanus* respectivamente, por medio del Método Galénico y la destilación *in vacuo*. La primer columna incluye la estructura de la planta, la segunda columna, la cantidad de gramos sometida al proceso de extracción, la columna siguiente hace referencia a la cantidad de alcohol utilizado para cubrir la estructura en cada caso, en la cuarta columna se presenta la cantidad de extracto seco obtenida en cada caso luego del proceso de destilación. Finalmente, en la última columna hace mención del porcentaje de rendimiento obtenido en cada caso.

Cuadro 4. Cantidad y rendimiento obtenido para *Eryngium carlinae* (Tintura vegetal)

Estructura	Peso seco (g)	Alcohol añadido (mL)	Extracto en peso seco (g)	Porcentaje de rendimiento
Hoja	30	1020	4	13
Tallo	28	1080	3	11
Flor	72	1300	7	10
Raíz	37	845	3	8

Cuadro 5. Cantidad y rendimiento obtenidos para *Lupinus montanus* (Tintura vegetal)

Estructura	Peso seco (g)	Alcohol añadido (mL)	Extracto en peso seco (g)	Porcentaje de rendimiento
Flor	41	700	11	27
Hoja	160	1264	8	5
Raíz	205	660	10	5
Fruto	126	700	3	2.5
Tallo	444	1260	4	1

En el caso de *Eryngium carlinae* no se tomo en cuenta el fruto, debido a que este no estaba en formación durante el período de recolecta de la planta. La cantidad pesada de las estructuras fue variable en ambas plantas debido al peso y tamaño de las mismas.

Tanto para el caso de *Eryngium carlinae* como para *Lupinus montanus* se observo una perdida de alcohol debido a evaporación y a la retención de alcohol por parte de las estructuras vegetales.

Los resultados para la obtención de los extractos en peso seco, muestran que para el caso de *Eryngium carlinae* (cuadro 4) el mayor rendimiento respecto la biomasa de la estructura vegetal perteneció a la hoja (13 %), seguida de tallo (11%) , flor (10%) y raíz (8%). Mientras que en *Lupinus montanus* (cuadro 5) el mayor rendimiento se alcanzo en flor (27%), seguida de hoja y tallo (5% respectivamente), fruto (2.5 %) y finalmente raíz (1%).

Este tipo de información es muy valiosa toda vez 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.

Otro punto importante es el hecho de que no existen estudios que relacionen las propiedades farmacológicas de las plantas medicinales con el tipo de suelo donde crecen. Los cuadros 4 y 5, permiten conocer el rendimiento obtenido en la relación estructura vegetal - extracto (con potencial farmacológico) en dos plantas que han sido poco estudiadas, creciendo en un suelo de tipo andisol. Esto puede abrir nuevas líneas de investigación, en las cuales se evalué si la acción farmacológica de los extractos de estas plantas, se vea influenciado por el tipo de suelo donde crecen.

Pruebas de sensibilidad con extractos vegetales obtenidos a partir de *Eryngium carlinae*

En el cuadro 6 se presentan los resultados de los antibiogramas que se obtuvieron con cada una de las concentraciones preparadas a partir de los extractos de flor, hoja, raíz y tallo, 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 la batería de bacterias y en segundo lugar la batería de hongos.

Cuadro 6. Resultados del tamaño promedio de los halos de inhibición en pruebas de sensibilidad con bacterias y hongos, utilizando los extractos obtenidos a partir de *Eryngium carlinae*.

Microorganismo	Estructura															
	Flor				Hoja				Raíz				Tallo			
	Concentraciones (mg/mL)															
Bacterias	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120
<i>Corynebacterium xerosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycobacterium phlei</i>	6.0	6.0	6.3	8.4	6.2	6.3	6.4	6.7	6.0	6.3	6.5	7.2	6.7	6.5	7.0	7.2
<i>Streptococcus mutans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus hemolítico</i> β -	6.0	6.1	6.4	6.8	6.0	6.0	6.4	6.7	6.2	6.1	6.4	6.5	6.0	6.0	6.2	6.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hongos																
<i>Candida albicans</i>	6.0	6.0	6.1	6.3	0	0	0	0	6.3	6.7	7.3	7.6	0	0	0	0
<i>Candida krusei</i>	6.1	6.3	6.4	6.4	6.1	6.1	6.2	6.4	6.0	6.3	6.6	7.1	6.1	6.2	6.3	6.6
<i>Candida stellatoidea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	6.0	6.0	6.2	6.7	0	0	0	0
<i>Geotrichum sp</i>	6.1	6.0	6.3	6.8	0	0	0	0	6.0	6.1	6.5	6.8	0	0	0	0

Como se puede apreciar en el cuadro anterior, las soluciones analizadas de las estructuras de *Eryngium carlinae* en sus diferentes concentraciones, presentan principios activos que actúan de forma inhibitoria tanto en bacterias (*Mycobacterium phlei* y *Streptococcus* β -hemolítico) como en hongos (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* y *Geotrichum sp.*), teniendo en estos últimos un rango de inhibición más amplio que en bacterias.

De igual forma, se observa que los extractos con un mayor rango en el efecto inhibitorio del desarrollo de los microorganismos se obtienen de la raíz, ya que esta fue eficaz en la inhibición de 2 de las 7 bacterias sometidas a la prueba (*Mycobacterium phlei* y *Streptococcus* β -hemolítico) y 4 de los 6 hongos analizados (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* y *Geotrichum sp.*). En contraste con lo anterior, los extractos obtenidos a partir del tallo, presentaron un menor margen de acción antimicrobiana, ya que sólo fueron efectivos en las pruebas realizadas con la bacteria: *Mycobacterium phlei*, y el hongo: *Candida krusei*.

Finalmente, las pruebas de sensibilidad resultaron negativas en todos los ensayos para los siguientes microorganismos; Bacterias: *Corynebacterium xerosis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, Hongos: *Candida stellatoidea* y *Candida tropicalis*. Esto se puede deber a que los principios activos presentes en los extractos de la planta no son específicos para la inhibición de los microorganismos mencionados o también, a la necesidad de dosis más elevadas para la obtención de un efecto positivo.

En las siguientes páginas se presentan de manera gráfica los ensayos en los que alguna(s) de las concentraciones presentó efecto inhibitorio en el crecimiento del microorganismo sometido a la prueba de sensibilidad.

Mycobacterium phlei

El gráfico 1, presenta los tamaños promedio de los halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Mycobacterium phlei* con los extractos de flor, bajo cuatro diferentes concentraciones. Como se puede apreciar, la concentración de 120 mg/mL presentó los mayores halos de inhibición, estadísticamente esta concentración presenta diferencias en los resultados obtenidos respecto de las demás concentraciones ($p=0.0000$), en las cuales el resultado es muy parecido (apéndice 1., cuadro 1.a)

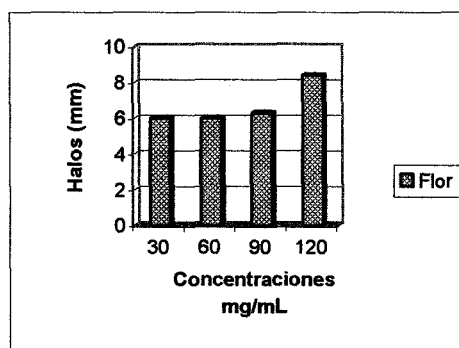


Gráfico 1. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Mycobacterium phlei* causados por extractos de flor.

En el gráfico número 2, se muestran los tamaños promedio de los halos de inhibición conseguidos en cultivos de *Mycobacterium phlei* con los extractos derivados de hoja. Al igual que en el caso anterior, bajo la concentración de 120 mg/mL se presentaron los mayores halos de inhibición respecto de las demás concentraciones ($p = 0.0000$), en las cuales el resultado es semejante (apéndice 1., cuadros 1.a y 1.c).

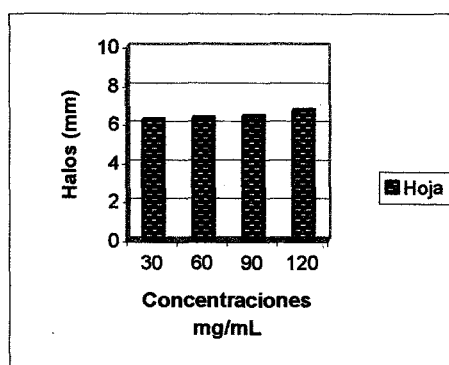


Gráfico 2. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Mycobacterium phlei* causados por extractos de hoja.

Los gráficos 3 y 4, muestran el promedio de los tamaños de halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Mycobacterium phlei* con los extractos de raíz y tallo respectivamente. En ambos casos, bajo la concentración de 120 mg/mL se obtuvieron los mayores halos de inhibición ($p = 0.0000$), esta concentración fue estadísticamente diferente a las otras tres concentraciones, en las cuales se observa una variación mínima (apéndice 1, cuadros 1.a y 1.c).

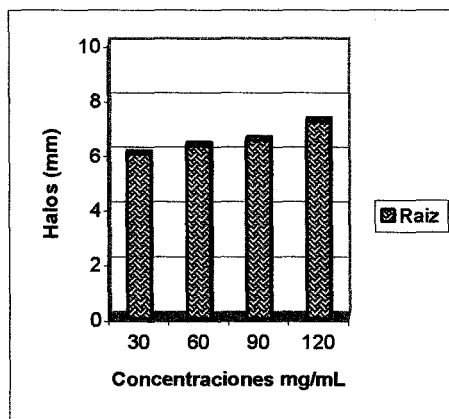


Gráfico 3. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Mycobacterium phlei* causados por extractos de raíz.

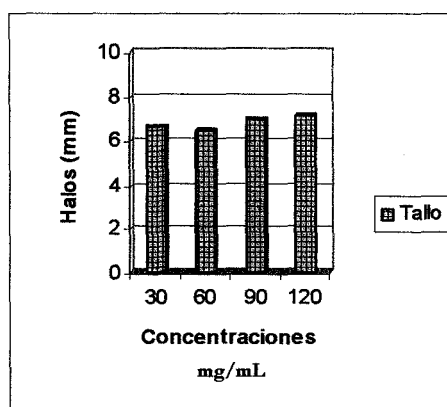


Gráfico 4. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Mycobacterium phlei* causados por extractos de tallo.

En el gráfico 5, se observan los valores promedio del tamaño de los halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Mycobacterium phlei*. En este caso, en el gráfico se brinda un panorama general de la interacción Estructura–Concentración sobre el tamaño del halo, bajo un diseño factorial 4 x 4.

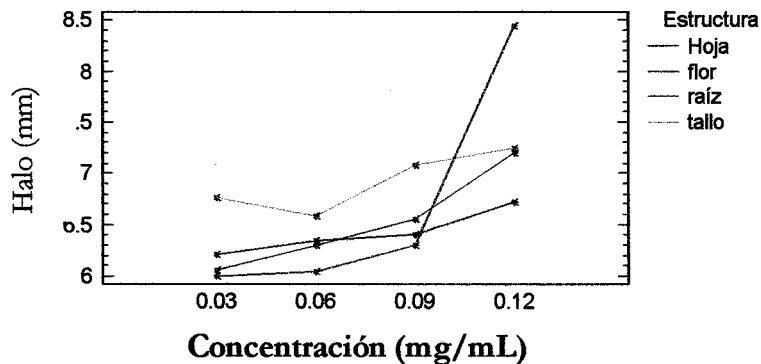


Gráfico 5. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de *Mycobacterium phlei*.

Se puede afirmar que los extractos vegetales de *Eryngium carlinae*, presentan principios activos con características bactericidas. Luego del análisis estadístico, se puede aseverar que a un nivel de confianza del 95 % no existe diferencia entre la capacidad bactericida que tienen los principios activos de cada estructura vegetal ($p=0.2031$), sin embargo, si existe diferencia estadística entre los efectos causados por las concentraciones de los extractos ($p=0.0000$).

Si bien bajo la concentración de 120 mg/mL se encuentran los mejores resultados (en todos los casos), uno de los objetivos de este estudio consistió en hallar la Concentración Mínima, bajo la cual se logra el efecto inhibitorio. Según el dato arrojado por la prueba de Diferencia Significativa Mínima de Fisher (DSM) con un $\alpha = 0.5$, la CMI fue de 30 mg/mL (apéndice 1., cuadro 1.c).

Observando la grafica anterior podemos apreciar que desde la concentración de 30 mg/mL (CMI) se presentan halos de inhibición en todos los casos, pero, es justamente a partir de los extractos de tallo de donde se obtienen los mejores resultados, por lo cual se puede sugerir a esta como la estructura más adecuada (al menos a la concentración más baja estudiada) para inhibir el crecimiento de esta bacteria (apéndice 1., cuadro 1.b). La interacción Estructura–Concentración no presenta efecto ($p = 0.0837$) sobre el tamaño de los halos de inhibición (apéndice 1, 1.a).

Streptococcus β-hemolítico

En los gráficos 6 y 7, se presentan los tamaños promedio de los halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Streptococcus β-hemolítico* con los extractos de flor y hoja, respectivamente.

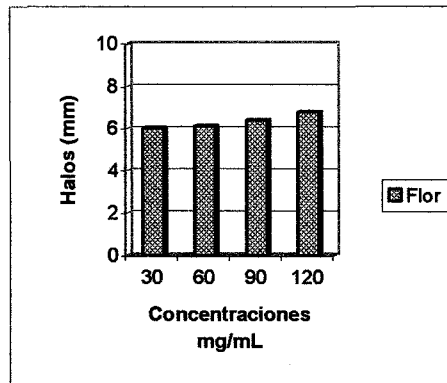


Gráfico 6. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Streptococcus β-hemolítico* causados por extractos de flor.

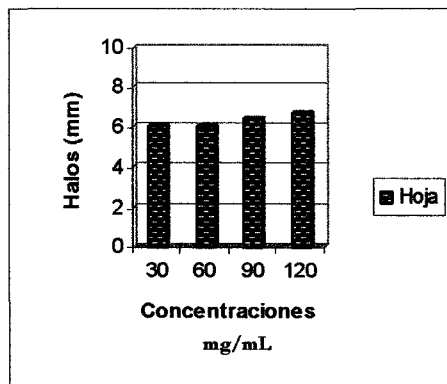


Gráfico 7. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Streptococcus β-hemolítico* causados por extractos de hoja.

