



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

*EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA Y LA CARACTERIZACIÓN
DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS
Y ACEITES ESENCIALES DE LAS
HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC.*

T E S I S P R O F E S I O N A L
P A R A O B T E N E R E L G R A D O D E
BIÓLOGA

P R E S E N T A :
HERRERA LEÓN BLANCA BERENICE

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LEONORA SANCHEZ GARCIA FIGUEROA



MÉXICO D.F., A 20 DE SEPTIEMBRE DE 2011



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.



DEDICATORIAS.

“Aprende de los fuertes, de los audaces, imita a los violentos, a los enérgicos, a los vencedores, a quienes no aceptan el fracaso, a quienes vencieron a pesar de todo, a los triunfadores. Aprende a nacer del dolor y a ser más grande, que es el más grande de los obstáculos”.

- ♥ Dedico este trabajo especialmente con todo mi amor a mi familia, que son lo que más quiero y que muy a nuestra manera nos queremos.
- ♥ A mi mami, por ser mi amiga, por hacer de mi la mujer que soy, por quererme y apoyarme en todo, pero sobre todo por darme la fuerza y las armas para dirigir mi vida, gracias mamita, te AMO. A mi papá, por ser mi mejor amigo, por creer y confiar en mi, gracias papí, te Amo.
- ♥ A mis hermanos, Gisselle, Jair, Ilse y a Lore, por los buenos y malos momentos que pasamos juntos, porque nos queremos y juntos todo lo podemos. A mi sobrino Marcopolito, por quererme y creer que soy la mejor.
- ♥ A mis queridos viejitos, por su hermoso recuerdo y por amarme tanto.
- ♥ A la familia “Fa León”, porque muy a su manera me quieren, por creer en mi. Especialmente a mi tía Claudia, mi tío Alfredo, a todos mis primos, especialmente a Alfredito, por todo su apoyo.
- ♥ A mi Agrobiólogo, Aarón, por enseñarme el lado bueno de la vida, que con empeño, paciencia y perseverancia se llega a la meta. Por todo tu apoyo y comprensión mi amor, pero sobre todo por creer en mi, te AMO.
- ♥ A Laisita, mi fiel escudera en innumerables noches de estudio.
- ♥ A mis amigas Ale, Claudia, Ivonne y Sandra, por todo lo bueno y malo que pasamos juntas durante toda la carrera, por su cariño, comprensión e incondicional apoyo en varios aspectos de mi vida.
- ♥ A mis amigos Hilda, Jorge, Rafael y Rodolfo por su confianza y apoyo, pero sobre todo por creer en mí.



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Hortensia Rosas Acevedo, al Biól. Juan Romero Arredondo y al DR. Eloy Solano Camacho, ya que con su pasión y dedicación por estudio del reino vegetal, supieron adentrar mis caminos en el.

Al DR. Eloy Solano Camacho, por todo el apoyo y material brindado.

A mi directora de Tesis, la Dra. Leonora Sánchez García Figueroa, por motivarme y sacar lo mejor y oculto que hay en mi, por enfrentarme a mis capacidades y sobre todo por el tiempo invertido en mi.

Agradezco a mis sinodales, a mi directora de Tesis, la Dra. Leonora Sánchez García Figueroa, Quím. Martha Oliveros, M. en C. Arturo Cano, Biól Juan Romero Arredondo por todas las aportaciones para enriquecer este proyecto y especialmente a la Dra. Hortensia Rosas Acevedo, que desde su llegada al laboratorio de Química Vegetal, me brindo su paciencia, apoyo, experiencias, conocimiento, tanto en lo profesional como persona.



	PÁG.
INDICE	
ÍNDICE DE CUADROS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE GRAFICAS.....	ii
1.-RESUMEN.....	1
2.-INTRODUCCIÓN.....	2
3.- PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO	4
4.- METABOLITOS SECUNDARIOS.....	5
5.- PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA.....	9
6.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS EMPLEADAS.....	12
7.- CARACTERÍSTICAS DE <i>Calea urticifolia</i> (Mill.) DC.....	14
8.- HIPÓTESIS.....	25
9.- OBJETIVOS GENERAL.....	25
9.1.-OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
10.-JUSTIFICACIÓN.....	26
11.- MATERIAL Y MÉTODO.....	27
12.- DISEÑO EXPERIMENTAL.....	32
13.- RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	33
14.- CONCLUSIONES.....	61
15.- SUGERENCIAS.....	63
16.- ANEXOS.....	64
17.- BIBLIOGRAFÍA.....	87



INDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁG
1. USOS EN MEDICINA TRADICIONAL DEL género <i>Calea</i>	18
2. PRUEBAS REALIZADAS A <i>Calea urticifolia</i> Mill DC EN DIVERSOS PAÍSES DE LATINOAMÉRICA.	21
3. USOS ETNOBOTÁNICOS DE <i>CALEA URTICIFOLIA</i> MILL DC EN DIVERSOS PAÍSES DE LATINOAMÉRICA.	21
4. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO <i>Calea</i>	64
5. METABOLITOS SECUNDARIOS REPORTADOS EN <i>Calea urticifolia</i> .	22
6. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL EXTRACTO SECO DE LAS HOJAS <i>Calea urticifolia</i> Mill DC.	33
7. COMPONENTES EXTRAÍDOS CON ÉTER ETÍLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> CON EL SISTEMA GASES-MASAS	35
8. COMPONENTES EXTRAÍDOS CON DICLOROMETANO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> CON EL SISTEMA GASES-MASAS	37
9. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS <i>Calea urticifolia</i> Mill DC.	41
10. COMPONENTES EXTRAÍDOS CON PENTANO DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Calea urticifolia</i> DETECTADO POR EL SISTEMA GASES-MASAS	42
11. COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN EL ACEITE ESENCIAL DE ÉTER ETÍLICO DE <i>Calea urticifolia</i> DETECTADO POR EL SISTEMA GASES-MASAS	45
12. METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO METANÓLICO CON EFECTO ANTIMICROBIANO	47
13. RESULTADOS CUANTITATIVOS DE LA PRUEBA DE DIFUSIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE LAS HOJAS <i>Calea urticifolia</i>	48
14. RESULTADOS CUANTITATIVOS DE LA PRUEBA DE DILUCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i>	54
15. ESQUEMA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA ESCALA DE MCFARLAND	86

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁG
1. DISTRIBUCIÓN DE <i>Calea urticifolia</i> (Mill) DC	15
2. <i>Calea urticifolia</i> (Mill) DC.	16
3. ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE <i>Calea</i>	71
4. ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN <i>Calea urticifolia</i>	23
5. CROMATOGRAMA DE MASAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO ETÉREO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC.	36
6. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ALCALOIDE ASPIDOSPERMIDINA-3-CARBOXI-2,3-DIDEHIDRO-1-METIL ÉSTER	38
7. CROMATOGRAMA DE MASAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC.	39
8. ESPECTRO DE MASAS DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC.	40



CONTINUACIÓN.- INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁG
9. CROMATOGRAMA TÍPICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL ACEITE ESENCIAL DE PENTANO.	43
10. CROMATOGRAMA TÍPICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DEL ACEITE ESENCIAL DE ÉTER ETÍLICO.	46

INDICE DE GRAFICAS

GRÁFICA	PÁG
1. INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE <i>Bacillus cereus</i> CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC.	50
2. INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE <i>Bacillus subtilis</i> CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC.	50
3. INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE <i>Escherichia coli</i> CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC	51
4. INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE <i>Staphylococcus aureus</i> CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC	52
5. INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE <i>Staphylococcus epidermis</i> CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC	52
6. INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE <i>Salmonella tiphy</i> CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC	53
7. INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE <i>Shigella flexneri</i> CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC	53
8. EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Bacillus cereus</i> .	56
9. EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>CALEA URTICIFOLIA</i> MILL DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Bacillus subtilis</i>	57
10. EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Escherichia coli</i>	57
11. EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Staphylococcus aureus</i> .	58
12. EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> MILL DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Staphylococcus epidermis</i>	59
13. EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Salmonella tiphy</i> .	59
14. EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Calea urticifolia</i> Mill DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>Shigella flexneri</i>	60

1.- RESUMEN.

El género *Calea* se distribuye en México, Centro y Sudamérica, esta integrado por aproximadamente 110 especies, de las cuales 37 se tienen investigadas químicamente. Se ha analizado la composición química de los extractos de éter etílico y de petróleo, cloroformo, etanólico y acetónicos de ejemplares de *Calea urticifolia* colectados en Veracruz, Guatemala, Honduras y El Salvador, proporcionando así la identificación de metabolitos secundarios, dentro de los cuales se encuentran germacranólidos, heliangólidos, derivados de isoeugenol y de floroglucinol.

Calea urticifolia es utilizada ampliamente en la medicina tradicional mexicana. En Oaxaca, es conocida como hierba amarga, del coyote, garañona y coyote amargo, en otras partes de la república es conocida como chichiquizo o maticucuyuchi o hierba del perro, hoja amarga y la prodigiosa. En el Distrito Federal, es comercializada en el mercado de Sonora con el nombre de hierba amarga, del perro o prodigiosa.

En este trabajo se determinó la actividad bactericida de los extractos hexánico y metanólico de las hojas de *Calea urticifolia* sobre bacterias patógenas al hombre, con el fin de evaluar si los metabolitos secundarios presentes en *Calea urticifolia* poseen potencial antimicrobiano. La acción antibacteriana se probó en las siguientes cepas: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*, evaluándose concentraciones de 10000, 1000 y 100 µg/mL en pruebas de difusión y 30000, 3000, 300 µg/mL en pruebas de dilución.

Los extractos hexánico y metanólico inhibieron el crecimiento de cada una de las bacterias empleadas. La actividad antibacteriana para la prueba de difusión, frente al extracto hexánico fue activa, pero la concentración a la que fueron sensibles cada una de las bacterias fue variable, por ejemplo 10000 µg/mL, para *B.subtilis*, *S.aureus*, *S.epidermis*, *Salmonella tiphy*. Para *B. cereus*, 1000 µg/mL y para *Shigella flexneri*, 100 µg/mL, en dichas cepas bacterianas se presentó el efecto Eagle. Para el extracto metanólico, cada una de las cepas fue sensible a la concentración de 10000 µg/mL, pero en este caso, el cloramfenicol es igual o tiene mayor eficacia que dicho extracto. Para la prueba de dilución, el extracto hexánico fue activo en la concentración de 10000 µg/mL para las siete cepas empleadas, 1000 µg/mL para *S.aureus*, *S.epidermis*, *Salmonella tiphy* y *Shigella flexneri*, 100 µg/mL para *Salmonella tiphy*. El extracto metanólico, fue activo en sus tres concentraciones excepto para *S. aureus* y *S. epidermis*.

2.- INTRODUCCIÓN.