Estadísticamente no existió diferencia entre los resultados que arrojaron los antibiogramas realizados con los extractos de flor y hoja. En ambos casos se puede afirmar que los extractos de estas estructuras, presentan principios activos de carácter bactericida. Respecto al factor de concentración, se puede afirmar que existe diferencia ($p=0.0000$) entre las concentraciones de 90-30, 90-60, 90-120, 120-30, 120-60, no así entre las concentraciones de 30-60, en las cuales el resultado fue similar para ambos casos (apéndice 1., cuadro 2.c).

En los siguientes gráficos (8 y 9), se presentan los tamaños promedio de los halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Streptococcus β-hemolítico* con los extractos de raíz y tallo, respectivamente.

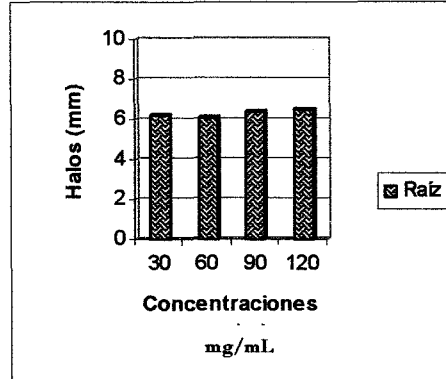


Gráfico 8. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Streptococcus β-hemolítico* causados por extractos de raíz.

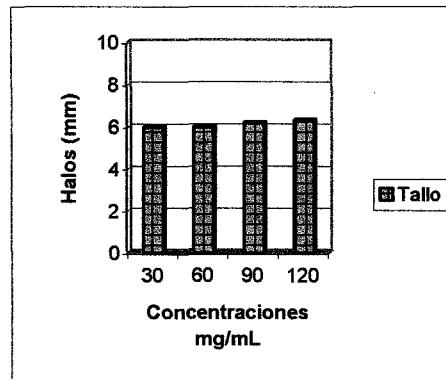


Gráfico 9. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Streptococcus β-hemolítico* causados por extractos de tallo.

Existe evidencia estadística para afirmar con un 95 % de confianza, que los resultados obtenidos en antibiogramas realizados con los extractos de tallo, son menos eficaces ($p=0.1343$) que los obtenidos con raíz, flor y hoja (apéndice 1., cuadro 2.b). Al igual que en el caso anterior se puede aseverar que los extractos de estas estructuras (raíz y tallo), presentan principios activos de carácter bactericida.

Respecto al factor de concentración ($p= 0.0000$), los resultados fueron los mismos a los anteriormente mencionados para flor y hoja (apéndice 1., cuadro 2.c).

En el siguiente gráfico, se observan los valores promedio del tamaño de los halos de inhibición obtenidos bajo la interacción de los factores Estructura-Concentración en la prueba de sensibilidad aplicada a *Streptococcus β-hemolítico* bajo un diseño factorial 4 x 4.

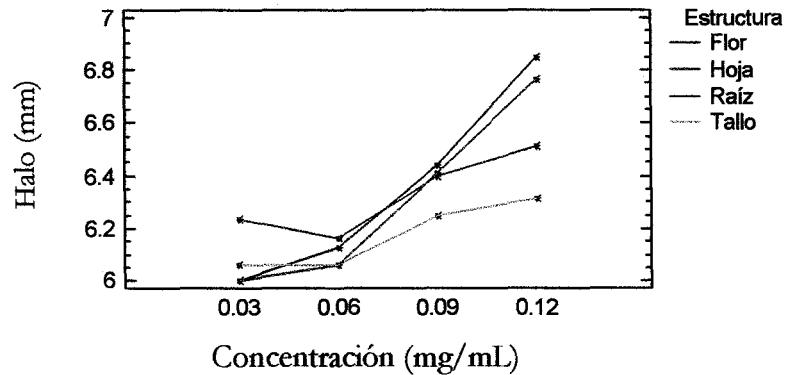


Gráfico 10. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de *Streptococcus β-hemolítico*.

Los análisis de varianza realizados para este ensayo indican que a un nivel de confianza del 95% no existe diferencia significativa ($p=0.1343$) entre los efectos causados por principios activos de flor, hoja y raíz, no así en el caso de tallo, en los cuales los resultados reflejan una menor eficacia (apéndice 1., cuadro 2.a).

La finalidad de este estudio fue hallar la estructura con mayor efecto inhibitorio (lo cual se refleja en el tamaño de los halos) y su concentración mínima. Observando la grafica anterior, se puede ver que bajo la menor concentración analizada (30 mg/mL), es justamente con los extractos de raíz, con los cuales se obtienen los halos de inhibición más grandes, en comparación con los demás extractos bajo la misma concentración. Si bien, estadísticamente no se puede establecer que los extractos de raíz sean los más eficaces, si se puede establecer la concentración de 30 mg/mL como la CMI (apéndice 1., cuadro 2.a).

Bajo esta CMI, resulta indistinto tomar los extractos de flor, hoja y raíz, ya que los resultados esperados, serían estadísticamente similares. Sin embargo, asociando este dato con los obtenidos en el rendimiento del extracto por estructura (véase cuadro 4), resultaría más conveniente utilizar los extractos obtenidos de hoja. Finalmente, la interacción Estructura-Concentración (apéndice 1. cuadro 2.a) no presento efecto sobre el tamaño de los halos ($p=0.2289$).

Candida albicans

Los gráficos 11 y 12, muestran los tamaños promedio de los halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Candida albicans* con los extractos de flor y hoja, respectivamente.

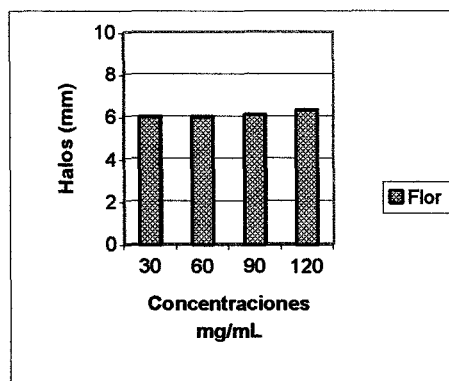


Gráfico 11. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida albicans* causados por extractos de flor.

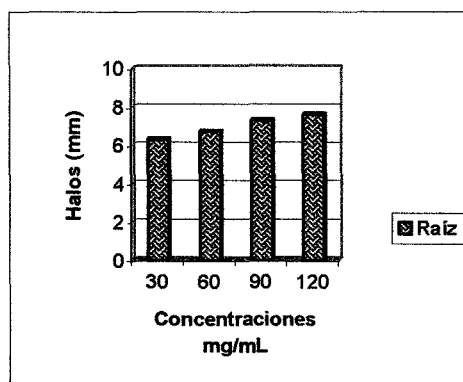


Gráfico 12. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida albicans* causados por extractos de raíz.

En este ensayo los resultados sólo fueron positivos bajo la aplicación de los extractos obtenidos de flor y raíz. En cuanto a tallo y hoja, la prueba de sensibilidad presentó resultados negativos.

Los halos de mayor tamaño se obtuvieron bajo la concentración de 120 mg/mL en ambos casos ($p=0.0002$), pero fueron más evidentes en los ensayos realizados con extractos de raíz, tal y como se observa en las gráficas anteriores.

En el gráfico 13, se observan los valores promedio del tamaño de los halos de inhibición obtenidos bajo la interacción de los factores Estructura -Concentración en la prueba de sensibilidad aplicada a *Candida albicans* bajo un diseño factorial 4 x 2.

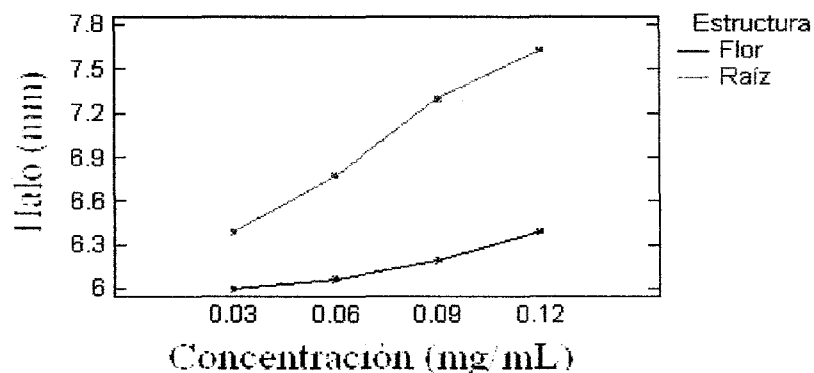


Gráfico 13. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida albicans*.

Los resultados de los ensayos mostraron diferencia al 95 % de confianza ($p=0.0000$) entre los efectos causados por los extractos de flor y raíz sobre el tamaño de los halos de inhibición (apéndice 1., cuadros 3.a y 3.b). Al mismo tiempo, se presentó diferencia entre los efectos causados por el factor **concentración** ($p=0.0002$). La CMI para raíz fue de 30 mg/mL.

Al igual que en los casos anteriores, la interacción de los factores Estructura – Concentración no presentó efectos sobre el tamaño de los halos de inhibición ($p=0.0869$).

En un estudio experimental, similar al realizado, Martínez y col. (1999), observan la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* al someterla a pruebas de sensibilidad con diferentes concentraciones de un extracto fluido (etanol al 80 %) de hojas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal).

Por otro lado, Hernández y Rodríguez, en el año 2000, asilan extractos fluidos de *O. Basilicum* L mediante el método de diluciones seriadas dobles en medio líquidos. Los resultados obtenidos con el extracto pusieron de manifiesto que de las especies microbianas analizadas, *Candida albicans* resultó ser la más sensible. Esta especie es la causante de la candidiasis, cuyas forma patológica se manifiesta como una micosis a nivel de boca y tracto digestivo y a veces a nivel vaginal.

Candida krusei

Los gráfico 14 y 15, muestran el promedio de los tamaños de halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Candida krusei* con los extractos de flor y hoja respectivamente.

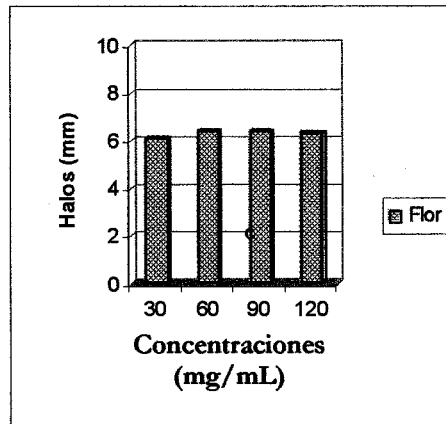


Gráfico 14. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida krusei* causados por extractos de flor.

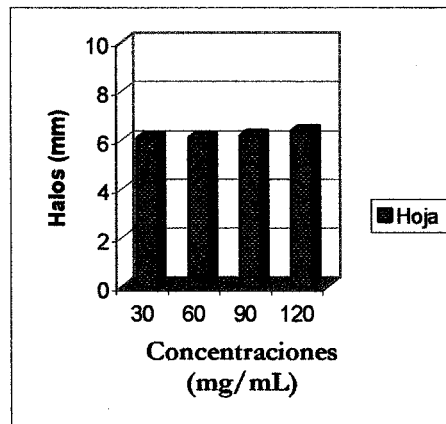


Gráfico 15. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida krusei* causados por extractos de hoja.

Estadísticamente no existió diferencia entre los resultados que arrojaron los antibiogramas realizados con los extractos de flor y hoja (apéndice 1., cuadro 4.b). En ambos casos se puede afirmar que los extractos de estas estructuras, presentan principios activos de carácter fungicidas.

Respecto al factor **concentración**, se puede afirmar que existe diferencia ($p= 0.0000$) entre las concentraciones de 60-30, 90-30, 90-120, 120-30, 120-60, no así entre las concentraciones de 60-90, en las cuales el resultado fue similar para ambos casos (apéndice 1., cuadro 4.c).

Los siguientes gráficos, muestran el promedio de los tamaños de halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Candida krusei* con los extractos de raíz y tallo respectivamente. En ambos casos, bajo la concentración de 120 mg/mL se obtuvieron los mayores halos de inhibición, esta concentración fue estadísticamente diferente a las otras tres concentraciones, en las cuales se observa una variación mínima (apéndice 1., cuadro 4.c).

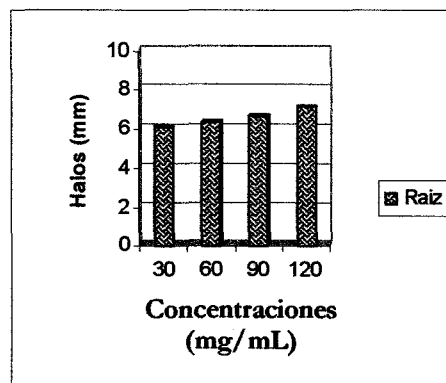


Gráfico 16. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida krusei* causados por extractos de raíz.

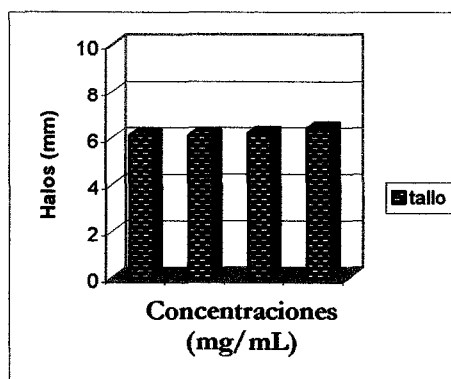


Gráfico 17. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida krusei* causados por extractos de tallo.

Estadísticamente existió diferencia significativa ($p=0.0042$) entre los resultados que arrojaron los antibiogramas realizados con los extractos de raíz en comparación con los de hoja, flor y tallo (apéndice 1., cuadros 4.a y 4.b).

En el gráfico 18, se observan los valores promedio del tamaño de los halos de inhibición obtenidos bajo la interacción de los factores Estructura -Concentración en la prueba de sensibilidad aplicada a *Candida krusei* bajo un diseño factorial 4 x 4.