Todos los organismos vivos poseen rutas o caminos metabólicos similares por los cuales sintetizan y utilizan sustancias químicas como: azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos y los polímeros derivados de ellos, a lo cual se le conoce como metabolismo primario. Estas sustancias son esenciales para la supervivencia y bienestar del organismo. En comparación con los derivados del metabolismo primario, un conjunto de sustancias en el reino vegetal, tales como fenoles, poliacetilenos, terpenos, etc, se les encuentra esporádicamente. Estas sustancias parecen no tener algún papel explícito en el organismo que las produce y por tanto son comúnmente conocidos como metabolitos secundarios (Bermúdez *et al.*, 2005).

El interés para estudiar los productos naturales de origen vegetal fue, por mucho tiempo, la utilización de estos en la medicina. Los pueblos primitivos han venido adquiriendo información sobre las propiedades medicinales de gran número de plantas propias de su ambiente (Domínguez, 1979). La historia y el uso de las plantas medicinales es antiquísimo, ya se sabía de sus propiedades a través de las materias médicas de la antigua civilización egipcia y su experiencia en las ciencias del curar. Hace miles de años que se utilizan remedios naturales, elaborados a partir de experimentos de Pitágoras, Galeno e Hipócrates y de las observaciones de médicos y herboristas (Martínez *et al.*, 2006). Dichos conocimientos, generalmente los han acumulado determinados individuos (sacerdotes, hechiceros, curanderos, entre otros), quienes lo han transmitido de generación en generación a sus descendientes (Domínguez, 1979). Esta experiencia les permitió comprobar, en el caso del uso de los vegetales, sus propiedades curativas. A partir de este momento se inició el conocimiento empírico de la medicina alternativa, también llamada medicina tradicional, que expresa las creencias, actitudes y acciones que la sociedad tiene sobre el proceso salud-enfermedad, reflejo de su organización social, económica, familiar y educativa, que conforman su mundo cultural y religioso (Hutterer, 2000).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud (Bermúdez *et al.*, 2005). Es también frecuente encontrar en estas prescripciones, extractos crudos de plantas, aunque se usan con menor frecuencia (Lock, 1994).

De acuerdo a la OMS, una planta medicinal es cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Bermúdez *et al.*, 2005). Para Kuklinski (2000), una planta medicinal, es cualquier vegetal que contenga en sus órganos alguna sustancia con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos, o que se pueda reemplazar como prototipo para obtener nuevos fármacos por síntesis o hemisíntesis.

Aunque en México las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos, tanto en el medio rural como suburbano, su mal manejo ha ocasionado una pérdida importante del conocimiento tradicional sobre su utilización. Aunado a ello, muchas de las especies vegetales han disminuido debido a la degradación de los bosques y su conversión a bosques secundarios y campos agrícola, en consecuencia, la cadena de transmisión de dicho conocimiento se encuentra en riesgo. Es necesario hacer esfuerzos para evitar la pérdida definitiva del conocimiento tradicional sobre plantas medicinales, no sólo para preservar esta herencia cultural, sino también para registrar la información sobre ciertas especies útiles, que podrían ser relevantes para el desarrollo de nuevas fuentes de medicamentos y de otros beneficios para la humanidad, contribuyendo, al mismo tiempo, a proteger la biodiversidad (Bermúdez *et al.*, 2005).

La investigación sobre el uso de plantas medicinales forma parte de la etnobotánica, disciplina interpretativa y asociativa que estudia, utiliza, integra e interpreta las relaciones entre las sociedades humanas y las plantas, con el fin de comprender y explicar la evolución de las civilizaciones. Además, debe identificar los vegetales valiosos para una cultura, descubrir cómo la gente las clasifica, identifica y se relaciona con ellas. La etnobotánica por su naturaleza interdisciplinaria abarca muchas áreas, incluyendo: botánica, química, medicina, farmacología, toxicología, nutrición, agronomía, ecología, sociología, antropología, lingüística, historia y arqueología, entre otras; lo cual permite un amplio rango de enfoques y aplicaciones (Luna, 2002)

Sin embargo, es necesario aplicar el método científico de manera interdisciplinaria para el estudio de las plantas, que actualmente se están utilizando como medicinales. En nuestro país existe una gran diversidad de especies vegetales de origen tropical, de las cuales unas cinco mil plantas son usadas como medicinales, y dada la diversidad podrían llegar a ser hasta veinte mil. A pesar de la riqueza y la variedad de la flora medicinal, el porcentaje de las especies que han sido estudiadas fitoquímica y farmacológicamente es muy escaso (Osuna *et al.*, 2005). Por lo tanto, en este trabajo se identificó químicamente los metabolitos secundarios del extracto metanólico y los aceites esenciales de *Calea urticifolia*, colectada en Oaxaca, municipio de Putla. Así mismo se evaluó la actividad antibacteriana de dicha especie.

MARCO TEÓRICO.

3.- PLANTAS MEDICINALES EN MÉXICO.

Nuestro país, cuenta con la mayor diversidad de especies vegetales (Rzedowski, 1983). Su flora fanerogámica es de aproximadamente 220 familias, con 2 410 géneros y 30 000 especies, dentro de las cuales 3 352 especies son conocidas como medicinales (Lock, 1994). Sumada a dicha diversidad, no deja de persistir en la sociedad, un conocimiento tradicional en sus diversas regiones geográficas que lo integran.

Actualmente para México, se tienen reportadas aproximadamente 5000 plantas medicinales, de las cuales el 25% son nativas de nuestro país, pero solamente el 16 % de esas especies nativas han sido estudiadas por farmacólogos, el resto no cuenta con estudios químicos o farmacológicos que avalen las propiedades que se les atribuyen en la medicina tradicional (Cebrian *et al.*, 2002).

Se estima que unos 120 productos farmacéuticos con principios activos derivan directamente de las plantas medicinales (Mannfried, 2002). Es también frecuente encontrar en estas prescripciones, extractos crudos de plantas, aunque se usan con menor frecuencia (Lock, 1994).

La importancia de las plantas medicinales radica, en que se pueden emplear en situaciones en que las enfermedades no representan ningún problema mayor para la salud. Hay quienes las usan cuando el medicamento que les prescribió el doctor no dió resultado, otras más, para controlar los efectos secundarios producidos por los medicamentos farmacéuticos, hecho que cada día se generaliza más (Linares *et al.*, 1993).

Un núcleo muy variado de la población mexicana usa sólo plantas medicinales y remedios caseros por no tener recursos ni la posibilidad de acceso a la medicina institucional. El uso de las plantas medicinales hoy en día, es una alternativa para curar enfermedades, aunque en algunas ocasiones, ciertas especies tienen mayor eficacia que los medicamentos de patente (Linares *et al.*, 1993). Su uso presenta las siguientes ventajas.

- Ejercen sobre el organismo una acción global más efectiva que los medicamentos debido a la interacción entre sus diferentes principios activos.
- Ciertas especies vegetales, al ser probadas durante milenios, se espera que sus principios activos sean menos severos, que el obtenido con determinadas medicinas.
- Como la acción en el metabolismo de sus principios activos es más duradera, los tratamientos pueden prologarse durante grandes períodos.
- Son capaces de curar las enfermedades ocultas y las manifestadas debido a las múltiples propiedades de sus metabolitos secundarios

- Son una alternativa como complemento con medicamentos convencionales (Cebrian *et al.*, 2002).

4.- METABOLITOS SECUNDARIOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES.

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos que cumplen con funciones no esenciales en el crecimiento de la planta, de forma que su ausencia no la afecta, ya que no intervienen en el metabolismo primario, es decir su crecimiento y desarrollo (Kuklinski, 2000).

Las características generales de los metabolitos secundarios son las siguientes:

- No tener funciones metabólicas directas aparentes en el desarrollo vegetativo de la planta
- Ser importantes para la supervivencia e interacción de las plantas con su entorno
- Presentar diferente distribución en el reino vegetal (Lock, 1994).

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en tres grandes grupos, con base a sus orígenes biosintéticos como los terpenoides, compuestos fenólicos y alcaloides (Kuklinski, 2000).

Para Tyler (1979), los metabolitos secundarios tienen gran importancia biológica ya que participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, atraen polinizadores y dispersores de semillas y frutos; protegen a las plantas de los herbívoros, virus, hongos y bacterias. Según Domingo y López Brea (2003) y Sepúlveda *et al.* (2003), las plantas producen más de 100 000 metabolitos secundarios, de los cuales sólo se conoce la estructura química de aproximadamente 20,000.

Según Domingo y López Brea (2003), los aceites esenciales son compuestos causantes del agradable olor de las plantas, debido a su rápida volatilidad, se les conoce como aceites volátiles, etéreos o esenciales. Por lo general, los aceites esenciales cuando son frescos son incoloros. Éstos se encuentran presentes en las coníferas, rutáceas, umbelíferas, mirtáceas y labiadas. Actúan como repelentes de insectos, previniendo la destrucción de las flores y hojas, o por el contrario, sirven para atraer polinizadores (Tyler *et al* 1979).

Algunos tienen actividad antimicrobiana, como el mentol obtenido de la menta (*Menta piperita*) y la capsaicina de los chiles (*Capsicum annuum*). Pino (*et al.*, 2006) y sus colaboradores, encontraron un alto contenido de carvona en *Lippia alba* (Mill.) y lo reportan como un buen

antibacteriano. Por las propiedades aromáticas de los aceites se utilizan en la industria alimentaria, perfumería y en la elaboración de productos de limpieza, además cuentan con aplicaciones farmacológicas como antisépticos, desodorantes, analgésicos, insecticidas y repelentes artificiales (Kuklinski, 2000).

ALCALOIDES.

Los alcaloides tienen propiedades básicas debido a que son sustancias básicas que contienen uno o más átomos de nitrógeno (Ramos *et al.*, 1998). Se encuentran en las semillas, raíces, cortezas y hojas; libres en forma de glicósidos, formando N-óxidos o combinados constituyendo sales con ácidos orgánicos. En 1970 se registraban alrededor de 5000 alcaloides aislados de aproximadamente 40 familias de plantas, principalmente de Apocynaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Solanaceae, Rutaceae y Rubiaceae, para 1990 su número se elevó a 7 000 aproximadamente (Lock, 1994). Entre los alcaloides ampliamente utilizados en medicina están la morfina como anésteico y la quinina para combatir el paludismo (Kuklinski, 2000). Roberst (*et al.*, 1998), y su equipo reportan que la voacamina es un buen antibacteriano.

CUMARINAS.

Según Meyers, (1974), las benzo-2 pironas, son comúnmente conocidas como cumarinas, entre las cuales se encuentra el principal constituyente del aroma dulce del clavel blanco. Se encuentran en raíces, tallos, hojas y frutos de leguminosas, rubiáceas, asteráceas, especialmente en umbelíferas y rutáceas; además de ciertos hongos, por ejemplo, las aflatoxinas del género *Aspergillus*, destacan por ser altamente tóxicas (Domingo y López Brea, 2003; Domínguez, 1979). Algunas de las cumarinas tienen actividad biológica como anticoagulantes, antibacteriales, antimicóticas, antibióticas, insecticidas; también son utilizadas como saborizantes y en perfumería le dan color a las esencias (Kuklinski, 2000; Domingo y López Brea, 2003) Rahmann y sus colaboradores (*et al.*, 2005), evaluaron la umbelliprenina, cumarina presente en *Angelica sylvestris* (*Apiaceae*), obteniendo muy buenos resultados sobre bacterias Gram negativas.

FENOLES.

De acuerdo con Kuklinski (2000), los fenoles son compuestos derivados del benceno. Algunos ejemplos de éstos son el catecol, pirogalol, los ácidos cinámicos y caféico. Son empleados en la fabricación de fármacos, actúan como desinfectantes, antisépticos, insecticidas, herbicidas y en la elaboración de aromatizantes. Plaus (*et al.*, 2001) y su equipo, demostraron que el carvacrol, tiene mostró diferentes grados de sensibilidad frente a bacterias Gram positivas y negativas.

FLAVONOIDES.

Para Domínguez (1979), los flavonoides son los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos en la naturaleza. Contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema C6-C3-C6, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos, que pueden o no, formar un tercer anillo, llamado C. Suelen encontrarse bajo la forma de glicósidos, con una o tres unidades de azúcar, los más comunes son la glucosa, galactosa, xilosa y arabinosa; es frecuente que diferentes azúcares se hallen unidos a una misma aglicona y en diferentes posiciones lo que diversifica el número de glicósidos conocidos (Kuklinski, 2000).

Los flavonoides son las responsables de las diferentes coloraciones de las flores, para atracción de polinizadores y están ampliamente distribuidas en las angiospermas. Se encuentran en las hojas, flores y frutos. Se emplean en la industria como colorantes para teñir lana, en la conservación de grasas o jugos de frutas debido a las propiedades antioxidantes de algunas polihidroxi flavonas y como edulcorantes. Entre otras aplicaciones farmacológicas, se utilizan como dilatadores de las coronarias, igualmente como insecticidas, antibacterianos, antivíricos y antifúngicos (Kuklinski, 2000). Flavonoides como apigenina, genkwanina, 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, rhamnocitrina, kaemferol de *Combretum erythrophyllum*, mostraron que tienen una buena actividad antibacteriana sobre diversas bacterias (Martini *et al.*, 2004).

LACTONAS SESQUITERPÉNICAS.

Las lactonas sesquiterpénicas son productos naturales, predominantes en la familia Asteraceae, aunque también se encuentran en umbelíferas, magnoliáceas y lauráceas, pueden llegar a ser muy tóxicas (Ramos *et al.*, 1998). Su presencia en determinados grupos de vegetales, permite su aplicación para resolver problemas taxonómicos. Son sustancias amargas que se encuentran en concentraciones que varían entre 0.01 y 8 % del peso seco, con una mayor concentración en las hojas. Presentan una gran importancia biológica, ya que han demostrado acción citotóxica, analgésica, inhibidoras del crecimiento de bacterias, entre otros usos. Estos compuestos lactónicos son primariamente clasificados con base en su esqueleto carboxílico como germacranólidos, guaianólidos, eudesmanólidos y pseudoguaianólidos, entre otros (el sufijo olido se refiere a la función lactona) (Domingo y López Brea, 2003). A partir del extracto hexánico del alga de agua dulce *Vaucheria sessilis*, Pérez y colaboradores (*et al.*, 2009), aislaron una lactona sesquiterpenica, la 10 β -Hidroxi-11 β H-guai-12,6 α -olido. El compuesto aislado inhibe el crecimiento de *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

QUINONAS.

Según Domínguez (1979), las quinonas naturales son un grupo de compuestos cuya coloración varía del amarillo pálido hasta casi negro. Se encuentran en las ramnáceas, leguminosas, ericáceas, euforbiáceas, escrofulariáceas y rubiáceas. Son frecuentes en las cortezas, tallos y raíces y en algunos casos en las hojas, donde su color está enmascarado por otros pigmentos. Además, se presentan en hongos, entre ellos, el cornezuelo del centeno y algunos líquenes (Kuklinski, 2000).

Son causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas (Domingo, 2003). Éstas han sido reconocidas desde la antigüedad por sus propiedades: tintóreas, por su efecto colagogo, ya que favorecen la salida de bilis de la vesícula biliar y a dosis elevadas tienen un acción purgante, además de su actividad bactericida (Kuklinski, 2000). La fumigatina (3-hidroxi, 4metoxi, 2:5-toluquinona), producida por *Aspergillus futnifatis*, posee una capacidad definida para inhibir la multiplicación de varias bacterias Gram positivas (Armstrong *et al.*, 1943).

SAPONINAS.

Lock (1994), indica que las saponinas son pigmentos fenólicos amarillos, además de ser un grupo de glucósidos que se hallan de manera particular en la saponaria, de la cual toman su nombre. Se encuentran tanto en algas y líquenes, como en vegetales primitivos como musgos y helechos y plantas con semilla. En dicotiledóneas hay principalmente saponinas triterpénicas y en monocotiledóneas, rara vez se encuentran saponinas esteroídicas. Se utilizan como expectorantes, diuréticas y además tienen actividad antiprotozoaria. La saponina 28-O-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-galactopiranosil]-éster, aislada de los tallos de *Lactuca scariola*, es un buen antibacteriano (Yadava R.N. y Jharbade J, 2008).

El interés creciente de estos compuestos se debe a su actividad farmacológica como agentes espumantes y emulgentes. Las saponinas esteroídales se utilizan sobre todo industrialmente para obtener las agliconas esteroídales, que son los precursores para la síntesis de fármacos esteroídeos como hormonas sexuales y glucocorticoides, entre otros (Kuklinski, 2000).

La utilización de los metabolitos secundarios obtenidos a partir de las plantas medicinales en el tratamiento de diferentes enfermedades, constituye hoy en día, un reto en la medicina y es una alternativa, en aquellos malestares donde la medicina institucional no tiene el tratamiento adecuado (Domingo y López Brea, 2003). La ciencia moderna esta analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, para precisar, comparar y clasificar sus diversas propiedades.

En este contexto, es importante aislar, purificar y establecer la estructura química de los principios activos relacionados con el alivio o cura de enfermedades, y posteriormente producirlos de manera sintética y ya modificados químicamente aumentar su efectividad y ponerlos al servicio de la humanidad. Los estudios químicos de estos productos naturales, deber realizarse de manera multidisciplinaria con la intervención de biólogos, químicos, farmacólogos, farmacognostas, entre otros (Lock, 1994).

5.- PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

A través del tiempo, la valoración de los antibióticos se ha realizado mediante el uso de pruebas de sensibilidad antimicrobiana, por difusión en disco o por dilución líquida. Estas pruebas sirven para medir la inhibición del crecimiento de un microorganismo (Bauer, 1986). Gamazo *et al.*, (2008), considera que existen un gran número de agentes antibacterianos susceptibles para ser empleados en estas pruebas. Pero como no todas las bacterias tienen la misma sensibilidad a los distintos antibióticos, es importante realizar diferentes determinaciones y así mismo, buscar nuevos compuestos naturales que puedan proporcionar alguna alternativa en los casos donde el tratamiento con los fármacos origina resistencia bacteriana.

TIPOS DE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA O VALORACIÓN MICROBIOLÓGICA.

DIFUSIÓN EN AGAR (TÉCNICA DE KIRBY & BAUER).

El método de Kirby-Bauer, tiene la ventaja que normaliza la mayoría de factores que intervienen en el tamaño de la zona de inhibición, exceptuando la susceptibilidad antimicrobiana. Estos factores son el tamaño del inóculo, pH del medio, profundidad del medio, concentración del agar, velocidad de difusión de la droga, concentración del antibiótico de los discos impregnados e incubación (Bauer, 1986).

El principio de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana por difusión en disco, radica en que al poner en contacto el disco previamente impregnado con el antibiótico sobre la superficie húmeda del agar inoculada con un agente microbiano, el cual se difunde en el medio que rodea un disco impregnado, el agua se absorbe en el papel filtro y el antibiótico se difunde en el medio (Koneman *et al.*, 1999). Al medir la inhibición del crecimiento de un microorganismo en la superficie de una

placa de agar, el tamaño de la zona de inhibición de una cepa bacteriana determinada, es inversamente proporcional a la concentración mínima de un antibiótico dado, como se determina por la prueba de difusión cuando las condiciones de la prueba son constantes (Bauer, 1986). El diámetro de inhibición se relaciona con una concentración inhibitoria y se extrapola de manera cualitativa, lo que permite establecer una relación entre el tamaño del diámetro y el nivel de susceptibilidad al antibiótico, interpretando sus resultados como sensible, intermedio o resistente. Para que se considere como un halo de inhibición debe ser mayor a 6 mm. En ésta técnica, el inóculo bacteriano es llevado a una concentración igual a la del estándar 0,5 de Mc Farland. (Herrera, 2004).

La prueba de Kirby-Bauer o de difusión en disco no debe utilizarse para bacterias de crecimientos lentos o anaerobios (Crespo, 2005). Son varios los factores que afectan al tamaño del halo de inhibición, como son: la carga de antibiótico en los discos, la difusión del antibióticos en el medio de cultivo, la velocidad del crecimiento bacteriano y el tiempo de incubación (Gamazo *et al*, 2008).

De acuerdo con Herrera (2004), la técnica de difusión en agar, presenta varias ventajas como:

- a. Es fácil de efectuar y de gran reproducibilidad
- b. Bajo precio
- c. No requiere equipo especial
- d. Sus resultados son fácilmente interpretados por los clínicos
- e. Es muy flexible a la hora de escoger los antibióticos a probar.

DILUCIÓN EN TUBO.

Esta prueba es también conocida como macrotitulación en tubo, según Koneman *et al.*, (1999), fue una de las primeras en desarrollarse. Consiste en preparar series de soluciones de concentraciones crecientes de un antibiótico o de extractos vegetales a la cual se le agrega a una suspensión bacteriana (Pradeu y Cohen, 1998).

FACTORES QUE AFECTAN LOS CULTIVOS MICROBIANOS.

TEMPERATURA.

La resistencia del microorganismo depende en gran parte de la etapa de desarrollo en que se encuentra, si forma o no esporas y de si el calor es seco o húmedo. Además, también es importante el tiempo de exposición. Las bacterias responden a temperaturas bajas. Para Koneman *et al.*, (1999), las placas se deben inocular de 35 a 37 °C.

DESECACIÓN.

De acuerdo con Bryan y colaboradores, (1971), la privación de agua a una célula bacteriana suele producir su muerte. La desecación en el aire mata a la mayor parte de formas vegetativas de bacterias patógenas en pocas horas, ya que requieren de un grado de humedad adecuado para el desarrollo óptimo, la cual esta en relación con las sales.

AGITACIÓN.

El sacudimiento excesivo acaba desorganizando a la célula bacteriana interfiriendo con su crecimiento (Bryan *et al.*, 1971).

pH.