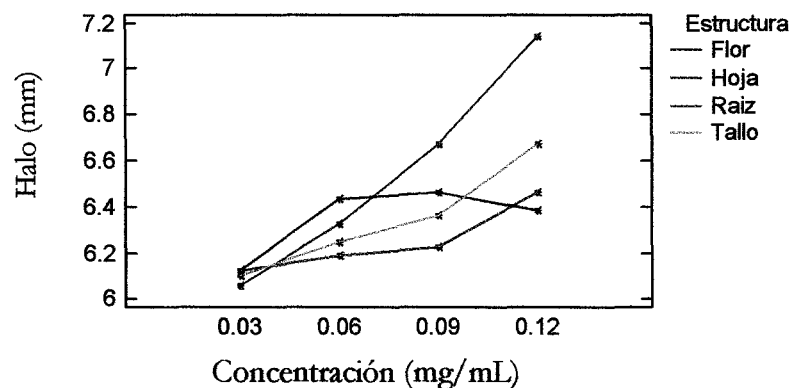


Gráfico 18. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida krusei*.

Los mayores halos de inhibición de estos hongos patógenos, se presentaron bajo la concentración de 120 mg/mL en todos los casos ($p=0.0000$), sobresaliendo los hallados en raíz (apéndice 1., cuadros 4.a y 4.b)).

A un nivel de confianza del 95 %, la raíz muestra diferencias significativas en el efecto antifúngico respecto de los otros tratamientos (apéndice 1., cuadro 4.b), la CMI de esta estructura fue de 30 mg/mL.

La interacción de los factores Estructura – Concentración presentó efectos significativos sobre el tamaño de los halos de inhibición ($p= 0.0150$).

Candida krusei se encuentra dentro de la cavidad bucal, provocando micosis que incluso pueden afectar el tracto digestivo (Koneman, 1997; Ramírez, Millán, Luna , 2003 ; Larone,1995). Con este tipo de análisis experimental se pueden vislumbrar nuevas alternativas para combatir dicho organismo.

Cryptococcus neoformans

El gráfico 19, presenta los tamaños promedio de los halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Cryptococcus neoformans* con extractos obtenidos a partir de raíz de *Eryngium carlinae*.

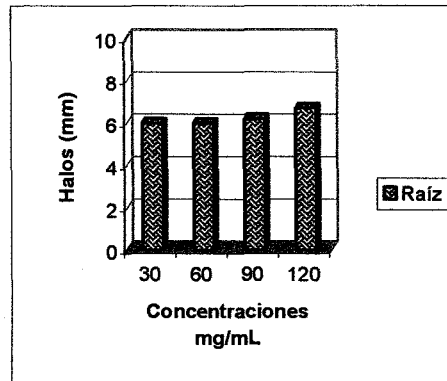


Gráfico 19. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Cryptococcus neoformans* causados por extractos de raíz.

En el caso de *Cryptococcus neoformans* sólo se observó efecto antifúngico en los ensayos realizados con extractos de raíz. Para tallo, hoja y flor los resultados fueron negativos en todos los casos. Esto puede deberse a una mayor concentración de aminas en la raíz (véase espectro de infrarrojo de raíz), mismas que sirven de precursores para otro tipo de sustancias de mayor complejidad (alcaloides, por ejemplo) y que a su vez, presentan acción farmacológica.

Estadísticamente la concentración de 120 mg/mL fue diferente a las demás concentraciones (apéndice 1., cuadro 5.b). La concentración mínima inhibitoria (CMI) en este caso, fue para raíz, de 30 mg/mL.

El contacto con este tipo de hongo puede provocar una enfermedad conocida como meningitis criptocócica muy a menudo afecta a personas inmunosuprimidas y entre los factores de riesgo se encuentran: SIDA, linfoma y diabetes. Este tipo de estudios pueden servir de base para un posterior análisis con mayor especificidad.

Geotrichum spp.

Los gráficos 20 y 21, muestran el promedio de los tamaños de halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Geotrichum spp.*, con los extractos de flor y raíz respectivamente. En ambos casos, bajo la concentración de 120 mg/mL se obtuvieron los mayores halos de inhibición, esta concentración fue estadísticamente diferente a las otras tres concentraciones ($p= 0.0000$), en las cuales se observa una variación mínima (apéndice 1., cuadro 6.c).

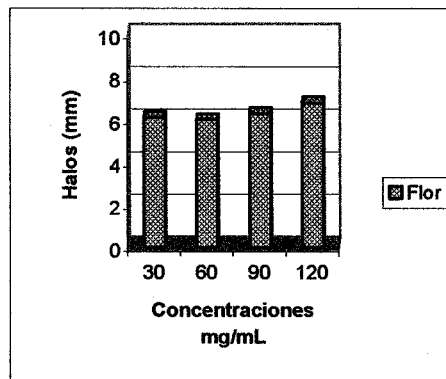


Gráfico 20. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Geotrichum spp.*, causados por extractos de flor.

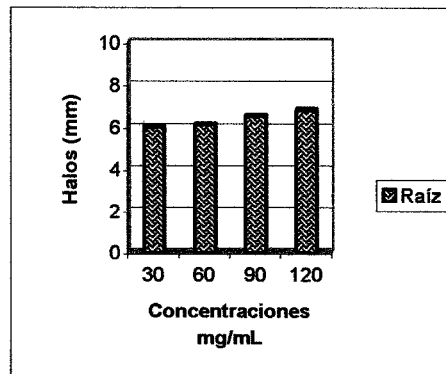


Gráfico 21. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Geotrichum spp.*, causados por extractos de raíz.

En el caso de *Geotrichum spp.*, sólo se observó efecto antifúngico en los ensayos realizados con extractos de flor y raíz. Para tallo y hoja los resultados fueron negativos en todos los casos.

En el gráfico 22, se observan los valores promedio del tamaño de los halos de inhibición obtenidos bajo la interacción de los factores Estructura -Concentración en la prueba de sensibilidad aplicada a *Geotrichum spp.*, bajo un diseño factorial 4 x 2.

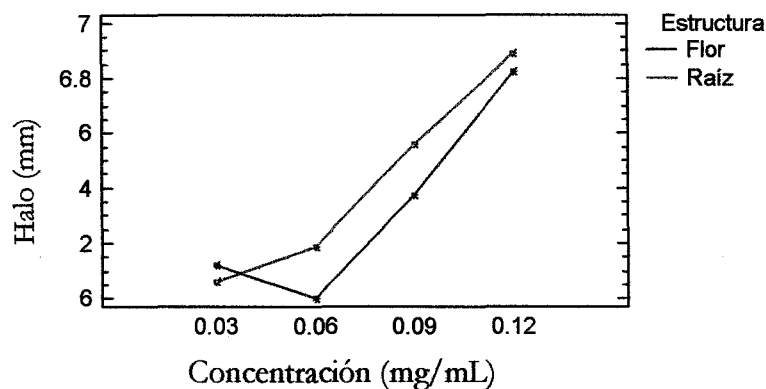


Gráfico 22. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de *Geotrichum spp.*

Los extractos obtenidos a partir de flor y raíz de *Eryngium carlinae*, presentaron principios activos con carácter antifúngico. A un nivel de confianza de 95 %, existió evidencia estadística para afirmar que el tamaño de los halos de inhibición no se vio afectado por el origen del extracto vegetal ($p=0.3635$), dicho de otra manera, se pueden utilizar extractos de flor o raíz (bajo una misma concentración) y los resultados no presentarían diferencia estadística (apéndice 1., cuadros 6.a y 6.b).

Respecto al factor **concentración**, el tamaño del halo si se ve afectado por la concentración de dicho extracto. En el gráfico anterior se puede apreciar claramente que la concentración de 120 mg/mL fue diferente a las demás concentraciones, esto se corroboró al aplicar la prueba de DSM de Fisher (apéndice 1., cuadro 6.c). La CMI en este caso fue de 30 mg/mL, tanto para flor como para raíz.

Bajo esta CMI, resulta indistinto tomar los extractos de flor o raíz, ya que los resultados esperados, serían estadísticamente similares. Sin embargo, relacionando este dato con los obtenidos en el rendimiento del extracto por estructura (véase cuadro 4), resultaría más conveniente utilizar los extractos obtenidos de flor.

Finalmente, la interacción Estructura-Concentración no presentó efectos sobre el tamaño del halo de inhibición.

Espetros IR de *Eryngium carlinae*

En química orgánica, los compuestos de un cierto tipo se clasifican, bien por su capacidad para transformarse en una reacción particular, como desplazamientos, sustituciones, etc., bien por los grupos funcionales presentes en ellos (hidroxilo, cetona, etcétera), esto es la base del análisis de infrarrojo.

En las páginas siguientes, se presenta el espectro infrarrojo de las moléculas orgánicas presentes en los extractos de cada una de las estructuras vegetales analizadas. Este espectro, suministra información meramente cualitativa acerca de los componentes de las moléculas, por lo cual es imposible saber la concentración de cada uno de ellos.

Flor

La siguiente imagen representa la composición química de los extractos obtenidos a partir de flor de *Eryngium carlinae*, analizada mediante la técnica de la pastilla de bromuro.

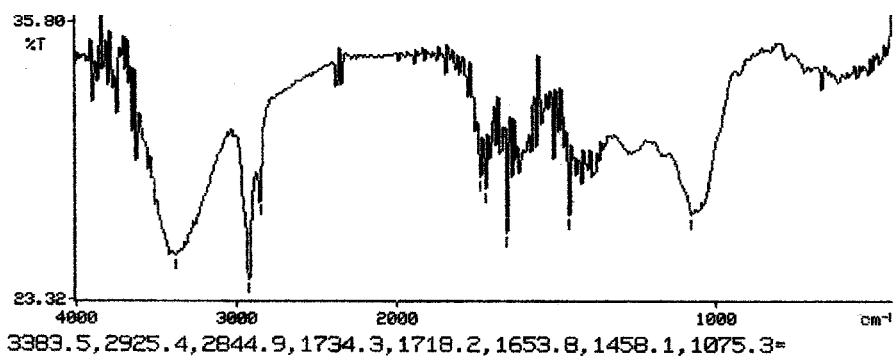


Imagen 5. Espectro Infrarrojo de los extractos de flor (*Eryngium carlinae*)

Según la longitud de onda registrada (Creswell, Runquist y Campbell. 1980), la composición química de dicho extracto es la siguiente:

3383.5 amina primaria

2925.4 OH asociado, α - aminoácido, NH₄

2844.9 OH asociado, α - aminoácido, NH₄

1734.3 aldehídos

1718.2 aromático

1653.8 NH₃ (α - aminoácido), ésteres en forma de quelato (C=N)

1458.1 alcano (C-C) aromático

1075.3 sin valor práctico, cetona, Ester (C-O-C-OC)

Raíz

En la imagen que a continuación se presenta corresponde al análisis espectroscópico de los extractos obtenidos a partir de raíz de *Eryngium carlinae*.

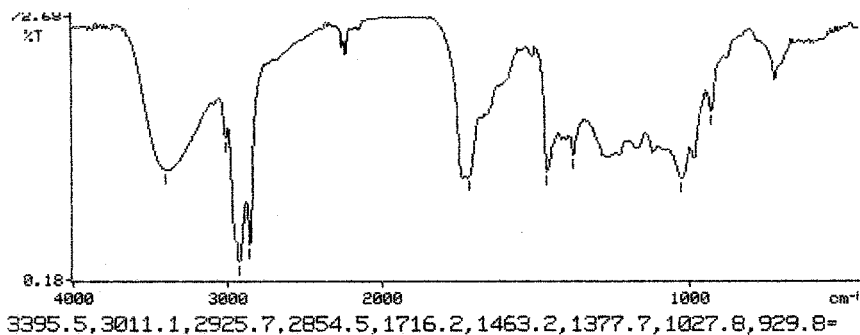


Imagen 6. Espectro Infrarrojo de los extractos de raíz (*Eryngium carlinae*)

Según la longitud de onda registrada (Ibíd. Pág. 85), la composición química de dicho extracto es la siguiente:

3395.5 NH, amina secundaria, grupo funcional alcohol

3011.1 alqueno

2925.7 alcano

2854.5 aldehído, alquilo

1716.2 aromático, aldehído aromático

1463.2 alcano

1377.7 grupo metilo

1027.8 éter

921.8 compuesto con C, P, O

Tallo

La siguiente imagen corresponde al análisis espectroscópico de los extractos obtenidos a partir de tallo de *Eryngium carliniae*.

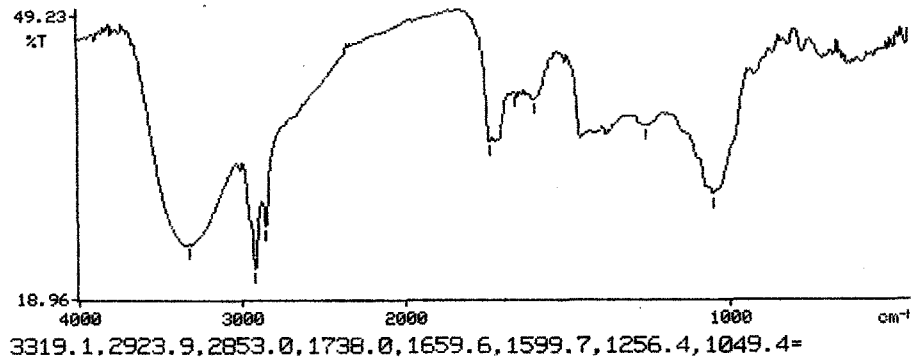


Imagen 7. Espectro Infrarrojo de los extractos de tallo (*Eryngium carliniae*)

Según la longitud de onda registrada (Ibíd. Pág. 85), la composición química de dicho extracto es la siguiente:

Composición química:

3319.1 grupo OH, polímeros, amina

2923.9 alcano

2853.0 aldehído

1738.0 aromático

1659.6 aromático

1599.7 aromático

1256.4 éter

1049.4 éter

En los espectros de infrarrojo anteriores se pueden observar diversos grupos funcionales, algunos de ellos son precursores de sustancias tales como los alcaloides (los cuales ejercen actividad farmacológica sobre diversos terrenos, entre los cuales encontramos a las enfermedades causantes por parásitos microbianos) y protoalcaloides, formados por aminas sencillas o primarias (Bruneton, 1993).