Koneman *et al.*, (1986), sugiere que el pH óptimo para su desarrollo a temperatura ambiente es de 7.2 a 7.5, pero Bryan *et al.*, (1971), sugieren el rango de 6.5 a 7.5.

SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS ANTE UN ANTIBIÓTICO.

La sensibilidad de una bacteria a un antimicrobiano determinado viene dada por la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida. Ambas pruebas se determinan por los métodos de dilución

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).

Se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana dada (Koneman *et al.*, 1999; Gamazo *et al.*, 2008). Es expresada en unidades como ml ó µg / mL. Los resultados pueden ser interpretados como sensible (S), moderadamente sensible (MS), intermedio (I) o resistente (R).

CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB).

Es la menor concentración de un antimicrobiano capaz de originar la muerte celular de una cepa bacteriana dada (Koneman *et al.*, 1999). Para Gamazo *et al.* (2008), es una concentración por debajo de la correspondiente a la CMI, en la cual no pueden recuperarse bacterias viables tras el subcultivo, y por tanto, tampoco en concentraciones superiores. Se puede calcular partiendo del método de dilución en caldo y determinado por la porción de bacterias viables después de 18 a 24 horas de contacto con el caldo que contiene el antibiótico.

6.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS BACTERIAS EMPLEADAS

¿QUÉ SON LAS BACTERIAS?

Según Bryan *et al.*, (1971), las bacterias son diminutos organismos microscópicos, vegetales y unicelulares que difieren de las plantas superiores debido a que carecen de clorofila y se reproducen por fisión binaria cada veinte minutos. Se encuentran en el suelo, agua, aire y la leche, en la superficie de las frutas y vegetales, así mismos en diversas partes de cuerpo, tales como conducto alimenticio o la piel. Para Evan, (1996), las bacterias son microorganismos procariontes, unicelulares, que en general se constituyen por pared celular, membrana citoplasmática, citoplasma, ribosomas y nucleóide. Dependiendo del tipo de bacteria puede poseer flagelos, cápsula, esporas, entre otros.

Las bacterias son de tamaño pequeño, por lo que para su observación es preciso utilizar el microscopio óptico. Su tamaño se mide en μm (0,000001 m) y oscila entre 0,2 y 2 μm de diámetro y 6 μm de largo (Bryan *et al.*, 1971; Koneman *et al.*, 1999). Existen cuatro morfologías básicas para las bacterias: células esféricas ó cocos, células con la forma de bastón, cilíndrica o bacilo, también pueden ser helicoidal o espirilo, las que tienen forma de coma, llamadas vibriones, espiral (espiroqueta), estrella y cuadrangular (Bryan *et al.*, 1971).

Para Koneman *et al.*, (1999), la disposición de los cocos pueden ser: aislados, parejas (diplococos), cadenas (estreptococos), racimos (estafilococos) y formas cubicas de ocho compuestos (sarcinas). Los bacilos pueden ser igual que los cocos, solamente que cambian la terminación final en bacilos, aunque algunos de ellos se parecen tanto que se llaman cocobacilos

CARACTERÍSTICAS DE BACTERIAS EMPLEADAS

Bacillus cereus.

Prototipo de la familia *Bacillaceae*, bacilo Gram positivo, esporulado, aerobio o anaerobio facultativo, generalmente son móviles con flagelos peritricos. Su temperatura óptima de crecimiento 5°C a 55°C, el pH óptimo 4.5 a 9.3. Produce dos tipos de toxiinfecciones alimentarias: la forma diarreica y la forma emética (vómito): produce vómitos y náuseas (Koneman *et al.*, 1999).

Bacillus subtilis.

Gram positivos aerobios o anaerobios facultativos, de un tamaño aproximado de 0.5 x 1.2 a 2.5 x 10 µm. Tienen amplia distribución, ya que habitan el aire, suelo y agua. Algunas pueden formar parte de la flora intestinal del hombre y otros animales (Koneman *et al.*, 1999). Las enfermedades producidas por dicho patógeno son el carbunco*.

Escherichia coli.

Se encuentra dentro de la familia *Enterobacteriaceae*, su morfología es bacilar, de 1 a 3 µm por 0.5 µm, Gram negativo no esporulados, aunque las formas jóvenes son de tipo coco bacilar. En general, cuenta con flagelos peritricos, sin embargo pueden carecer de ellos, soportan temperaturas altas. Es saprófito de la flora anaerobia y facultativa del tracto digestivo y en general, se encuentra en aguas y alimentos, además es indicador de contaminación fecal. Frecuentemente es asociado con sepsis bacteriana*, en ocasiones puede crear trastornos gastrointestinales tipo diarreas, infecciones urinarias y meningitis en neonatos (Granados y Villa Verde, 1996: Koneman *et al.*, 1999).

Salmonella typhi.

Son Gram negativas, de forma bacilar. Puede causar infecciones con carácter entérico, tipo fiebres tifoideas o paratifoideas que pueden originar en casos más graves septicemias, además de infecciones tipo gastroenteritis o enterocolitis, además de la muy conocida fiebre tifoidea, transmitida al hombre vía oral por alimentos crudos, mal conservados que llevan mucho tiempo preparados, así como aguas que contengan a dicho patógeno (Granados y Villa Verde, 1996).

Shigella flexneri.

Son Gram negativos, aerobios ó anaerobios facultativos, de la familia *Enterobacteriaceae*, integrado por bacterias de forma bacilar, no esporuladas, inmóviles, pero animados de movimiento pendular (oscilación) *in situ*. El género *Shigella* se divide en cuatro especies: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S.*

*Carbunco: Enfermedad causada por bacterias del género *Bacillus*. La infección en los humanos compromete más a menudo la piel, el tracto gastrointestinal o los pulmones

boydii, *S. sonnei*. Ocasiona diarrea en humanos; pero invade el epitelio colónico con destrucción de la superficie de la mucosa y pueden producirse úlceras en esa mucosa, aunque rara vez invaden la mucosa (Granados y , 1996: Koneman *et al.*, 1999).

Staphylococcus aureus.

Son cocos Gram positivos, inmóviles, no formadores de esporas y de tamaño entre 0.5 y 2 micrómetros. Se conoce como estafilococo dorado por el pigmento no difusible de color amarillo que lo conforma (Granados y Villa Verde, 1996). Según Koneman (1999), se le encuentra en el ambiente externo, en narinas interiores, pliegues cutáneos, periné, axilas y vagina, aunque puede formar parte de la microflora humana. Además de ocasionar infecciones cutáneas relativamente benignas como foliculitis simple, la cual es una infección superficial que rodea los folículos pilosos, el impétigo, infección superficial de la piel observada principalmente en niños, así como furúnculos y carbuncos que afectan el tejido subcutáneo y producen síntomas sistémicos como fiebre. En ancianos ocasiona bronconeumonía, además de neumonía nosocomial, entre otros.

Staphylococcus epidermis.

Especie del género *Staphylococcus*, consistente en cocos Gram positivos arreglados en grupos. Es la causa más frecuente de infecciones en cuerpos extraños implantados (catéteres intravasculares, catéter de la diálisis peritoneal ambulatoria). Ocasiona las siguientes infecciones: cistitis, septicemia, endocarditis, endoftalmis (Granados y Villa Verde, 1996: Koneman *et al.*, 1999).

***Septis bacteriana.** Es una enfermedad grave en la cual el torrente sanguíneo se encuentra inundado de bacterias

7.- CARACTERÍSTICAS DE *Calea urticifolia* (Mill.) DC.

TAXONOMÍA.

Esta especie pertenece a la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, orden Asterales, familia Asteraceae (Cronquist, 1981). Esta familia tiene un lugar preponderante en la flora mexicana, tanto a nivel de género como de especie, por lo tanto, contribuye substancialmente a la enorme riqueza florística de nuestro país. Actualmente se registran para el territorio de la República 3,005 especies nativas, distribuidas en 392 géneros (Balleza y Villaseñor 2002).

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Calea urticifolia (Mill.) DC, se distribuye desde Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Honduras, El Salvador, Guatemala, Belice hasta México (Figura 1). En México se encuentra en los estados de Chiapas, Colima, Durango, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Wussow R. *et al.*, 1985). Habita en lugares de clima seco, entre 100-1,900m, se asocia con vegetación de bosques de pino y encino.

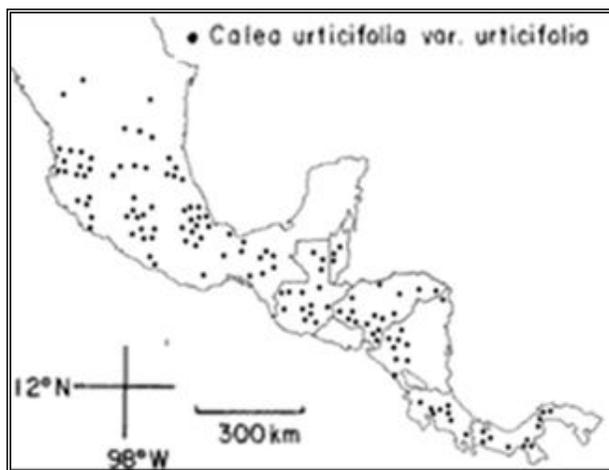


FIGURA 1.- DISTRIBUCIÓN DE *Calea urticifolia* (Mill) DC, TOMADA DE WUSSOW ET AL (1985).

DESCRIPCIÓN TAXONÓMICA.

Calea urticifolia es un arbusto erecto, de 1 a 2 m de alto, ramas esparcidas o densamente pilosas (Figura 2). Hojas cortamente pecioladas, láminas, ovada a oblongo-lanceoladas elíptico-lanceoladas, frecuentemente de 4-12 cm largo, 1-6 cm ancho; ápice, agudo o acuminado, base aguda u obtusa, triplinervadas, márgenes serrados, escabrosas en el haz, frecuentemente rugosas, venas conspicuas, fina o densamente hispidulosas o escabrosas en el envés, a menudo lustrosas en ambas caras. Inflorescencia en pequeñas cabezas numerosas, radiales en forma de umbela o panícula, éstas frecuentemente más cortas que las hojas; pedicelos delgados, frecuentemente 0.5-2.5 cm largo; involucros, 6-7 mm largo; filarios externos oblongos u oblongo-lanceolados, herbáceos hacia el ápice, agudos u obtusos, puberulentos, frecuentemente igual a los interiores, los interiores oblongos o oblongo-obovados, membranáceos, glabros o casi así, amarillentos; 3-8 flores de disco, las lígulas amarillas brillantes, extendidas, 4 a 5 mm largo; flores

de disco (8-)20-26(-14). Fruto, aquenio, 2.5 mm largo, cortamente pilosas; vilano de escamas, 3 a 4 mm largo (Nash y Williams, 1976).



FIGURA 2. *Calea urticifolia* (Mill) DC

1.5.4.- SINÓNIMOS.