También se observa la presencia de aminas (3395.5), sobre todo en el espectro de raíz. Coincidentemente, fueron los extractos de este órgano vegetal los que presentaron un margen de acción farmacológica mayor, ya que actuaron como inhibidores en el 100% de los ensayos positivos.

Las aminas se pueden considerar como productos de desechos en las plantas. Sin embargo si la planta no lo libera, son transportadas a otras partes de la planta, en especial a los meristemos (James, 1967; Rojas, 1980; Deiter, 19809; Devlin, 1982; Salisbury, 2000). Esto sugiere una posible respuesta a el ¿Por qué se obtiene un mejor efecto inhibitorio con los extractos de raíz?, ya que como lo marca la literatura, es en esta parte donde se da una mayor concentración de aminas, mismas que sirven de precursores para otro tipo de sustancias de mayor complejidad y, que a su vez, presentan acción farmacológica.

En el caso de los ésteres presentes en los espectros, existen algunos ejemplos de aplicaciones médicas importantes (Evans, 1991). El nitrito de etilo es diurético y antipirético. El nitrito de amilo se usa en el tratamiento del asma bronquial y de las convulsiones epilépticas, y como antiespasmódico. La nitroglicerina y el nitrito de amilo producen la dilatación de los vasos sanguíneos, disminuyendo por tanto la presión sanguínea. El chaulmugrato de etilo se ha empleado en el tratamiento de la enfermedad de Hansen.

Dentro del grupo funcional de la cetona, también, se encuentran ejemplos de principios activos como el alcanfor ($C_{10}H_{16}O$) obtiene del alcanforero, (*Cinnamomum camphora*), que crece en Asia y en Brasil. Utilizado en medicina, en linimentos y otros preparados debido a sus cualidades antisépticas y anestésicas.

Los alcoholes, aldehídos, ésteres de ácidos carboxílicos y otros compuestos así formados 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 (Mulet, 1997).

Pruebas de sensibilidad con extractos vegetales obtenidos a partir de *Lupinus montanus*

En el cuadro 7 se presentan los resultados de los antibiogramas que se obtuvieron con cada una de las concentraciones preparadas a partir de los extractos de flor, hoja, raíz y tallo, 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 la batería de bacterias y en segundo lugar la batería de hongos.

Cuadro 7. Resultados del tamaño promedio de los halos de inhibición en pruebas de sensibilidad con bacterias y hongos, utilizando los extractos obtenidos a partir de *Lupinus montanus*.

Microorganismo	Estructura																			
	Flor				Fruto				Hoja				Raíz				Tallo			
	Concentraciones (mg/mL)																			
Bacterias	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120	30	60	90	120
<i>Corynebacterium xerosis</i>	7.9	8.3	8.7	9.6	7.5	7.8	8.4	8.9	8.1	8.5	9.1	10.1	9.0	9.5	9.9	10.5	7.2	7.6	8.3	8.6
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mycobacterium phlei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus mutans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i> β - <i>hemolítico</i>	6.3	7.2	7.7	8.1	0	0	0	0	0	0	0	0	7.8	9.0	9.1	11.5	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	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	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida krusei</i>	0	0	0	0	7.6	7.7	8.3	8.5	7.8	8.4	8.8	9.1	8.9	9.2	9.3	9.3	7.5	7.6	8.0	8.4
<i>Candida stellatoidea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida tropicalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Geotrichum sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

La actividad antimicrobiana *in vitro* de *Lupinus montanus* no ha sido investigada anteriormente. Por tanto, este tipo de resultados sirven como base para estudios posteriores. Por otra parte, el hecho de que los extractos obtenidos de la estructuras de esta planta presenten actividad inhibitoria sobre algunos microorganismos, sugiere la presencia de principios activos de interés farmacológico.

En el cuadro anterior, las soluciones analizadas de las estructuras de *Lupinus montanus* en sus diferentes concentraciones, presentan principios activos que actúan de forma inhibitoria en las siguientes bacterias: *Corynebacterium xerosis* y *Streptococcus B- hemolítico* y en el hongo: *Candida krusei*.

Se puede observar que los extractos con mayor efecto inhibitorio en el desarrollo de los microorganismos se obtienen de la raíz, ya que esta presenta un mayor rango de acción farmacológica respecto de los extractos obtenidos a partir de las otras estructuras.

Las pruebas de sensibilidad resultaron negativas en todos los ensayos para los siguientes microorganismos; Bacterias: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*; Hongos: *Candida albicans*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* y *Geotrichum sp.* Esto se puede deber a diversos factores, entre los que se tienen los siguientes: los principios activos de la planta no son específicos para la inhibición de los microorganismos estudiados; es necesario realizar antibiogramas con dosis más elevadas.

En las siguientes páginas se presentan de manera gráfica los ensayos en los que alguna(s) de las concentraciones presentó efecto inhibitorio en el crecimiento del microorganismo sometido a la prueba de sensibilidad.

Corynebacterium xerosis

En los gráficos 23, 24, 25, 26 y 27., se representan los tamaños promedio de los halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Corynebacterium xerosis* bajo los efectos causados por principios activos presentes en extractos de flor, fruto, hoja, raíz y tallo respectivamente.

Como se puede apreciar en cada una de los gráficos, los extractos vegetales de cada estructura presentaron principios activos de carácter bactericida, mismos que actúan desde la concentración más baja analizada de (30 mg/mL).

A su vez, los mayores halos de inhibición se observan, en todos los casos, bajo la concentración de 120 mg/mL ($p=0.0000$) (apéndice 2., cuadro 1.c.)

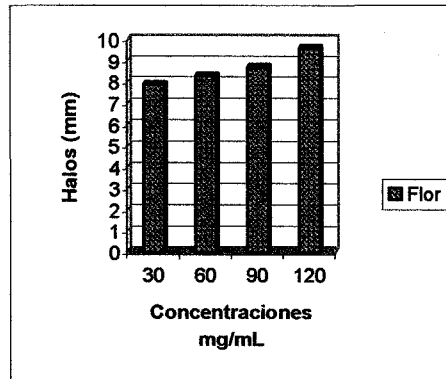


Gráfico 23. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Corynebacterium xerosis* causados por extractos de flor.

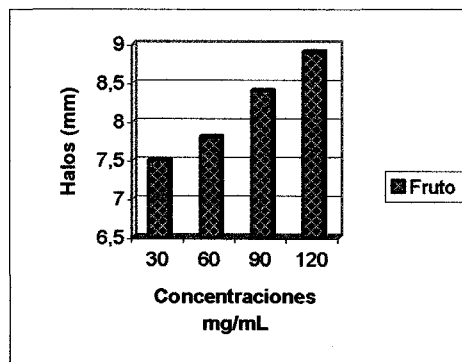


Gráfico 24. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Corynebacterium xerosis* causados por extractos de fruto.

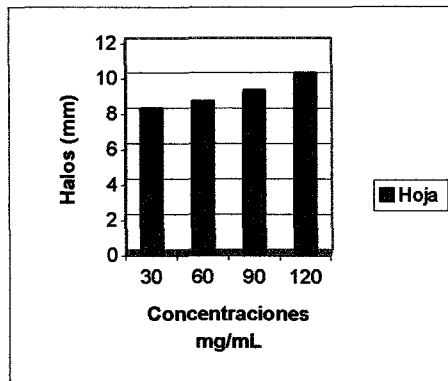


Gráfico 25. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Corynebacterium xerosis* causados por extractos de hoja.

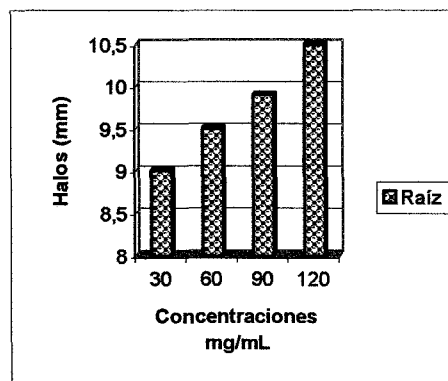


Gráfico 26. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Corynebacterium xerosis* causados por extractos de raíz.

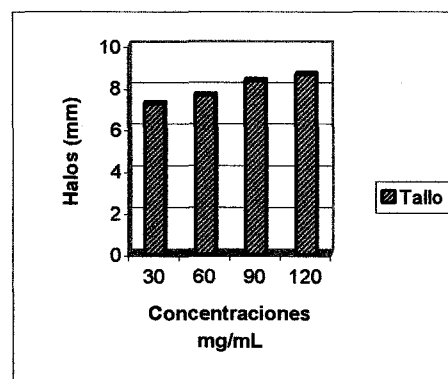


Gráfico 27. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Corynebacterium xerosis* causados por extractos de tallo.

En el gráfico 28, se observan los valores promedio del tamaño de los halos de inhibición obtenidos bajo la interacción de los factores Estructura -Concentración en la prueba de sensibilidad aplicada a *Corynebacterium xerosis* bajo un diseño factorial 4 x 5.

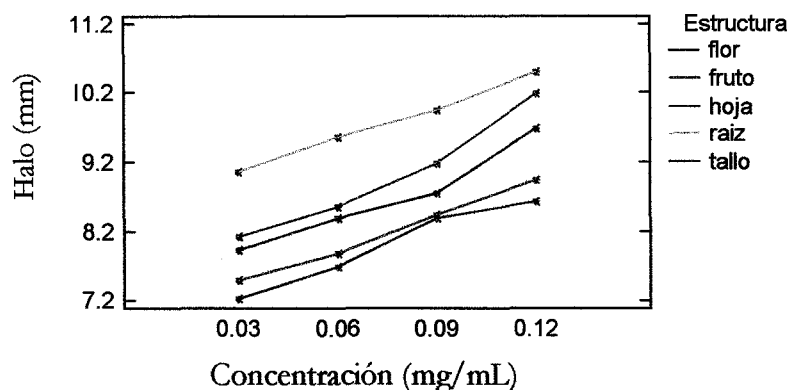


Gráfico 28. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de *Corynebacterium xerosis*.

En este caso se puede apreciar, según se muestra en el gráfico, que los principios activos de todas las estructuras analizadas actúan como antibacterianos desde una concentración de 30 mg/mL. Se puede observar también que el mayor diámetro en los halos de inhibición se logra en todos los casos a una concentración de 120 mg/mL para todas las estructuras estudiadas ($p=0.0000$), sobresaliendo los producidos por raíz y hoja (apéndice 2., cuadro 1.a).

Con base a los análisis de varianza podemos afirmar que a un nivel de confianza del 95 % existe diferencia ($p=0.0000$) entre la capacidad bactericida que tienen los principios activos de las estructuras analizadas (apéndice 2., 1.b), con excepción de la pareja fruto-tallo.

Los mejores resultados se obtuvieron (en todas las concentraciones) a partir de los principios activos de raíz. Se puede afirmar que en este caso, la concentración de 30 mg/mL funciona como la CMI.

La interacción Estructura-Concentración no presentó efectos significativos sobre el tamaño de los halos de inhibición.

***Streptococcus* β -hemolítico**

Los gráficos 29 y 30, muestran el promedio de los tamaños de halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Streptococcus* β -hemolítico con los extractos de flor y raíz respectivamente. En ambos casos, bajo la concentración de 120 mg/mL se obtuvieron los mayores halos de inhibición, esta concentración fue estadísticamente diferente a las otras tres concentraciones ($p=0.0000$), en las cuales se observa una variación mínima (apéndice 2., cuadro 2.c).

Los extractos de las tres estructuras restantes (fruto, hoja y tallo) no presentaron efectos inhibitorios bajo ninguna de sus concentraciones.

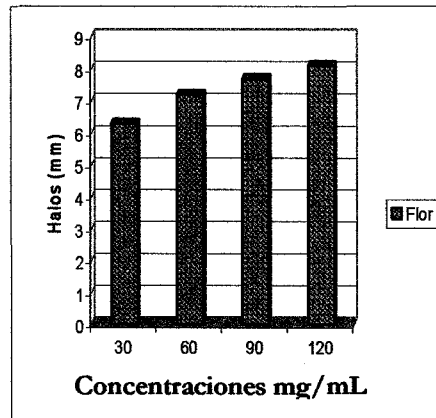


Gráfico 29. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Streptococcus* β -hemolítico causados por extractos de flor.

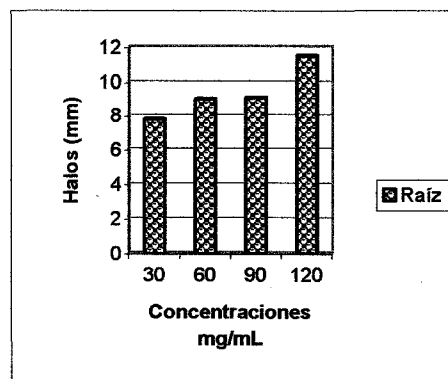


Gráfico 30. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Streptococcus* β -hemolítico causados por extractos de raíz.

En el gráfico 31, se observan los valores promedio del tamaño de los halos de inhibición obtenidos bajo la interacción de los factores Estructura-Concentración en la prueba de sensibilidad aplicada a *Streptococcus β-hemolítico* bajo un diseño factorial 4 x 2.

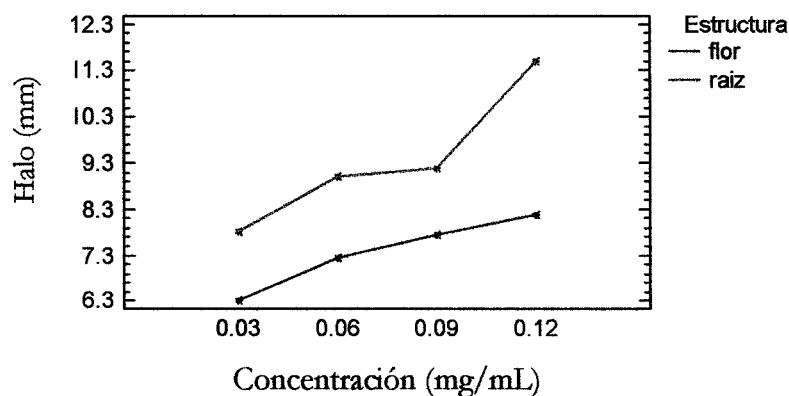


Gráfico 31. Interacción Estructura – Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de *Streptococcus β-hemolítico*.

Los resultados de los ensayos mostraron una diferencia significativa al 95 % de confianza ($p=0.0000$) entre los efectos causados por los extractos de flor y raíz (apéndice 2., cuadros 2.a y 2.b), siendo raíz la estructura que presenta mayor efecto antibacteriano bajo sus cuatro concentraciones en comparación con los resultados obtenidos bajo las cuatro concentraciones de flor, tal y como lo muestra la grafica anterior.

Respecto a la variable **concentración**, se observaron diferencias entre lo efectos causados sobre el tamaño del halo ($p=0.0000$). La prueba de DSM (apéndice 2., 2.b) muestra la diferencia entre los pares 30-90, 30-120, 60-90, 60-120. La Concentración Mínima de Inhibitoria para raíz fue de 30 mg/mL. La interacción Estructura-Concentración no presento efectos significativos sobre el tamaño del halo.

El *Streptococcus β-hemolítico* produce enfermedades como la erisipela, fiebre puerperal e infecciones generalizadas, endocarditis bacteriana y la faringitis (Ross, 1985; Murray y col., 1997), de ahí la importancia de estos resultados.

Candida krusei

En los gráficos 32, 33, 34 y 35, se representan los tamaños promedio de los halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Candida krusei* bajo los efectos causados por principios activos presentes en extractos de fruto, hoja, raíz y tallo respectivamente.

A excepción de los ensayos realizados con los extractos de flor bajo sus diferentes concentraciones, en todos los casos restantes se obtuvo una respuesta positiva, ya que los principios activos de fruto, hoja, raíz y tallo, presentaron actividad antifúngica desde la concentración de 30 mg/mL. A su vez, los mayores halos de inhibición se observan, en todos los casos, bajo la concentración de 120 mg/mL ($p=0.0000$).

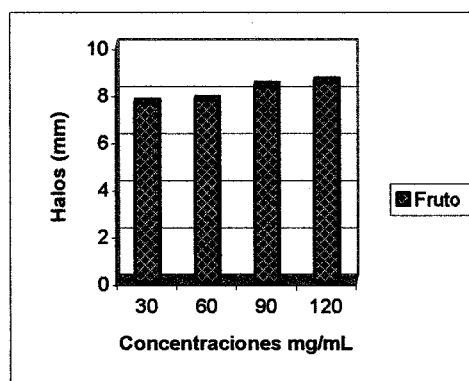


Gráfico 32. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida krusei* causados por extractos de fruto.

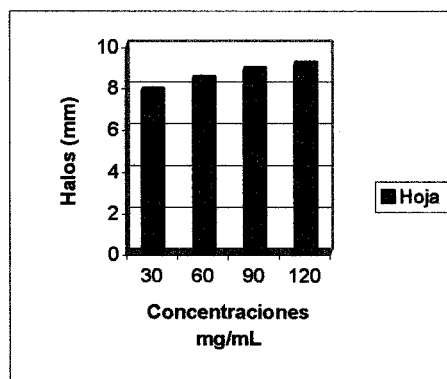


Gráfico 33. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida krusei* causados por extractos de hoja.

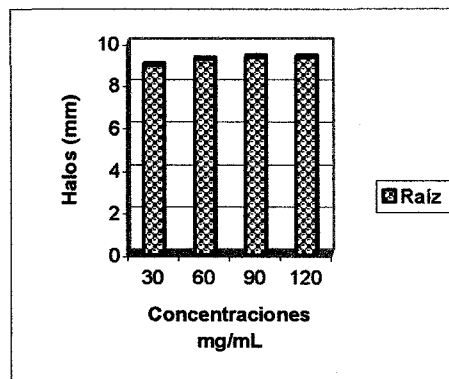


Gráfico 34. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida krusei* causados por extractos de raíz.

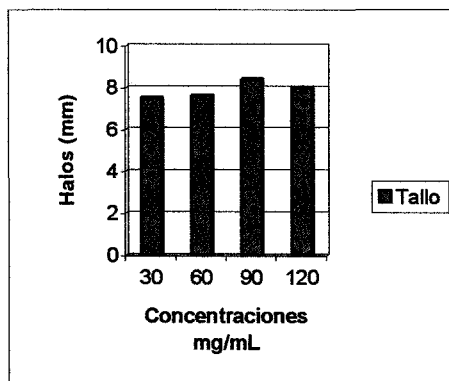


Gráfico 35. Tamaños promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida krusei* causados por extractos de tallo.

Como se puede apreciar en cada una de los gráficos, los extractos vegetales de cada estructura presentaron principios activos de carácter antifúngico, mismos que actúan desde la concentración más baja analizada.

En el gráfico 36, se observan los valores promedio del tamaño de los halos de inhibición obtenidos bajo la interacción de los factores Estructura -Concentración en la prueba de sensibilidad aplicada a *Candida krusei* bajo un diseño factorial 4 x 5.

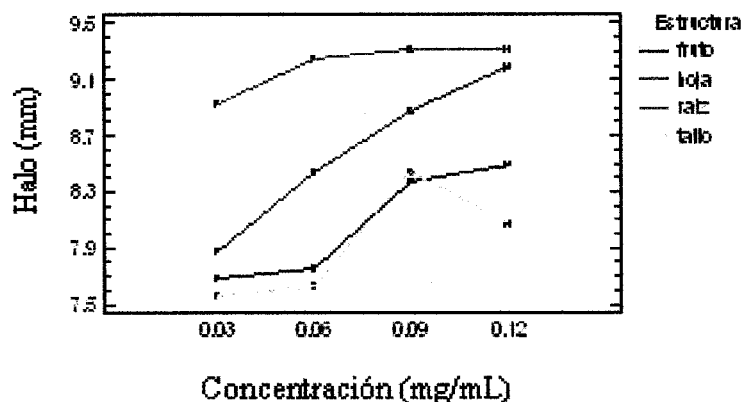


Gráfico 36. Interacción Estructura- Concentración sobre el tamaño promedio de halos de inhibición en cultivos de *Candida krusei*.

Los resultados de los ensayos mostraron una diferencia significativa al 95 % de confianza ($p=0.0000$), entre los efectos causados por los extractos de las estructuras vegetales analizadas (apéndice 2., cuadro 3.a) siendo raíz la estructura que presenta mayor efecto antibacteriano bajo sus cuatro concentraciones en comparación con los resultados obtenidos bajo las cuatro concentraciones de fruto, hoja y tallo, respectivamente (gráfico 35). También existió diferencia significativa entre los efectos causados por las distintas concentraciones ($p=0.0000$), con excepción de las parejas 30-60 y 90- 120 (apéndice 2., cuadro 3.c). La interacción Estructura-Concentración no presenta efectos sobre el tamaño de los halos de inhibición.

La CMI determinada para raíz fue de 30 mg/mL.

Espectros IR de *Lupinus montanus*

Flor

La siguiente imagen representa la composición química de los extractos obtenidos a partir de flor de *Lupinus montanus*, analizada mediante la técnica de la pastilla de bromuro.

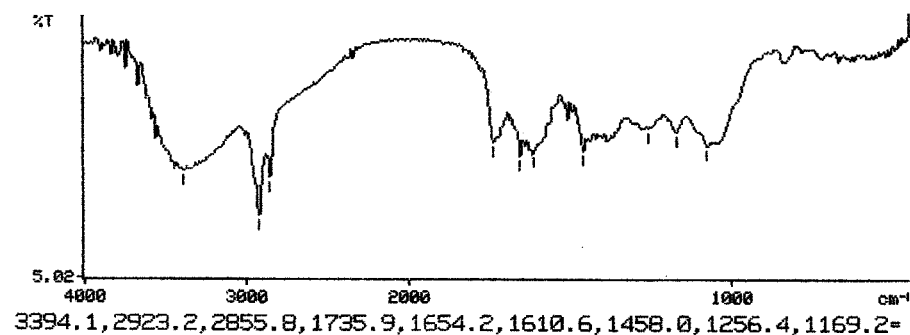


Imagen 9. Espectro Infrarrojo de los extractos de flor (*Lupinus montanus*).

Según la longitud de onda registrada (Ibíd. Pág. 85), la composición química de dicho extracto es la siguiente:

- 3394.1 OH asociado
- 2923.2 alcano
- 2855.8 NH₃, α -aminoácido, OPH asociado
- 1735.9 cetona, α -halógeno
- 1654.2 cetona β -dicetona enolizada:
- 1610.6 cetona, β -dicetona quelada:
- 1458.0 alcano aromático
- 1256.4 alcano, sin valor práctico
- 1169.2 sin valor práctico
- 1073.4 éter o éster

Fruto

En la imagen número 10 se presenta el espectro infrarrojo de la composición química de los extractos obtenidos a partir de fruto de *Lupinus montanus*, analizada mediante la técnica de la pastilla de bromuro.

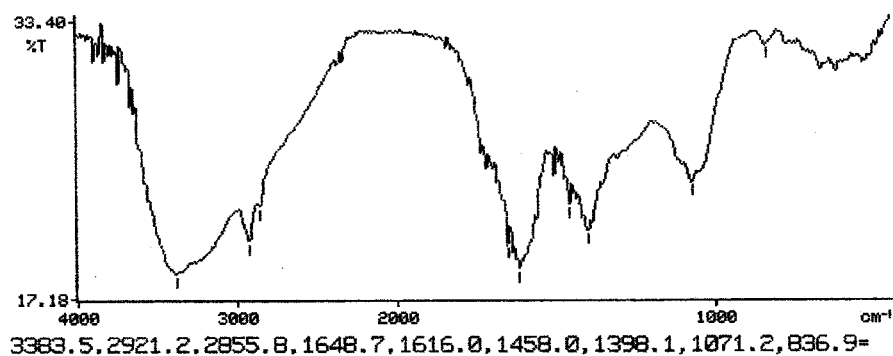


Imagen 10 Espectro Infrarrojo de los extractos de fruto (*Lupinus montanus*)

Según la longitud de onda registrada (Ibíd. Pág. 85), la composición química de dicho extracto es la siguiente:

- 3383.5 amina primaria
- 2921.2 OH asociado, alcano
- 2855.8 NH₃, α -aminoácido
- 1616.0 cetona
- 1458.0 alcano aromático
- 1398,1 sin valor practico
- 1071.2 éter
- 836.9 aromático monosustituido

Hoja

La imagen siguiente corresponde el espectro infrarrojo de la composición química de los extractos obtenidos a partir de hoja de *Lupinus montanus*.

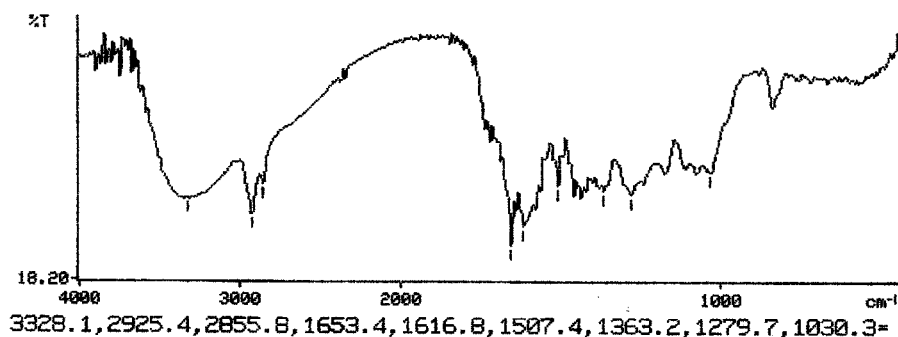


Imagen 11 Espectro Infrarrojo de los extractos de hoja (*Lupinus montanus*)

Según la longitud de onda registrada (Ibíd. Pág. 85), la composición química de dicho extracto es la siguiente:

- 3338.1 amina alifática
- 2925.4 alcano, ácido (OH) alifático C-CH₂-C
- 2855.8 alcano, ácido (OH) alifático C-CH₂-C
- 1653.4 Ester, aromático
- 1616.8 cetona, (C=C alfa, β-insaturada)
- 1507.4 amina, aminoácido
- 1363.2 compuesto con NO₂
- 1279.7 éter aromático
- 1030.3 éter

Raíz

En la imagen número 12 se presenta el espectro infrarrojo de la composición química de los extractos obtenidos a partir de raíz de *Lupinus montanus*.

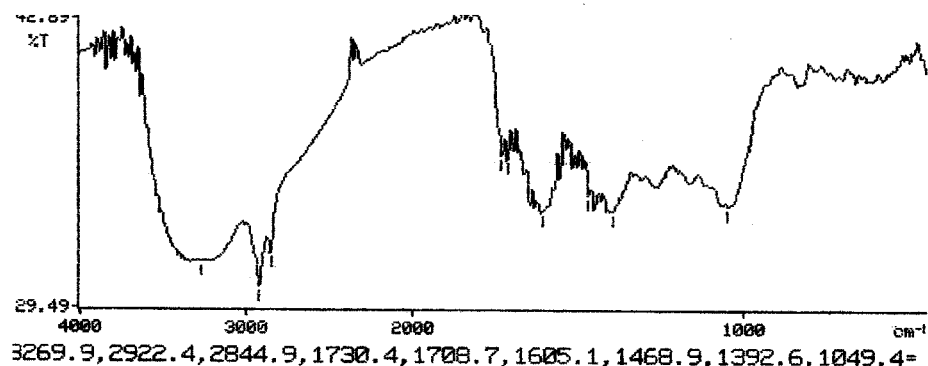


Imagen 12 Espectro Infrarrojo de los extractos de raíz (*Lupinus montanus*)

Según la longitud de onda registrada (Ibíd. Pág. 85), la composición química de dicho extracto es la siguiente:

3269.9 OH (ác. Carboxílico) asociado. Amida secundaria

2922.4 C-CH₂-C

2844.9 alcano (2 bandas)

1730.4 aldehído alifático

1708.7 aldehído aromático cetona cíclica

1605.1 enoles C=C (alqueno), α -amida

1468.9 aromático

1392.6 sin valor práctico, SO₂

1049.4 éter, amina aromática

Compuesto con S, O, S=O

Tallo

El espectro infrarrojo que a continuación se presenta, corresponde a el análisis de IR de los extractos obtenidos a partir de tallo de *Lupinus montanus*, analizada mediante la técnica de la pastilla de bromuro.