Calea urticifolia es conocida en Chiapas como chichiquizo, matacucuyuchi o hierba del perro.. En Michoacán recibe los nombres comunes de hoja amarga y prodigiosa y se han registrado los mismos usos que para el estado de Chiapas (Escobar y Ocampo, 2007). En el Distrito Federal, es comercializada en el mercado de Sonora con el nombre de hierba amarga o del perro y prodigiosa (Enríquez, com. pers. 2009).

En Yucatán, se reconoce con el nombre de xikin, la emplean como nematocida y fungicida en la agricultura (Alejo *et al*, 2008). En Oaxaca, es conocida como hierba amarga, del coyote, garañona y coyote amargo, se emplea para combatir el dolor de estómago, macerado en aguardiente para la diabetes, como té es antiamibiano y para tratar la disentería (Solano, com. pers. 2009). En el Salvador, se le conoce como juanislama, nombre que se le ha signado a muchos de sus

metabolitos secundarios y se le emplea para combatir la gastritis, melanomas, leucemia, cáncer de colon, inhibidor de apoptosis celular y adipogénica, entre otros (Nakahua *et al.*, 2005).

ESTUDIOS REALIZADOS AL GÉNERO *Calea*.

Las especies de este género son utilizadas ampliamente en la medicina tradicional en México Centro y Sudamérica. Existen diversos trabajos donde se ha estudiado y probado la actividad biológica de metabolitos secundarios de varias especies del género *Calea*, incluyendo a la especie *urticifolia*. En el cuadro 1 muestra la especie, el lugar de procedencia, el tipo de extracto que se ha analizado, las partes utilizadas, así mismo el estudio realizado y los remedios en el tratamiento de enfermedades de dicha familia.

Venegas *et al.*, (2002), realizaron el estudio del extracto acuoso de las hojas de *Calea zacatechichi*, para evaluar su actividad antiinflamatoria. Mediante la inducción de un edema en ratas hembras y machos en la cavidad peritoneal. Encontraron que el extracto acuoso presentó disminución significativa en el número de migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal comparados con dexametasona, inhiben la migración $50 \pm 8\%$ y los extractos de *Calea zacatechichi* $44 \pm 7\%$, por lo tanto, concluyeron que dicho extracto contiene compuestos con potencial antiinflamatorio.

Mendes *et al.*, (2004), probaron el extracto de diclorometano de las hojas de *Calea platylepis* Sch. Bip. Ex Baker, mediante un método de difusión con un rango de concentraciones de 50 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Ellos observaron que se inhibió el crecimiento de hongos como *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, entre otros, y las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, entre otros. Concluyendo que los compuestos (+)-4a,7b-aromadendranediol, euparina, caleprunina B y euparona tienen actividad bactericida y fungicida, además el compuesto caleprunina A mostró mayor actividad contra *Trichophyton mentagrophytes*. Por otro lado, Yamada *et al.*, (2004), de las hojas de *Calea urticifolia* (Mill.) DC colectada en El Salvador, aislaron del extracto acetónico, a siete germacránolidos, midieron su bioactividad en células U937 (leucemia), encontraron que la calealactona C y 2,3-epoxijuanislamina presentan mayor actividad citotóxica que su control el partenólido.

En estudios recientes, Sárda *et al.*, (2008), probaron la actividad acaricida del extracto hexánico de la parte aérea de *Calea serrata* en *Boophilus microplus* y *Rhipicephalus sanguineu*. Concluyeron que dicho extracto, presentó un porcentaje de 100% de mortandad en cultivos *in vitro* en larvas de *Boophilus microplus* y *Rhipicephalus sanguineus*. Para *B. microplus*, a concentraciones de 25 mg/mL y 12.5mg/mL, la eclosión disminuyó presentando un 10-30% ya que las larvas al eclosionar morían, debido al contacto con el extracto. Atribuyen la actividad acaricida al precoceno II.

CUADRO 1. USOS EN MEDICINA TRADICIONAL DEL GÉNERO *Calea*

Especie	Procedencia	Extracto utilizado	Parte utilizada	Estudio	Uso
<i>Pinnatifida Bank</i> (Ferreira <i>et al.</i> 1980)	Sao Paulo	Etanólico	Hojas		Disenteria amebica
<i>Lantoides</i> (Vichniewski <i>et al.</i> , 1982)	Brasil	Acetato de etilo-hexánico	Hojas		Larvicida
<i>Platylepis</i> (Mendes <i>et al.</i> , 2004)	Brasil	Diclorometano	Flores y hojas	Antimicrobiano y fungicida	
<i>Clematidea</i> (Flach <i>et al.</i> , 2002)	Sur de Brasil y Uruguay	Aceite esencial	Flores y hojas	Anti-influenza, catarro y fungicida	
<i>Zacatechichi</i> (Martínez <i>et al.</i> , 1987) (Venegas <i>et al.</i> , 2002)	Sureste de México	Acuoso	Hojas	Edema, y antiinflamatorias	Reumatismo, enfermedades respiratorias, hemorragias, malaria, diarrea
<i>Prunifolia</i> (Garavito <i>et al.</i> , 2006) (Onzaga <i>et al.</i> , 2008)	Bogotá Colombia	Etanólico	Hojas Tallo y hojas	 Vasodilatador	Anti- malaria
<i>Clausseniana</i> (Mendes <i>et al.</i> , 2007)	Brasil	Diclorometano y etanol	Parte aérea y hojas	Tripanocida	
<i>Serrata</i> (Mendes <i>et al.</i> , 2007)	Brasil	Hexánico	Hojas y tallos	Acaricida	Ulceras, enfermedades del hígado

ESTUDIOS REALIZADOS A *Calea urticifolia*.

La documentación científica de los principales usos del género *Calea* en las diferentes patologías es muy escasa, por ello, es de gran importancia sustentarlo. Yamada *et al.* (2004) extrajeron de las hojas de *Calea urticifolia* siete germacranólidos y los probaron en células leucémicas U937, encontraron que la calealactona C y 2,3-epoxijuanislamina presentan mayor actividad citotóxica que el partenólido utilizado como testigo. Por otro lado, Matsuura *et al.*, (2005) evaluaron el efecto de siete germacranólidos como caleina D, juanislamina, 2,3-epoxijuanislamina, calealactona A, B y C y 2,3-epoxicalealactona sobre la diferenciación de líneas celulares 3T3-L1. Observaron que los germacranólidos probados inhiben la adipogénesis a concentraciones de 1.25-5 μ M, con lo cual concluyeron que estos germacranólidos son inhibidores específicos de la diferenciación preadipocítica, además de que serían un buen remedio para la obesidad y en especial la originada por aterosclerosis.

Nakagua *et al.* (2005) probaron los extractos acetónicos de lactonas sesquiterpénicas, de las hojas de *Calea urticifolia* en cultivos *in vitro* de líneas celulares de HL60 (leucemia), indicaron que el arucanólido, disminuye el crecimiento de estas células a una concentración de 10 μ M. Umemura *et al* (2008) realizaron un estudio de estrés oxidativo con lactonas sesquiterpénicas de esta especie y evaluaron la respuesta de células PC12 de ratones al arucanólido, calealactona A, 2,3-epoxicalealactona A, calealactona B, 2,3 epoxijuanilamina y registraron que estos compuestos carecen de actividad antioxidante. Recientemente, Ohguchi (2009) encontró que la 2,3 epoxijuanislamina, tiene efecto inhibitorio de la melanogénesis a una concentración de 2 μ M.

También se ha documentado su efecto como nematocida y fungicida de plantas nativas de Yucatán. Alejo *et al.* (2006) compararon 55 extractos vegetales etanólicos, para ver cuales respondían como mejor nematocida. Obtuvieron mejores resultados utilizando extractos de hojas y raíces de *Calea urticifolia*, con un 80% de mortalidad en *Meloidogyne incognita*. Alejo *et al.* (2008) probaron extractos etanólicos de *Calea urticifolia* contra los hongos *Alternaria tagetica*, *Colletotricum gloeosporioides*, *Fusarium oxisporum* y *Rhizopus sp.*, encontraron que redujo el crecimiento del micelio en un 61%.

Herrera y colaboradores (2009), probaron los extractos acuosos de las hojas y raíces de *Calea urticifolia* para evaluar el control de *Meloidogyne incognita* en cultivos de tomate cv, en Rio Grande, encontrando así que aplicando los extractos 72 hrs antes del transplante, disminuye del 45 al 48% el número de huevos.

Existen diversos estudios, en los cuales se evaluó la composición química de los extractos de éter etílico y de petróleo, cloroformo, etanólicos y acetónicos de las hojas *Calea urticifolia*, de

ejemplares colectados en Veracruz, Guatemala, Honduras y de El Salvador, dentro de los cuales se encuentran sesquiterpenos lactona como germacranólidos, heliangólidos, derivados de isoeugenol y de floroglucinol.

Bolhmann y Jakupovic (1979), aislaron del extracto éter etílico y éter de petróleo 6-metoxi-isoeugenol-isobutirato, caleurticina, 9 α -hidroxi-atrupliciolido-8-O-[2-metilacrilato], 9 α [isovaleriloxi-bzw.senecioiloxi-bzw.angeloiloxi]-15-hidroxi-atrupliciolido-8-O-[2metilacrilato], caleurticólido acetato, caleurticólido -[2-metilacrilato], caleurticólido-angelicato-3,10-epoxi-9-(3-metilbutanoil)-8-(2-metilpropenoil)-15-hidroxi-1-oxo-germacra-2,4,11(13) trien-12,6-olido, 3,10-epoxi-9-(3 metil-2 butenoil)-8-(2-metilpropenoil)-15-hidroxi-1-oxo-germacra-2,4,11 (13)-trien-12,6-olido y 3,10-epoxi-9-angeloil-8-(2-metilpropenoil)-15-hidroxi-1-oxo-germacra-2,4,11(13)-trien-12,6-noil)-15-hidroxi-1-oxo-germacra-2,4,11(13)-trien-12,6 olido, cinco heliangólidos, ocho derivados de isougenol y un derivado de isoeugenol.

De igual forma, Borges *et al.*, (1981), de un ejemplar colectado en El Salvador, del extracto etanólico de las hojas, reportaron dos nuevos sesquiterpeno lactonas juanislamina y 2,3-epoxi-juanislamina, además de caleina D y 2,3-epoxi-caleina D. Vargas *et al.*, (1989), realizaron estudios de dos poblaciones de *Calea urticifolia* de Veracruz, son los pioneros en analizar a una especie mexicana y una de Costa Rica. Utilizando el extracto clorofórmico (CHCl₃) de sus hojas. En la fracción de etanol encontraron al acetato de caleurticólido, caleurticólido [2-metilacrilato], (4,5) [acetato de 2,3 α -epoxicaleurticólido] y [2,3 α -epoxicaleurticólido [2-metilacrilato] caleiana A.