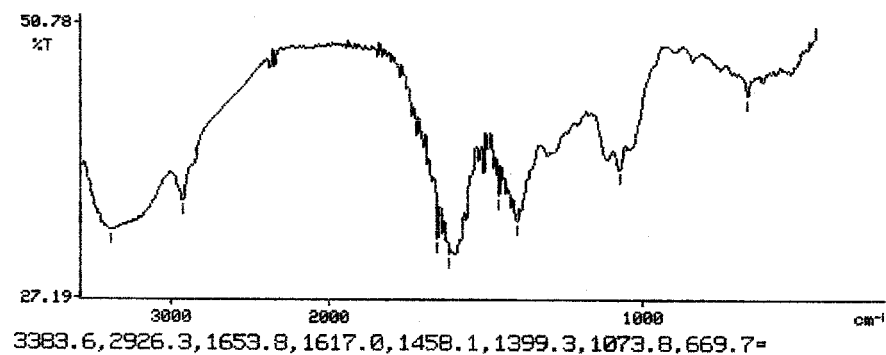


Imagen 13 Espectro Infrarrojo de los extractos de tallo (*Lupinus montanus*)

Según la longitud de onda registrada (Ibíd. Pág. 85), la composición química de dicho extracto es la siguiente:

3383.6 amina primaria

2926.3 alcano, OH asociado;

1653.8 éster, alqueno aromático

1617.0 aromático, cetona

1458.1 alcano, aromático

399.3 sin valor práctico

1073.8 éter, o éster

669.7 sin valor práctico

Al igual que en los análisis espectroscópicos de *Eryngium carlinae*, en *Lupinus montanus* se encontraron diversos grupos funcionales, algunos de ellos precursores de sustancias tales como los alcaloides, de los cuales se sabe; ejercen actividad farmacológica sobre diversos terrenos, entre los cuales se encuentran a las enfermedades causantes por parásitos microbianos (Bruneton, 1993).

Los alcaloides vegetales son un grupo importante de sustancias que pueden representar productos finales del metabolismo nitrogenado de los vegetales superiores. La mayoría de estas sustancias ejercen efectos fisiológicos. Casi todos los alcaloides se pueden relacionar estructuralmente con los aminoácidos, a través de hipotéticas reacciones en las que participan por ejemplo: la mutilación, descarboxilación o reacciones en las que intervienen el formaldehído o los formiatos.

Existe un grupo de alcaloides que se relacionan con la higrina este compuesto es la atropina (éster α -fenilglicólico de la tropina), que es de gran importancia farmacológica.

Por otro lado, se observa en los espectros de raíz, hoja y tallo, la presencia de amidas, las cuales son derivados de un ácido carboxílico por sustitución del grupo —OH del ácido por un grupo —NH_2 , —NHR o $\text{—NRR}'$ (siendo R y R' radicales orgánicos). Formalmente también se pueden considerar derivados del amoníaco, de una amina primaria o de una amina secundaria por sustitución de un hidrógeno por un radical ácido, dando lugar a una amida primaria, secundaria o terciaria, respectivamente. Las amidas también se utilizan mucho en la industria farmacéutica.

En el caso de *Lupinus montanus*, se sabe que las raíces absorben nitrógeno del suelo y atmosférico en forma de nitratos (NO_3^-), debido a la presencia de nódulos fijadores que encierran bacterias del género *Rhizobium* (Rojas, 1980; Deiter, 19809; Devlin, 1982; Salisbury, 2000). Esto incrementa la concentración de sustancias nitrogenadas en la raíz, mismas que pueden ser las causantes del efecto inhibitorio en los antibiogramas realizados.

Dentro del grupo funcional de la cetona, se encuentran ejemplos de principios activos como el alcanfor ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$) obtiene del alcanforero, (*Cinnamomum camphora*), que crece en Asia y en Brasil. Utilizado en medicina, en linimentos y otros preparados debido a sus cualidades antisépticas y anestésicas.

En el caso de los ésteres, algunos de ellos son compuestos que tienen aplicaciones médicas importantes (Evans, 1991). El nitrito de etilo es diurético y antipirético. El nitrito de amilo se usa en el tratamiento del asma bronquial y de las convulsiones epilépticas, y como antiespasmódico. La nitroglicerina y el nitrito de amilo producen la dilatación de los vasos sanguíneos, disminuyendo por tanto la presión sanguínea.

Los alcoholes, aldehídos, ésteres de ácidos carboxílicos y otros compuestos (presentes en los espectros de *Lupinus montanus*) 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 (Mulet, 1997).

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, activado por fosforilación, en forma de isopentenilpirofosfato (isopreno activo) (Allinger, 1988). Dentro de los terpenos con actividad farmacológica, tenemos al β -caroteno y al α -caroteno, los cuales son tetraterpenos que se encuentran en la mayor parte de las estructuras de una planta.

CAPÍTULO XII

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Eryngium carlinae y *Lupinus montanus* crecen (dentro de la zona de recolecta) en suelos del tipo Andisol, compartiendo el nicho ecológico con *Pinus hartwegii* y pastos del género *Muhlenbergia*.

Si bien es cierto que no existen estudios que relacionen el tipo de suelo con la concentración de principios activos en la planta, resulta lógico pensar que las características edafológicas pueden influenciar en la bioquímica vegetal. Esto puede abrir nuevas líneas de investigación, en las cuales se evalué la acción farmacológica de los extractos de estas plantas, cultivadas en distintos tipos de suelo.

Por otro lado, se tiene que el mejor rendimiento obtenido en la relación: estructura vegetal (peso fresco) - extracto (peso seco) para *Eryngium carlinae* fue encontrado en la extracción realizada en hoja (13 %), el menor rendimiento se observó en raíz. Este tipo de información es muy valiosa toda vez 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.

Los extractos vegetales de las estructuras de *Eryngium carlinae* presentaron principios activos con un mayor efecto inhibitorio de tipo fungicida al inhibir el crecimiento de *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* y *Geotrichum sp.*, y sólo presentaron efecto antibacteriano sobre las especies *Mycobacterium phlei* y *Streptococcus β -hemolítico*. Los extractos con un mayor rango en el efecto inhibitorio del desarrollo de los microorganismos se obtienen de la raíz, ya que esta fue eficaz en la inhibición de 2 de las 7 bacterias sometidas a la prueba (*Mycobacterium phlei* y *Streptococcus β -hemolítico*) y 4 de los 6 hongos analizados (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* y *Geotrichum sp.*). En contraste con lo anterior, los extractos obtenidos a partir del tallo, presentaron un menor margen de acción antimicrobiana, ya que sólo fueron efectivos en las pruebas realizadas con la bacteria: *Mycobacterium phlei*, y el hongo: *Candida krusei*.

Dentro de los resultados positivos en las pruebas de sensibilidad para bacterias y hongos, existió diferencia entre los efectos causados por los principios activos de cada estructura vegetal.

Los principios activos de tallo, resultaron ser los de mayor eficacia en la inhibición del crecimiento de *Mycobacterium phlei*.

Por otro lado, los principios activos de raíz actuaron en la inhibición del 100% de los resultados positivos, presentando diferencia (respecto de los principios activos de las demás estructuras) en los hongos: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans* y *Geotrichum sp.* En todos los casos la concentración mínima inhibitoria fue de 30 mg/mL.

En el caso de la bacteria: *Streptococcus β -hemolítico*, y el hongo: *Geotrichum spp.* No hubo diferencia estadística entre los efectos producidos por principios activos de flor-hoja-raíz y flor-raíz, respectivamente, aunque al igual que en los casos anteriores, si hubo diferencia entre los efectos causados por las concentraciones de los principios, siendo en ambos casos de 30 mg/mL.

De acuerdo al rendimiento obtenido en la relación: estructura vegetal (peso fresco)-extracto (peso seco), lo más conveniente sería utilizar los extractos de hoja (13%) para la inhibición de *Streptococcus β -hemolítico* y los de flor (10%) contra *Geotrichum spp.*

Las pruebas de sensibilidad resultaron negativas en todos los ensayos para los siguientes microorganismos; Bacterias: *Corynebacterium xerosis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, Hongos: *Candida stellatoidea* y *Candida tropicalis*.

La hipótesis planteada en principio, no se cumplió, ya que si bien, es en la hoja donde se observa el mejor rendimiento en cuanto a la obtención de extracto vegetal, su efecto antimicrobiano fue menor al obtenido con los extractos de raíz, y sólo en un caso (*Streptococcus β -hemolítico*) presentó resultados similares a los obtenidos con esta última.

Respecto a los resultados obtenidos con *Lupinus montanus*, el mejor rendimiento obtenido en la relación: estructura vegetal (peso fresco) - extracto (peso seco) fue encontrado en la extracción realizada en Flor (27%), el menor rendimiento se obtuvo en tallo (1%). Los extractos vegetales de las estructuras de *Lupinus montanus* presentaron principios activos con un mayor efecto inhibitorio de tipo bactericida al inhibir el crecimiento de *Corynebacterium xerosis* y

Streptococcus β -hemolítico, y sólo presentaron efecto fungicida sobre la especie *Candida krusei*.

Dentro de los ensayos realizados con los extractos obtenidos de Flor, Fruto, Hoja, Raíz y Tallo de *Lupinus montanus*, se determinó que en la relación estructura – concentración – efecto inhibitorio, la estructura que presentó mayor eficiencia fue raíz, la cual resultó ser estadísticamente (con un 95 % de confianza) la más eficaz. Dentro de los resultados positivos en las pruebas de sensibilidad para bacterias, la CMI fue de 30 mg/mL para los extractos de raíz aplicados. Dentro de los resultados positivos en las pruebas de sensibilidad para hongos, la CMI fue de 30 mg/mL para raíz.

Las pruebas de sensibilidad resultaron negativas en todos los ensayos para los siguientes microorganismos; Bacterias: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*; Hongos: *Candida albicans*, *Candida stellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* y *Geotrichum sp.* Esto puede deberse a diversos factores, entre los que tenemos los siguientes: los principios activos de la planta no son específicos para la inhibición de los microorganismos estudiados; es necesario realizar antibiogramas con dosis más elevadas.

La hipótesis planteada en un inicio, fue corroborada, ya que como pudimos apreciar, los extractos vegetales de ciertas estructuras de *Lupinus montanus* presenta principios activos que actúan como antimicrobianos.

Los espectros infrarrojos permiten (tanto en el caso de *Eryngium carlinae* y *Lupinus montanus*) conocer la composición química de los extractos vegetales, a fin de correlacionarlos con los componentes presentes en la planta, y con su posible acción farmacológica, de la cual aún se desconocen muchas cosas, haciendo patente la necesidad de estudios de mayor especificidad.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar A. y Camacho J., 1994., **Herbario medicinal del instituto mexicano del seguro social**, IMSS.

Alfaro T., Chalala M., Rodríguez L., Rodríguez C., Ramos R., Carballo C., Cabezas 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.

Almaguer G., Vargas V., García R., Ruiz B., 2003., **Relación intercultural con la medicina tradicional: manual para el personal de salud**. IMSS.

Allinger N., 1988., **Química orgánica**. 2 vols. Barcelona: Ed. Reverté, 2ª ed.

Argueta V., 1994., **Atlas de las plantas medicinales tradicionales mexicanas**. Instituto Nacional Indigenista, México.

Arthur H. Bryan, Charles A. Bryan y Charles C., 1971., **Bacteriología: principio y practicas**. 6ª Edición. Ed. Continental, México.

Aubert G., 1985., **La edafología: el suelo en el que vivimos**. Barcelona: Ediciones Orbis, Madrid.

Bergoglio R., 1993., **Antibióticos**. 5ª Edición. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Bruneton, J., 1993., **Pharmacognosie. phytochimie, plantes medicinales**. 2ª edición. Technique et Documentation - Lavoisier, París. La 1ª edición está traducida al español: **Elementos de fitoquímica y farmacognosia**, Ed. Acribia, Zaragoza (1991).

Burneo W., Scherp W. y Schuster S., 1986., **Microbiología y enfermedades infecciosas de la boca**. Ed. Limusa, México, D. F.

B. Allen y F. Baker, 1976., **Aislamiento identificación y pruebas de sensibilidad**. Ed. Médica Panamericana, p.65 -80.

Bye R. y Linares E., 1999., **Plantas medicinales prehispánicas**. Arqueología mexicana ,1999.Vol.7/No. 39: 4 – 21.

Cacho J., 1997., **El antibiograma**. *Rev Biomed.*, Vol. 9/No. 3/Jul –Sep, 09:88-92.

Cañigeral S., Vila R. y Wichtl, M. (eds.). 1997., **Plantas Medicinales y drogas vegetales**. OEMF, Milán.

Cañigeral S. y Vila, R., 1998., **Fitoterapia: concepto y límites**. Unidad de Farmacología y Farmacognosia. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona, Madrid, España.

Chapman D. Homer, Pratt F. Parker, 1988., **Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas**. Ed. Trillas. México D. F.

Creswell C., Runquist, O. y Campbell M., 1979., **Análisis Espectral de Compuestos Orgánicos**. Ed. Diana. México.

Cowan M., 1999., **Plant products as antimicrobial agents**. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; 12(4): 564-582.

Deiter H., 1980., **Fisiología vegetal, Fundamentos moleculares y bioquímico-fisiológicos del metabolismo y el desarrollo**. Ediciones Omega. Barcelona. España.

Devlin R., 1982., **Fisiología Vegetal**. 4ª Edición, Ediciones Omega, Barcelona España.

Domínguez A., 1979., **Investigación Fitoquímica**. Ed. Limusa. México, D. F.

Estrada L., 1992., **Plantas Medicinales de México: Introducción a su Estudio**, Universidad Autónoma Chapingo, Unidad de Estudios Etnobotánicos; Departamento de Fitotecnia; centro de agroforestería para el desarrollo sostenible. 4ª Edición. México.

Eroza E., 1996., **Tres procedimientos diagnósticos de la medicina tradicional indígena en Alteridades**. UAM, México.

Evans, W., 1991., **Farmacognosia**. 13ª Ed., Interamericana - Mc. Graw Hill, México.

Fernández M. y Nieto, A., 1982., **Plantas Medicinales**. Ed. Eunsa, Pamplona.

Gallardo A., 1994., **Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana III**. Instituto Nacional Indigenista, México D.F.

González A., González C., Ravelo A., Gutiérrez N., Moujir L., Navarro E. y Boada J., 1988., **Netzahualcoyone, a triterpenquinone, biological Activity** *Rev. Latinoamericana de Química*. 1998, 19(1), 36-38.

González R., Cameros I., 1996., **Microbiología Bucal y Clínica**. Editores Fendez, México, D. F.

Guerra M., Sánchez E. y Gálvez M., 2004., **Actividad antimicrobiana de *Senna alata* L.** *Rev. Cubana Plant Med* 2004; (9):1

Guerrero C., Campos G., y Tobaada J., 1988., **Estudio Químico de *Eupatorium brevipes* y algunas actividades biológicas de la *Brevipenina***. *Rev Latinoamericana de Química*. 1988, 19 (3), 147-149.

Harborne H., 1984., **Phytochemical Methods (A Guide to moderna techniques of plants análisis)** 2ª Edición, Chapman and Hall, New York., p. 1- 36

Hernández L. y Rodríguez M., 2001., **Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba**. *Rev. Cubana Plant Med* 2001; (2):44-7.

IMSS Solidaridad, INI y SSA 1997., **Diagnostico de Salud de los Pueblos Indígenas**, documento mecanoscrito.

Jackson M y Beltrán J., 1964., **Análisis químico de suelos**. Ediciones Omega. Barcelona, España.

James W., 1967., **Introducción a la Fisiología Vegetal**. 6ª edición, Ed. Omega, Barcelona España.

Jiménez C., 1999., **Los medios de cultivo en laboratorio** *Rev Biomed* 1999. Vol. 10/No. 2/Abril-Junio, 1999 10:103-106.

Koneman M. y W. Elmer, 1997., **Diagnostico microbiológico**, 3ª edición, Ed. medica panamericana, México, D.F.

Levine I., 1986., **Espectroscopia molecular**. Ed. AC, Madrid, España.

Loo Y., Sjel P., Thornberry H., Ehrlich J., Mc Guire J., Savage G. y Silvestre J., 1945., **Assay of streptomycin by the paperdisc plate method**, *Jour Bact*, 50: 701-709.

Lozoya X. y Zolla C., 1986., **La Medicina invisible**, ed. Folios Ediciones, tercera ed.

Lozoya X., 1990., **Los señores de las plantas** Consejo Nacional para la Cultura y las Artes CONACULTA, México D. F.

Lozoya X., 1999., **La herbolaria en México** Consejo Nacional para la Cultura y las Artes CONACULTA, México D.

Lozoya X., 1994., **Plantas, medicina y poder. Breve historia de la herbolaria mexicana.** Los libros del consumidor. México.

Manfred H., 1997., **Métodos espectroscópicos en química orgánica.** Ed. Síntesis, Madrid, España.

Martínez M., Molina N., Boucourt E., 1997., **Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba).** *Rev Cubana Plant Med*, ene.-abr. 1997, Vol. 2/No.1:12-14.

Martínez M., Molina N., Boucourt E., 2000., **Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80 % de *Schinus terebinthifolius* raddi (copal).** *Rev Cubana Plant Med*, ene.-abr. 2000, Vol. 5/No. 1:23-25.

Martínez M., 1992., **Las plantas medicinales de México.** 6ª edición, Librería y Ediciones Botas, México, D. F.

Martínez P., 2000., **Plantas medicinales Relato de una posibilidad Confiscada: El estatuto de la flora en la Biomedicina Mexicana.** Serie Antropológica Social Instituto de Antropología e Historia, México, D.F.

Marques de C., 1988., **Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico-Biológicas.** Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria México. D. F.

Mitscher L., Drake S., Gollapudi S. y Okwute S., 1987., **A modern look at folkloric use of anti-infective agentn** *Journal. of Nature.* Prod. 50 (6), 1025-1040.

Montiel A. y Guzmán D., 1997., **Laboratorio de microbiología clínica, diagnóstico de enfermedades infecciosas.** Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Moreno C., 1996., **Edafología y climatología.** Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.

Morcillo R., 1972., **Espectroscopia: estructura y espectros atómicos.** Ed. Alhambra, Madrid, España.

Mouton Ch., Robert J., 1995., **Bacteriología bucodental**. Traducido del Francés por: Pie Juste María. Primera edición. Ed. Masson, Barcelona, España.

Mulet L., 1997., **Principios tóxicos y síntomas de intoxicación**. Castellón: Diputación Provincial, 1997.

Murray R., Kobayashi S., Pfaller A. y Rosenthal S., 1997., **Microbiología médica**, 2ª edición, Ed. Harcourt Brace, España.

Nieva M., Isla M., Cudmani N., Vattuone M., Sampietro A., 2000., **Actividad Antibacteriana de Propóleos Argentinos**. Instituto de Estudios Vegetales. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. *Journal of Ethno pharmacy col*, 2000.

Organización Mundial de la Salud. 1979., **Promoción y Desarrollo de la Medicina Tradicional** *Medicina Tradicional* 1979, Vol.11/No.5 .

Oropeza H., Delgado S., Eguiarte F., Valera V., 2000., **Caracterización morfológica y molecular partiendo de un muestreo poblacional de los *Lupinus* del volcán de la Malinche (Tlaxcala, México)** Instituto de Biología UNAM, Instituto de Ecología México DF.

Pahlow M., 1984., **El gran libro de las plantas medicinales: salud a través de las fuerzas curativas de la naturaleza**. Ed. Everest, Madrid, España.

Parisi Vittorio., 1979., **Biología y ecología del suelo**. Ed. Blume, Barcelona, España.

Peréz A., 2001., **Enciclopedia de las plantas medicinales** Ed. Edimat Libros., Madrid, España.

Pretch J., 1998., **Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos**. Ed. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona , España.

Ramírez R. M., Millán B. Luna, 2003 **Manual de prácticas de microbiología general laboratorio de microbiología experimental**. Facultad de Química, UNAM, México D.F.

Rzedowski, Jerzy y Graciela Calderón de Rzedowski, 2001., **Flora fanerogámica del Valle de México**, Vol.2, CECSA, México.

Rzedowski, Jerzy, 1983., **Vegetación de México** Ed. Limusa. México D.F.

Reyes H, Navarro P, Reyes H., 1998., **Resistencia bacteriana a los antimicrobianos.** *Antib Inf*, 2: 12-19.

Rivero M., Álvarez M., López A., 1997., **Actividad antifúngica *in vitro* del *Pinus caribaea* (pino macho).** *Rev Cubana Plant Med*, ene.-abr. 1997, Vol.2/No.1:25-29.

Roger Y. 1996., **Microbiología.** 2ª Ed. Ed. Reverte, España., p.29 -35.

Rojas N., Matos M., Romeu B., 2004., **Actividad antibacteriana de *Boldoa purpurascens* Cav.** *Rev. Cubana Plant Med*, Mayo-ago. 2004, Vol.9/No.2: 05-09.

Rojas G., 1980., **Fisiología Vegetal Aplicada** 2ª Edición, Ediciones McGraw-Hill de México.

Rombi M., 1991.**Plantas Medicinales** Ed. Romart, Nice.

Ross W. y Peter H., 1985., **Microbiología Bucal y Clínica.** Ed. científica PLM, México, D. F.

Salisbury F. y Ross C., 2000., **Fisiología de las Plantas**, Internacional Thomson Editores. Madrid España.

Sánchez, G. y López M., 2003., **Clasificación y ordenamiento de la vegetación del norte de la sierra nevada, a lo largo de un gradiente latitudinal**, Instituto de Biología UNAM.

Sánchez S., 1980., **La Flora del Valle de México** 6ª Edición. Ed. Herrero.

Sánchez R. e Islas P., 1997., **Breve análisis del Libellus Medicinalibus Indorum Herbis** *Artículos de Historia de la Farmacia*, Junio – Julio 1997, Vol.4/ No. 3: 25 -33.

Sincholle D., Cotta M., Guedon D., Y Coll R., 1987., **Plantas medicinales et décontamination.** *Pharm. Acta Helv.* 1987, 62 (1): 14-18.

Sutton D., W. Fothergill y M. G. Rinaldi (ed.). 1998., **Guía a los hongos clínico- significativos**, 1ª ed. Williams Y Wilkins, Baltimore.

Velasco C. y Tay Z., 1986., **Introducción a la micología Médica.** Editor Francisco Méndez Cervantes, México, DF.

Villalba C., 2000., **La Medicina tradicional en México** (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias) INER, SSA México.

William, A. y Thomson, D., 1980., **Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales** Ed. Blume Milanesado, Barcelona España.

Consulta electrónica.

- **Áreas Naurales Protegidas**
Autor: Erika Domínguez
Fecha de publicación: 16 de Mayo del 2002
Fecha de consulta: 10 de Septiembre del 2004
http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/sinanp.html
<http://www.conanp.gob.mx/>
- **La Herbolaria: mito o realidad**
Autor: Carlos Huerta
Fecha de publicación: 09 de Mayo del 2002
Fecha de consulta: 10 de Septiembre del 2004

http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/indice12.html
- **El antibiograma**
Fecha de publicación: Septiembre del 2002
Fecha de consulta: 25 de Octubre del 2004
http://www.danival.org/notasmicro/medioscult/_madre_medios.html
- **Especies con usos no maderables en bosques de encino, pino y pino-encino en los Estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca.**
Fecha de consulta: 19 de Septiembre del 2004
<http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/>
- **GRAMIT ; una estrategia de interrelación con la medicina tradicional en Veracruz**
Autor: Domingo Velásquez
Fecha de publicación: Septiembre del 2002
Fecha de consulta: 30 de Octubre del 2004
http://www.plantasmedicinales.org/legisl/sept2002/medicina_mexico.htm
- **La lectura interpretativa del antibiograma: Una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina.**
Autor: María del Pilar Crespo
Fecha de publicación: 2002
Fecha de consulta: 15 de Diciembre del 2004

<http://y.colombiamedica.univalle.edu.co/Vol33No4/contenido.htm>

- Los fitofármacos del IMSS
Fecha de publicación: Noviembre del 2001
Fecha de consulta: 25 de Octubre del 2004
<http://www.invdes.com.mx/antiores/Noviembre2001/htm/fito.html>
- Medicinal plants for forest conservation and health care - Non-wood forest products, No. 11. 1997. Roma, FAO.
Fecha de publicación: Septiembre de 1998
Fecha de consulta: 15 de Octubre del 2004
<http://www.fao.org/docrep/x0963s/x0963s0f.htm>
- Parque Nacional Izta –Popo
Fecha de consulta: 10 de Septiembre del 2004
<http://iztapopo.conanp.gob.mx/>
- Relación Intercultural con la Medicina Tradicional: Manual para el personal de salud
Fecha de publicación: Septiembre del 2002
Fecha de consulta: 5 de Noviembre del 2004
http://www.salud.gob.mx/s_archivos/02_manual_medicina_tradicional.doc
- USDA (United States Department of Agricultura)
- Fecha de publicación: Septiembre del 2002
Fecha de consulta: 5 de Noviembre del 2005

Apéndice

Datos estadísticos (*Eryngium carlinae*)

1. *Mycobacterium phlei*

a)

Analysis of Variance for Halo - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: Concentración	26.4446	3	8.81487	9.10	0.0000
B: Estructura	4.53461	3	1.51154	1.56	0.2031
INTERACTIONS					
AB	15.3495	9	1.70549	1.76	0.0837
RESIDUAL	108.514	112	0.968873		
TOTAL (CORRECTED)	154.642	127			

b)

Multifactor ANOVA - Halo

Multiple Range Tests for Halo by Estructura

Method: 95.0 percent LSD

Estructura	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Hoja	32	6.41563	0.174004	X
raiz	32	6.52813	0.174004	XX
flor	32	6.69375	0.174004	XX
tallo	32	6.91563	0.174004	X

Contrast	Difference	+/- Limits
Hoja - flor	-0.278125	0.487574
Hoja - raiz	-0.1125	0.487574
Hoja - tallo	*-0.5	0.487574
flor - raiz	0.165625	0.487574
flor - tallo	-0.221875	0.487574
raiz - tallo	-0.3875	0.487574

c)

Multiple Range Tests for Halo by Concentración

Method: 95.0 percent LSD

Concentración	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0.03	32	6.25938	0.174004	X
0.06	32	6.31562	0.174004	X
0.09	32	6.58125	0.174004	X
0.12	32	7.39688	0.174004	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0.03 - 0.06	-0.05625	0.487574
0.03 - 0.09	-0.321875	0.487574
0.03 - 0.12	*-1.1375	0.487574
0.06 - 0.09	-0.265625	0.487574
0.06 - 0.12	*-1.08125	0.487574
0.09 - 0.12	*-0.815625	0.487574

2. *Streptococcus* β -hemolítico

a)

Analysis of Variance for Halo - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A: Concentración	6.09188	3	2.03063	18.26	0.0000
B: Estructura	0.6325	3	0.210833	1.90	0.1343
INTERACTIONS					
AB	1.33187	9	0.147986	1.33	0.2289
RESIDUAL	12.4525	112	0.111183		
TOTAL (CORRECTED)	20.5067	127			

b)

Multiple Range Tests for Halo by Estructura

Method: 95.0 percent LSD				
Estructura	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Tallo	32	6.17188	0.0589446	X
Hoja	32	6.30938	0.0589446	XX
Raís	32	6.32813	0.0589446	XX
Floz	32	6.35313	0.0589446	X
Contrast			Difference	+/- Limits
Floz - Hoja			0.04375	0.165168
Floz - Raís			0.025	0.165168
Floz - Tallo			*0.18125	0.165168
Hoja - Raís			-0.01875	0.165168
Hoja - Tallo			0.1375	0.165168
Raís - Tallo			0.15625	0.165168

c)

Multiple Range Tests for Halo by Concentración

Method: 95.0 percent LSD				
Concentración	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0.03	32	6.075	0.0589446	X
0.06	32	6.10313	0.0589446	X
0.09	32	6.375	0.0589446	X
0.12	32	6.60938	0.0589446	X
Contrast			Difference	+/- Limits
0.03 - 0.06			-0.028125	0.165168
0.03 - 0.09			*-0.3	0.165168
0.03 - 0.12			*-0.534375	0.165168
0.06 - 0.09			*-0.271875	0.165168
0.06 - 0.12			*-0.50625	0.165168
0.09 - 0.12			*-0.234375	0.165168