En 2004, Yamada *et al.*, de las hojas de *Calea* (Mill.) DC colectada en El Salvador, aislaron del extracto clorofórmico, a siete germacranólidos calealactona A, B y C: 2,3-epoxicalactona A, caleina D, juanislamina, y 2,3-epoxijuanislamina. Nakagua *et al.*, (2005), de los extractos acetónicos de las hojas de *Calea urticifolia*, encontraron , juanislamina, 2,3-epoxijuanislamina, calealactona A, B, C , 2,3-epoxicalactona A y arucanólido. En 2009, Ohguchi *et al.*, aislaron de las hojas de *Calea urticifolia* a los siguientes sesquiterpeno lactonas: calealactona A y B, auracanólido, 2,3-epoxijuanislamina y 2,3-epoxicalactona A.

En el cuadro 2, se indican el lugar de procedencia, el tipo de extracto que se ha analizado, las partes utilizadas, así mismo el estudio realizado *Calea urticifolia* Mill D.C. En el cuadro 3, se sintetizan los remedios para los cuales se emplea a *Calea urticifolia* Mill D.C.

CUADRO 2. PRUEBAS REALIZADAS A *Calea urticifolia* Mill DC EN DIVERSOS PAÍSES DE LATINOAMÉRICA.

Procedencia	Extracto utilizado	Parte utilizada	Prueba
El Salvador (Yamada <i>et al.</i> 2004)	Cloroformo	Hojas	Líneas celulares de leucemia U937
El Salvador (Matsuura <i>et al.</i> , 2005)	Acetona	Hojas	Inhiben la adipogénesis
El Salvador (Nakagua <i>et al.</i> 2005)	Acetona	Hojas	Celulares de HL60 leucemia y cáncer de colón
Yucatán (Alejo <i>et al.</i> 2006)	Etanólico y acuoso	Planta entera	Nematicida y fungicida
Yucatán (Alejo <i>et al.</i> (2008)	Etanólico	Planta entera	Fungicida
(Umemura <i>et al.</i> , 2008)	Éter de petróleo	Hojas	Estrés oxidativo
Yucatán (Herrera <i>et al.</i> , 2009)	Acuoso	Hojas y raíces	Nematicida

CUADRO 3. USOS ETNOBOTÁNICOS DE *Calea urticifolia* Mill DC EN DIVERSOS PAÍSES DE LATINOAMÉRICA.

Procedencia	Sinónimo	Parte utilizada	Uso tradicional
Chiapas Michoacán (Escobar-Ocampo, 2007)	chichiquizo, matacucuyuchi o hierba del perro hoja amarga y prodigiosa	Hojas	Paludismo y enfermedades gástricas.
Distrito Federal en el mercado de Sonora (Enriquez, com. pers. 2009).	hierba amarga o del perro y prodigiosa	Toda la planta	Diabetes, bilis, inflamación del hígado, coagulación de la sangre, retención de líquidos y enfermedades de la piel
Oaxaca (Solano, com. pers. 2009).	hierba amarga, del coyote, garañona, coyote amargo	Hojas	Antiamibiano y para tratar la disentería
El Salvador	juanislama	Hojas	Gastritis, ulcera, bactericida y fungicida

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *Calea*.

El género *Calea*, se distribuye en México, Centro y Sudamérica, está integrado aproximadamente por 110 especies, de las cuales 37 representantes se tienen investigadas químicamente. La mayoría de los estudios químicos realizados han reportado furanoheliangólidos, germacranólidos, eudesmanólidos y guaianólidos. Además de derivados de p-hidroxiacetofenona y de timol, benzofuranos, crómenos, entre otros (Mendes *et al* 2002). Los compuestos que se han analizado en algunos ejemplares del género se muestran en la Cuadro 4 y sus estructuras reportadas fueron agrupadas como **figura 3** en el anexo 1.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *Calea urticifolia*.

En cuanto a la especie *Calea urticifolia*, como se puede apreciar en la tabla 2, se han analizado la composición química de los extractos de éter etílico y de petróleo, cloroformo, etanólico y acetónicos de de ejemplares colectados en Guatemala, Honduras y de El Salvador, proporcionando así la identificación de metabolitos secundarios, dentro de los cuales se encuentran germacranólidos, heliangólidos, derivados de isoeugenol y de floroglucinol (Bolhmann y Jakupovic, 1979; Werner y Neandra. 1980; Yoshito *et al.*, 2005).

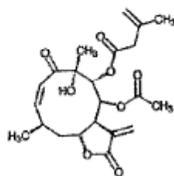
CUADRO 5.- METABOLITOS SECUNDARIOS REPORTADOS EN *Calea urticifolia*.

Compuesto químico	Núm., de referencia
arucanólido (1)	75,79,98 y 105
calealactona A (2)	75,79,98 y 105
calealactona B (3)	75,79,98 y 105
calealactona C (4)	75,79,98 y 105
caleina D (5)	75,79,98 y 105
caleurticina (6)	10,21 y 22
acetato de caleurticóido (7)	10,21 y 22
caleurticóido-[2-metilacrilato] (8)	10,21 y 22
caleurticóido-angelicato(9)	10,21 y 22
2,3-epoxicalealactona (10)	75,79,98 y 105
2,3-epoxijuanislamina (11)	75,79,98 y 105

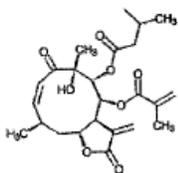
CUADRO 5.- CONTINUACION

2,3-epoxicalactona A (12)	75,79,98 y 105
juanislamina (13)	75,79,98 y 105
6-metoxi-isoegenol-isobutirato (14)	10,21 y 22
9 α -hidroxi-atrípliciólido-8-O[2-metilacrilato] (15)	10,21 y 22
9 α [isovateriloxi-bzw, senecioiloxi-bzk, angeloiloxi]-15-hidroxi-atrípliciólido-8-O-[2-metilacrilato] (16)	10,21 y 22

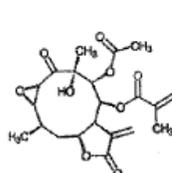
FIGURA 4.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN *Calea urticifolia* (ENLISTADOS EN LA TABLA 1)



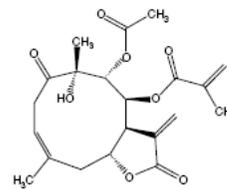
1) auracanólido



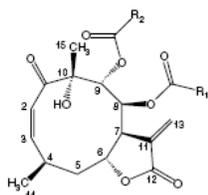
2) calealactona A



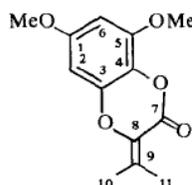
3) calealactona B



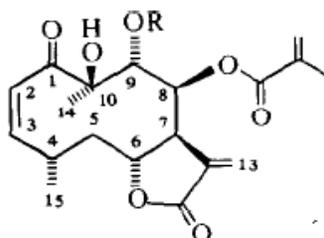
4) calealactona C



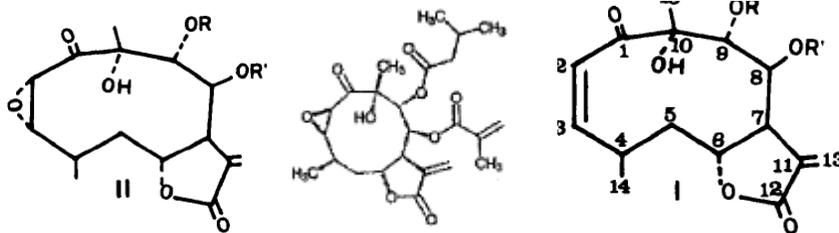
5) caleina D



6) caleurticina



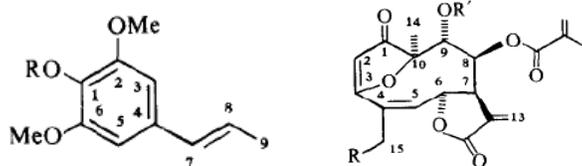
7) acetato de caleurticólido , 8) caleurticólido-[2-metilacrilato] y 9) caleurticólido-angelicato



11) 2,3-epoxijuanisamina

12) 2,3-epoxicalactona A

13) juanisamina



14) 6-metoxi-isoeugenol-isobutirato

15) 9α-hidroxi-atrípliciolido-8-O[2-metilacrilato] y 16)

9α[isovateriloxi-bzw, senecioiloxi-bzw, angeloiloxi]-15-hidroxi-atrípliciolido-8-O-[2-metilacrilato]

En un esfuerzo por detener el incremento en la incidencia de la resistencia a los antibióticos, el sector salud y la industria farmacéutica han invertido importantes recursos en la búsqueda de nuevos compuestos inhibitorios de origen vegetal. Por estas razones, en el presente proyecto de tesis de licenciatura se evaluará la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de las hojas de *Calea urticifolia* (Mill) DC., una especie ampliamente utilizada en medicina tradicional mexicana.

1.6.-HIPÓTESIS:

- Tomando en cuenta que el extracto crudo de diclorometano de las flores y hojas de *Calea platylepis* Sch. Bip. Ex Baker, tienen actividad antibacteriana es factible suponer que los extractos hexánico y metanólico obtenidos de *Calea urticifolia* tengan el mismo efecto sobre microorganismos patógenos.

9.- OBJETIVOS GENERAL

- Identificar los componentes mayoritarios presentes en los aceites esenciales y el extracto metanólico de las hojas de *Calea urticifolia* (Mill) DC, asimismo evaluar la actividad antimicrobiana mediante los métodos de difusión y dilución.

9.1.-OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar la investigación bibliográfica sobre los estudios químicos y fitoquímicos del género *Calea* y sobre todo la especie *Calea urticifolia*
- Obtener los extractos hexánico y metanólico, así como los aceites esenciales de las hojas de *Calea urticifolia* y determinar el rendimiento de cada extracto.
- Extraer e identificar los metabolitos secundarios más abundantes en el extracto metanólico y aceites esenciales obtenidos de las hojas de *Calea urticifolia* (Mill) DC.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos crudos de hexano y metanol obtenidos de las hojas de *Calea urticifolia* (Mill) DC, mediante la prueba de difusión y dilución en las cepas bacterianas; *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*.

10.-JUSTIFICACIÓN

En México y en el mundo, se comercializan numerosas plantas con propiedades medicinales, las cuales por su bajo costo, son empleadas para curar diversos padecimientos, sin conocer sus efectos colaterales. Por ello, la validación científica de sus usos medicinales y la búsqueda de nuevos compuestos que aminoren a muchas de las enfermedades, es una tarea que no tiene fin.

En este sentido, *Calea urticifolia* es utilizada en la medicina tradicional por sus propiedades curativas en diversos padecimientos causados por bacterias, hongos y amibas, también en enfermedades gástricas, como hipoglucimiente, inflamación del hígado, coagulación de la sangre, retención de líquidos y padecimientos cutáneos. De igual forma, se usa para tratar algunos tipos de cáncer como melanoma, leucemia y de colon. Se utiliza en malestares pulmonares como la tos. Es inhibidora de apoptosis celular y tiene acción adipogénica.

Existen antecedentes de que los extractos etanólicos, acetónicos y de diclorometano de las hojas de *Calea urticifolia* provenientes de Centro y Sudamérica, contienen lactonas sesquiterpénicas, derivados de isoeugenol y floroglucinol. Estas mismas sustancias se han registrado en extractos de ejemplares de *Calea urticifolia* provenientes de Veracruz. Pero ningún estudio para esta especie ha revelado su acción antibacteriana y muy pocos refieren su efecto como fungicida. Partiendo de los datos proporcionados por la investigación bibliográfica, se decidió realizar la extracción empleando como disolvente metanol, ya que en *Calea urticifolia* no se cuenta con ningún análisis de este tipo. Asimismo se planteó realizar el análisis de los aceites esenciales, puesto que, sólo se tiene un reporte de este tipo de estudio en *Calea clematidea* (Flach *et al.*, 2002).

11.- MATERIAL Y METODOLOGÍA

MATERIAL

- Agitadores magnéticos
- Anillo metálico
- Asas bacteriológicas
- Cajas Petri
- Columna fraccionada
- Embudo tallo corto
- Embudo de separación
- Hisopos
- Tubos de ensaye
- Matraz bola de 50, 500 y 1000 ml
- Matraz Erlenmeyer de de 250 y 4000 ml
- Pinzas de tres dedos
- Pipetas graduadas
- Pipetas Pasteur
- Probeta de 50 y 100 ml
- Refrigerante
- Regla graduada
- Soporte universal

MATERIAL BIOLÓGICO

CEPAS BACTERIANAS

+*Bacillus cereus*

+*Bacillus subtilis*

+*Escherichia coli*

+*Staphylococcus aureus*

+*Staphylococcus epidermis*

+ *Salmonella typhi*

+ *Shigella flexneri*

EQUIPO

- Canastilla de calentamiento
- Cromatografo de gases, marca Agilent, modelo 6890 N
- Columna capilar fase DB-5MS(5% fenil-metilsilicón) Dimensiones 10 m de long y 0.18mm de D.I. Espesor de película de 018 uM
- Equipo de arrastre de vapor y extracción simultánea
- Espectrofotómetro Genesys 10 UV
- Espectrómetro de Masas marca LECO, modelo: Pegasus 4D
- Parrilla de calentamiento y agitación
- Recirculador
- Rotavapor
- Reóstato

REACTIVOS

- Agar bacteriológico
- Agua destilada
- Acetato de etilo
- Caldo nutritivo
- Cloramfenicol
- Diclorometano
- Éter etílico
- Hexano
- Metanol
- Solución buffer Trizma® base pH 7.2
- Ácido clorhídrico
- Fenil-metilsilicón

TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL.

OBTENCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

La planta fue colectada en el mes de abril de 2009, en el estado de Oaxaca, en el distrito Putla, municipio Putla a una latitud 16 59'01'', longitud oeste 97,54', 6'' y una altitud de 777 m.s.n.m. La vegetación corresponde al resto de selva subcadocifolia. El espécimen fue determinado taxonómicamente por el Doctor Eloy Solano Camacho del herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México Distrito Federal.

PREPARACIÓN DEL VEGETAL.

Se realizó la separación de la planta en flor, tallo y hoja. Se les eliminó la humedad en la cámara de secado del herbario de la FES Zaragoza durante tres días, a una temperatura de 30°C.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.

EXTRACTO HEXÁNICO.

A 980g de hojas secas y molidas se maceraron con hexano (3000 mL x 2) en un matraz Erlenmeyer protegido de la luz y el polvo durante 48 h, se agitó periódicamente, pasado el tiempo, se decantó y filtró el disolvente con papel Whatman No. 42.

EXTRACTO METANÓLICO.

Las hojas previamente tratadas con hexano, se sometieron a extracción con metanol (3000 ml x 3) durante 72 hrs, pasado el tiempo, en cada ocasión decantó y filtró el disolvente con papel Whatman No., 42. Se evaporó el disolvente en el rotavapor.

EXTRACCIÓN ÁCIDO-BASE DEL EXTRACTO METANÓLICO.

Del extracto metanólico crudo, se tomaron 10 g, se adicionaron 20 mL de ácido sulfúrico 0.1 N, seguidamente se adicionó 5 g de zinc (Zn), se sometió a agitación durante dos horas. Posteriormente, se decantó y filtró el disolvente con papel Whatman No., 42. Seguidamente, la fase acuosa se extrajo con éter en un embudo de separación (75 mL x 4). Al extracto acuoso se le cambió el pH a 9 con hidróxido de amonio (NH₄OH), se extrajo con CH₂Cl₂ (75 mL x 3) en el embudo de separación, la fase orgánica se secó con NaSO₄ (sulfato de sodio anhidro).

ACEITE ESENCIAL.

Se realizó una destilación por arrastre de vapor y extracción simultánea con pentano en un equipo modificado de Lickens y Nickerson de las hojas secas de *Calea urticifolia* (Mill) DC., durante dos horas. Se empleó el mismo procedimiento con éter como disolvente para extraer los compuestos oxigenados.

OBTENCIÓN DEL PESO SECO DE LOS EXTRACTOS.

Se pesó cada uno de los extractos obtenidos, se almacenaron en frascos color ámbar tarados, a continuación se calculó el peso seco de cada uno de los extractos y el rendimiento.

IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS EXTRAÍDOS POR CG-MASAS.

Se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent y modelo 6890 N, acoplado a un detector de masas con cuadrupolo (MDS,HP-HP5989 o HP-5972). El análisis espectrométrico de masas fue por ionización de impacto de electrones a 70 eV, la temperatura del inyector y del detector fueron de 225° C. El programa de temperatura del horno fue 40 ° C durante 3 minutos, una rampa de calentamiento de 10 ° C/min y una temperatura fina de 200 ° C durante 5 minutos. El volumen de inyección fue de 1 µL. Se utilizaron dos columnas capilares de alta resolución de sílice fundida. En una primera etapa del trabajo se utilizó una columna de 30 m de fenilmetilsilicón con diámetro interno de 0.32 mm y un tamaño de partícula de 0.250-µm. Posteriormente, se empleó el cromatógrafo con una columna de FFAP de 50 m, 0.32 mm de diámetro interno, 0.52 µm de tamaño de partícula. En parte debido a su longitud se obtuvo una mejor resolución con la columna de FFAP (polietilenglicol) que es más polar que la de fenilmetilsilicón, por lo que la mayoría de los compuestos que se identificaron fueron separados con esta fase.

Los compuestos se identificaron comparando los espectros obtenidos con los datos espectrales de la biblioteca NIST 75K del detector de masas.

ENSAYOS BIOLÓGICOS

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANAS.

Se utilizó el método de difusión en disco en agar, la cual permite medir la susceptibilidad *in vitro* de microorganismos patógenos frente a una sustancia o a la mezcla de varias sustancias desconocidas de origen vegetal con potencial antimicrobiano, de acuerdo al procedimiento modificado de acuerdo a Vanden y Vlietinck, (1991): Atta *et al* 2001.

OBTENCIÓN DE LAS CEPAS.

Las cepas de los agentes patógenos (bacterias), fueron proporcionadas por el cepario de Campus I, del Laboratorio de Microbiología, de la FES Zaragoza.

PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES DE LOS EXTRACTOS.

Se pesó 0.001 g del extracto metanólico, se diluyó con 1 mL de solución reguladora Trizma Base a pH 7.2, para obtener una concentración de 10000 µg/mL a partir de esta solución, se preparó una dilución tomando 20µL y se diluyó en 180 µL de solución reguladora a pH 7.2 para obtener una solución de concentraciones de 1000 µg/mL. Se mezcló y tomó 20µL y diluir en 180 µL reguladora a pH 7.2, obteniendo así una solución de 100 µg/mL. Como testigo positivo se utilizó al cloramfenicol a una concentración de 30 µg/mL y como testigo negativo metanol. Para el extracto hexánico, fue el mismo procedimiento, salvo que el disolvente empleado fue metanol.

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

Se preparó agar bacteriológico, se depositó en cajas Petri, se dejó solidificar, se esterilizó durante 15 minutos, junto con las asas bacteriológicas, pinzas y los hisopos.

PREPARACIÓN DE LOS DISCOS.

Se cortaron discos de papel Whatman con un diámetro de 5 mm, se esterilizaron por 20 min, posteriormente se impregnaron con 2 µL de cada una de las diluciones y controles. Se dejaron secar por evaporación al ambiente.

PREPARACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS.

ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO MICROBIOLÓGICO.

Para cada grupo de microorganismos, se tomaron de cuatro a cinco colonias con un asa bacteriológica, se colocaron en 5 mL de solución fisiológica estéril (NaCl al 0.9%) y se ajustó por medio de la turbidez del estándar de Mc Farland del tubo No.1 de dicha escala.

SIEMBRA DEL INÓCULO o PREPARACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA.

Se tomaron 1.2 mL de la solución previamente estandarizada, se distribuyó homogéneamente sobre la superficie del medio de cultivo, mediante la ayuda de un hisopo, posteriormente se colocaron los discos de papel filtro estériles, previamente preparados con ayuda de pinzas estériles, se presionó con el fin de que quedaran adheridos a la superficie del agar. Se incubó a 35°C durante 24 h, posteriormente, se realizó la medición de los halos de inhibición (mm).

DETERMINACIÓN DEL HALO DE INHIBICIÓN.

Pasado el tiempo de incubación (24 hrs), se midió el halo de inhibición para cada grupo de bacterias, con ayuda de una regla graduada (incluyendo el área del disco).

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO DE LA PRUEBA DE DILUCIÓN

ACTIVACIÓN DEL INÓCULO.

Se tomaron a 5 colonias de bacterias, se incubaron en frascos serológicos con caldo nutritivo líquido por un lapso de 24 h.

ESTANDARIZACIÓN DEL INÓCULO.

Se tomaron a 5 mL de inóculo activado y se ajustó la turbidez al tubo 1 de la escala de Mc Farland (3×10^8 U.F.C/mL) a 580nm. Se realizó una dilución 1/100 para obtener una dilución 10^6 U.F.C/mL (García y Cantón, 2001).

PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE EXTRACTOS.

Se pesaron 0.015 g del extracto metanólico y se disolvió en 5 mL solución reguladora a pH 7.2, para obtener una solución con concentración de 30000 µg/mL. De esta solución se tomó 1 mL y diluyó en 9 mL en solución reguladora a pH 7.2, para obtener una solución de 3000 µg/mL, asimismo tomó 1 mL de ésta y se diluyó en 9 mL de solución reguladora a pH 7.2, para obtener una solución de 300 µg/mL. Para el extracto hexánico, fue el mismo procedimiento, salvo que el disolvente empleado fue metanol.

PREPARACIÓN DE LOS TUBOS.