3. *Candida albicans*

a)

Analysis of Variance for Halo - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Estructura	11.9825	1	11.9825	45.54	0.0000
B:Concentración	6.13187	3	2.04396	7.82	0.0002
INTERACTIONS					
AB	1.805	3	0.601667	2.30	0.0869
RESIDUAL	14.635	56	0.261339		
TOTAL (CORRECTED)	34.4744	63			

b)

Multiple Range Tests for Halo by Estructura

Method: 95.0 percent LSD					
Estructura	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups	
Flor	32	6.15937	0.0903706	X	
Raíz	32	7.02188	0.0903706	X	
Contrast			Difference	+/- Limits	
Flor - Raíz			*-0.8625	0.256021	

4. *Candida krusei*

a)

Analysis of Variance for Halo - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Concentración	5.34937	3	1.78312	16.40	0.0000
B:Estructura	1.52062	3	0.506875	4.66	0.0042
INTERACTIONS					
AB	2.37	9	0.263333	2.42	0.0150
RESIDUAL	12.18	112	0.10875		

b)

Multifactor ANOVA - Halo

Multiple Range Tests for Halo by Estructura

Method: 95.0 percent LSD

Estructura	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Hoja	32	6.25	0.0582961	X
Tallo	32	6.34687	0.0582961	X
Flor	32	6.33313	0.0582961	X
Raiz	32	6.55	0.0582961	X

Contrast	Difference	+/- Limits
Flor - Hoja	0.103125	0.163351
Flor - Raiz	*-0.196875	0.163351
Flor - Tallo	0.00625	0.163351
Hoja - Raiz	*-0.3	0.163351
Hoja - Tallo	-0.096875	0.163351
Raiz - Tallo	*0.203125	0.163351

c)

Multiple Range Tests for Halo by Concentración

Method: 95.0 percent LSD

Concentración	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0.03	32	6.10313	0.0582961	X
0.06	32	6.3	0.0582961	X
0.09	32	6.43125	0.0582961	X
0.12	32	6.66562	0.0582961	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0.03 - 0.06	*-0.196875	0.163351
0.03 - 0.09	*-0.328125	0.163351
0.03 - 0.12	*-0.5625	0.163351
0.06 - 0.09	-0.13125	0.163351
0.06 - 0.12	*-0.365625	0.163351
0.09 - 0.12	*-0.234375	0.163351

5. *Cryptococcus neoformans*

a)

ANOVA Table for Halo by Concentración

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Between groups	2.70844	3	0.902812	11.44	0.0000
Within groups	2.20875	28	0.0788839		
Total (Corr.)	4.91719	31			

b)

Multiple Range Tests for Halo by Concentración

Method: 95.0 percent Tukey HSD			
Concentración	Count	Mean	Homogeneous Groups
0.03	8	6.0	X
0.06	8	6.0	X
0.09	8	6.25	X
0.12	8	6.7125	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0.03 - 0.06	0.0	0.383499
0.03 - 0.09	-0.25	0.383499
0.03 - 0.12	*-0.7125	0.383499
0.06 - 0.09	-0.25	0.383499
0.06 - 0.12	*-0.7125	0.383499
0.09 - 0.12	*-0.4625	0.383499

6. *Geotrichum spp.*

a)

Analysis of Variance for Halo - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Concentración	6.37688	3	2.12562	12.69	0.0000
B:Estructura	0.140625	1	0.140625	0.84	0.3635
INTERACTIONS					
AB	0.171875	3	0.0572917	0.34	0.7950
RESIDUAL	9.38	56	0.1675		
TOTAL (CORRECTED)	16.0694	63			

b)

Multiple Range Tests for Halo by Estructura

Method: 95.0 percent LSD

Estructura	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
Flor	32	6.33125	0.072349	X
Raiz	32	6.425	0.072349	X
Contrast		Difference		+/- Limits
Flor - Raiz		-0.09375		0.204966

c)

Multiple Range Tests for Halo by Concentración

Method: 95.0 percent LSD

Concentración	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0.03	16	6.09375	0.102317	X
0.06	16	6.09375	0.102317	X
0.09	16	6.46875	0.102317	X
0.12	16	6.85625	0.102317	X
Contrast		Difference		+/- Limits
0.03 - 0.06		0.0		0.289865
0.03 - 0.09		*-0.375		0.289865
0.03 - 0.12		*-0.7625		0.289865
0.06 - 0.09		*-0.375		0.289865
0.06 - 0.12		*-0.7625		0.289865
0.09 - 0.12		*-0.3875		0.289865

Datos estadísticos (*Lupinus montanus*)

1. *Corynebacterium xerosis*

a)

Analysis of Variance for Halo - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Concentración	58.2389	3	19.413	45.93	0.0000
B:Estructura	64.4654	4	16.1164	38.13	0.0000
INTERACTIONS					
AB	2.47381	12	0.20615	0.49	0.9192
RESIDUAL	59.1686	140	0.422633		
TOTAL (CORRECTED)	184.347	159			

b)

Multifactor ANOVA - Halo

Multiple Range Tests for Halo by Estructura

Method: 95.0 percent LSD					
Estructura	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups	
tallo	32	7.97875	0.114923	X	
fruto	32	8.1875	0.114923	X	
flor	32	8.6875	0.114923	X	
hoja	32	9.01563	0.114923	X	
raiz	32	9.76563	0.114923	X	
Contrast			Difference	+/- Limits	
flor - fruto			*0.5	0.321322	
flor - hoja			*-0.328125	0.321322	
flor - raiz			*-1.07813	0.321322	
flor - tallo			*0.70875	0.321322	
fruto - hoja			*-0.828125	0.321322	
fruto - raiz			*-1.57813	0.321322	
fruto - tallo			0.20875	0.321322	
hoja - raiz			*-0.75	0.321322	
hoja - tallo			*1.03688	0.321322	
raiz - tallo			*1.78688	0.321322	

c)

Multiple Range Tests for Halo by Concentración

Method: 95.0 percent LSD				
Concentración	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0.03	40	7.9705	0.10279	X
0.06	40	8.4125	0.10279	X
0.09	40	8.9375	0.10279	X
0.12	40	9.5875	0.10279	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0.03 - 0.06	*-0.442	0.287399
0.03 - 0.09	*-0.967	0.287399
0.03 - 0.12	*-1.617	0.287399
0.06 - 0.09	*-0.525	0.287399
0.06 - 0.12	*-1.175	0.287399
0.09 - 0.12	*-0.65	0.287399

2. Streptococcus β -hemolítico

a)

Analysis of Variance for Halo - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Concentración	63.2168	3	21.0729	64.22	0.0000
B:Estructura	64.0	1	64.0	195.05	0.0000
INTERACTIONS					
AB	9.40625	3	3.13542	9.56	0.0000
RESIDUAL	19.375	56	0.329125		
TOTAL (CORRECTED)	155.0	63			

b)

Multifactor ANOVA - Halo

Multiple Range Tests for Halo by Estructura

Method: 95.0 percent LSD

Estructura	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
flor	32	7.375	0.101262	X
raiz	32	9.375	0.101262	X

Contrast	Difference	+/- Limits
flor - raiz	*-2.0	0.286876

c)

Multiple Range Tests for Halo by Concentración

Method: 95.0 percent LSD

Concentración	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0.03	16	7.0625	0.143205	X
0.06	16	8.125	0.143205	X
0.09	16	8.46875	0.143205	X
0.12	16	9.84375	0.143205	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0.03 - 0.06	*-1.0625	0.405703
0.03 - 0.09	*-1.40625	0.405703
0.03 - 0.12	*-2.78125	0.405703
0.06 - 0.09	-0.34375	0.405703
0.06 - 0.12	*-1.71875	0.405703
0.09 - 0.12	*-1.375	0.405703

3. *Candida krusei*

a)

Analysis of Variance for Halo - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:Estructura	32.1621	3	10.7207	26.41	0.0000
B:Concentración	13.1934	3	4.39779	10.83	0.0000
INTERACTIONS					
AB	3.5957	9	0.399523	0.98	0.4572
RESIDUAL	45.4688	112	0.405971		

b)

Multiple Range Tests for Halo by Estructura

Method: 95.0 percent LSD

Estructura	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
tallo	32	7.92188	0.112635	X
fruto	32	8.07813	0.112635	X
hoja	32	8.59375	0.112635	X
raiz	32	9.20313	0.112635	X

Contrast	Difference	+/- Limits
fruto - hoja	*-0.515625	0.315613
fruto - raiz	*-1.125	0.315613
fruto - tallo	0.15625	0.315613
hoja - raiz	*-0.609375	0.315613
hoja - tallo	*0.671875	0.315613
raiz - tallo	*1.28125	0.315613

c)

Multifactor ANOVA - Halo

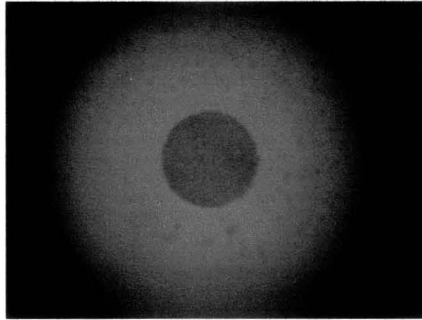
Multiple Range Tests for Halo by Concentración

Method: 95.0 percent LSD

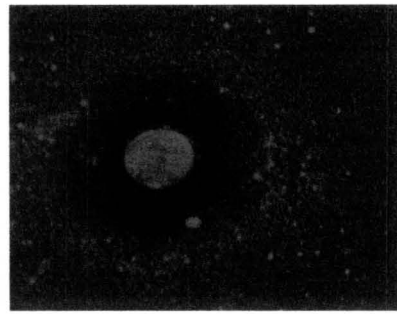
Concentración	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
0.03	32	8.01563	0.112635	X
0.06	32	8.26563	0.112635	X
0.09	32	8.75	0.112635	X
0.12	32	8.76563	0.112635	X

Contrast	Difference	+/- Limits
0.03 - 0.06	-0.25	0.315613
0.03 - 0.09	*-0.734375	0.315613
0.03 - 0.12	*-0.75	0.315613
0.06 - 0.09	*-0.484375	0.315613
0.06 - 0.12	*-0.5	0.315613
0.09 - 0.12	-0.015625	0.315613

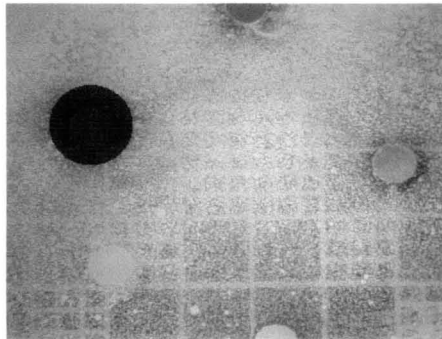
Antibiogramas obtenidos con *Eryngium carlinae*



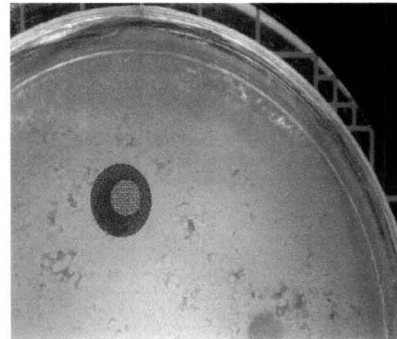
Mycobacterium phlei (raíz)



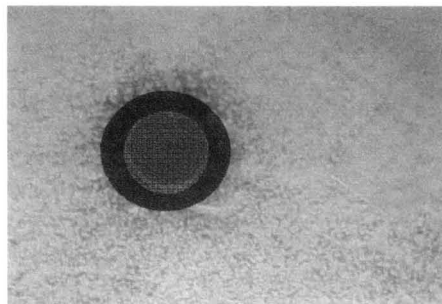
Cryptococcus neoformans (raíz)



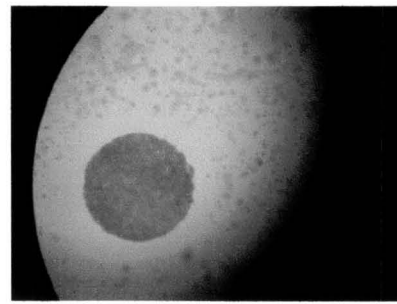
Candida albicans (raíz)



Geotrichum spp. (flor)

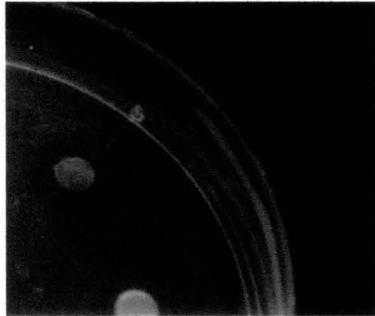


Streptococcus β -hemolítico (raíz)

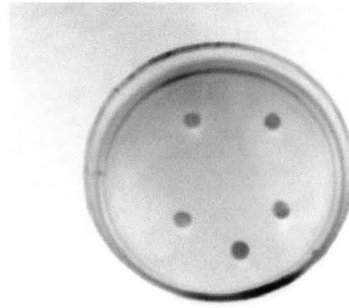


Candida krusei (raíz)

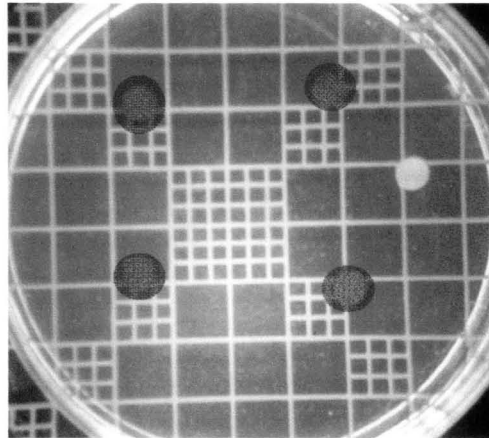
Antibiogramas obtenidos con *Lupinus montanus*



Corynebacterium xerosis
(raíz)



Streptococcus β-hemolítico
(flor)



Candida krusei (raíz)