- Para las pruebas con el extracto: 1 mL de caldo nutritivo, 1 mL de solución de cada concentración de extracto, 1 mL del inóculo.
- Para el control negativo: 1 mL del inóculo, 1 mL de caldo nutritivo
- Para el control positivo :1 mL del inóculo, 1 mL de caldo nutritivo y 1 ml del antibiótico

RECUESTO BACTERIANO.

Pasado el tiempo de incubación (24 hrs), se leyó la turbidez a cada una de las muestras en el espectrofotómetro a 580 nm, para determinar el potencial antimicrobiano de *Calea urticifolia*.

12- DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se realizaron 3 experimentos, cada uno de ellos por triplicado, se realizó el análisis de varianza y una comparación de medias poblacionales por la prueba de Tukey, para la prueba de difusión y para el ensayo de dilución, se empleo el método de Holm-Sidak, para saber si existe diferencia significativa entre cada una de las disoluciones y su respectivo control, con un nivel de confianza de 95 % y un $\alpha = 0.05\%$.

13.- RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

RESULTADOS DEL RENDIMIENTO DEL EXTRACTO

RENDIMIENTOS OBTENIDOS.

El porcentaje del extracto permite conocer que tanto material vegetativo se necesita macerar para obtener la cantidad necesaria de extracto en peso seco, igualmente para saber la cantidad de metabolitos secundarios que tiene la especie vegetal. En la cuadro 6 se muestra el rendimiento obtenido para el extracto hexánico, como para el metanólico, asimismo para los extractos obtenidos en la extracción ácido-base del extracto metanólico y de los aceites esenciales, estos obtenidos mediante un equipo de arrastre de vapor y extracción simultánea.

CUADRO 6.- PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL EXTRACTO SECO DE LAS HOJAS *Calea urticifolia* Mill DC.

ESTRUCTURA	PESO (g)	Disolvente	Peso del extracto (g)	Rendimiento del extracto seco (%)
Hojas	980 de hoja	Hexano	14.1	1.44
		Metanol	70	7.15
	20 de extracto metanólico	Éter etílico	0.3	1.15
		Diclorometano	0.65	3.25

ANÁLISIS GASES-MASAS.

Mediante la cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas, se analizaron cada uno de los concentrados obtenidos en la extracción ácido-base del extracto metanólico (cuadro 7 y 8) y los aceites esenciales (cuadro 9 y 10), los cuales se enlistan de acuerdo a su tiempo de retención y los que tienen un área mayor al 1%.

A continuación se enlistan los compuestos identificados en *Calea urticifolia*, que tienen estructuras similares a otras sustancias reportadas que cuentan con efecto antibacteriano, lo cual sustentaría su empleo en la medicina tradicional de *Calea urticifolia*.

COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN EL EXTRACTO ETÉREO.

En la cuadro 7, se muestran los componentes oxigenados extraídos con éter etílico del extracto metanólico de las hojas de *Calea urticifolia*, los cuales fueron identificados con el sistema gases-masas. Los trece componentes principales representan el 48.29 % del total del extracto etéreo obtenido. De la observación de la tabla mencionada se desprende que el componente mayoritario del extracto etéreo de *Calea urticifolia* es el **3-metil-4-propil, 2,5-furanodieno**, que se encuentra en un 6.56 %. El **3,4-dimetol cis tetrahidro furano**, esta presente en un 4.64%. Seguido por el **cis 5-eteniltetrahidro- α,α ,5-trimetil, 2-furano metanol**, con un 1.91 %. Ogunwande (*et al.*, 2005), encontraron actividad antibacteriana a los furanodienos.

Ávalos (*et al.*, 2009) y Baveja (*et al.*, 2004), proponen que la furanona inhibe el desarrollo bacteriano, en nuestro análisis se detectó la **5-etil,2(5H)-furanona** con un 2.88% y a la **hidroxi lactona del ácido undecanoico** en un 2.17%, que posiblemente tengan actividad antibacteriana, por la semejanza a las estructuras. Bohlmann (*et al* 1982 e,f,g y j), encontró en *Calea angusta*, *Calea hispida*, *Calea hymenolepis* y *Calea villosa*, hallaron la presencia de furanodienos, al igual que Fisher (*et al* 1984), en *Calea ternifolia*, encontró furanos tipo heliangólido.

Thorarensen (*et al.*, 2007), menciona que las amidas son metabolitos secundarios que inhiben la actividad bacteriana, en nuestro análisis esta presente la **N,N-dimetildodecanoamida** se encuentra en un 3.91%. El **2-metoxi-4-vinilfenol**, se encuentra presente en una proporción del 3.53% en el extracto etéreo, seguido por el **2,4-bis (1-feniletíl) fenol** en un 2.66 %. Muchos fenoles son compuestos con acción antibacteriana, según lo reportado por Kuklinski, (2000) y Domingo y López Brea (2003).

Lourenco (*et al.*, 1981) en el extracto hexánico de *Calea cuneifolia*, encontraron los siguientes fenoles: 2-senecionil-4-(1-hidroxietil) fenol, 2-senecionil-4-(1-acetoxietil)fenol, 2-senecionil-4-(1-acetil sarracinoiloxietilhidroxietil) fenol, 2-(3-metil-3-hidroxibutanoil-1)-4-(1-hidroxietil) fenol y 2-senecionil-4-vinil fenol.

Ogunwande (*et al.*, 2005), y Xu (*et al*, 2003), mencionan que tanto **la hidroquinona 4-propil, 1,3-bencenodiol 2.25 %**, al igual que los otros metabolitos secundarios analizados, tienen propiedades antibacterianas. Bohlmann (1984 k) y Schmeda *et al* (1986) encontraron en *Calea*

harleyi y *Calea clematidea*, al éter dimetílico de la timohidroquinona en este trabajo se encontró a la **6-acetil-2,5,8-trihidroxi,1,4-naftoquinona**, con un 1.50 %.

CUADRO 7.- COMPONENTES DEL EXTRACTO ÉTER ETÍLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* CON EL SISTEMA GASES-MASAS.

N. P	COMPUESTO	T.R	Á %	S	P.M.
7	4-(1-metiletoxi),1-butanol	152.374	1.9681	830	132
8	3-metil,2-ciclopentenona	164.047	3.0521	936	96
10	5-etil ,2(5H)-furanona	198.147	2.8865	930	112
14	hidroxi lactona del ácido undecanoico	214.947	2.1782	675	184
12	cis 5-eteniltetrahydro- $\alpha,\alpha,5$ -trimetil, 2-furano metanol	218.747	1.9127	903	170
17	3-metil-4-propil ,2,5-furanodieno	253.147	6.5637	733	154
18	3,4-dimetol cis tetrahydro furano	261.247	4.6411	817	100
21	3-metil, 1-penteno	302.447	3.1406	739	84
22	2-metoxi-4-vinil fenol	319.947	3.5358	967	150
26	4-propil,1,3-bencenodiol	396.747	2.2582	796	152
31	6-acetil-2,5,8-trihidroxi, 1,4-naftoquinona	502.547	1.5011	721	248
32	N,N-dimetildodecanoamida	677.447	3.9143	935	227
33	2,4-bis(1-fenil etil), fenol	685.947	2.6645	796	302

Simbología :

T.R.= tiempo de retención

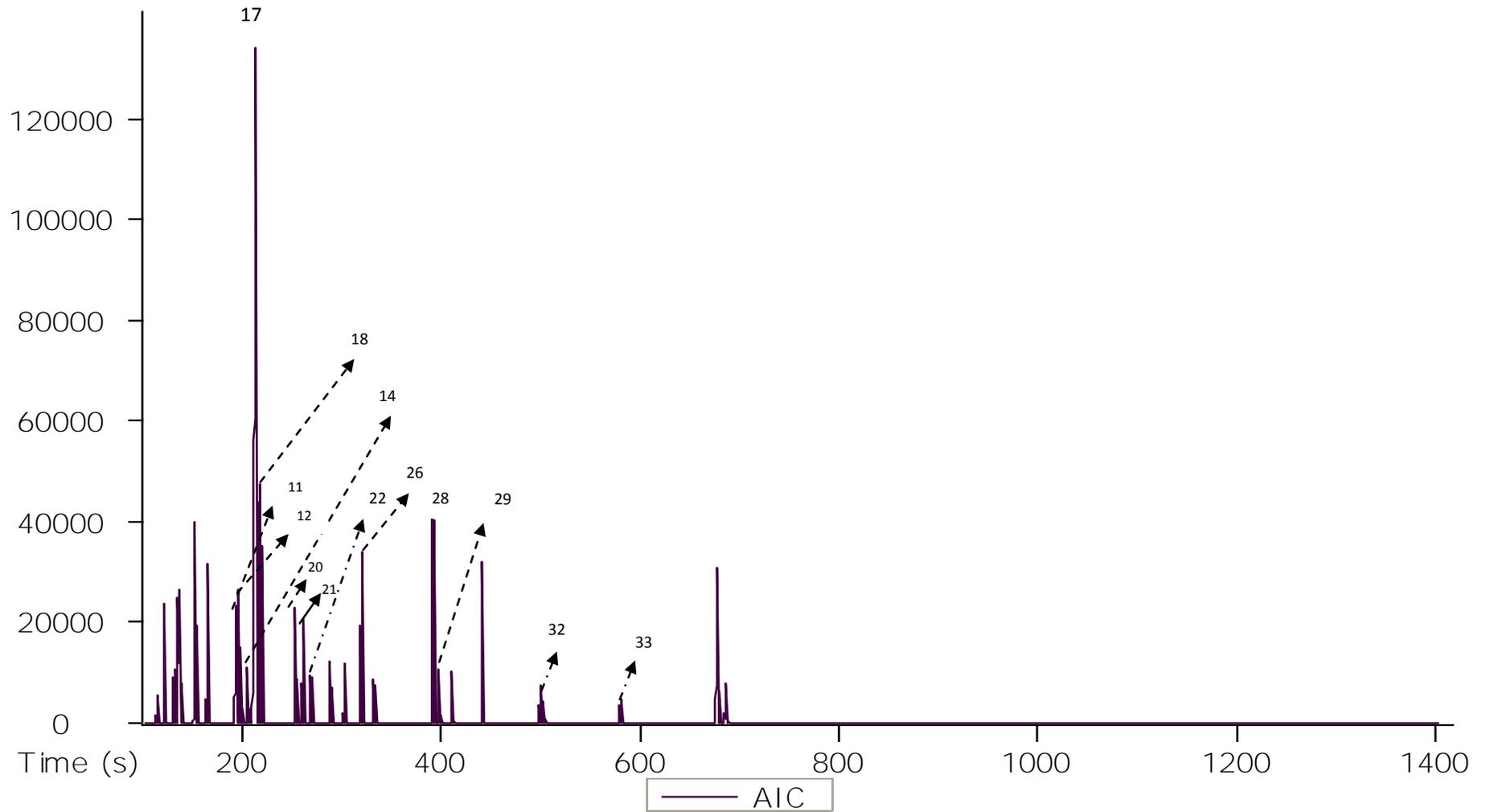
A= área en %

N.P.=Número de pico

S= Similitud

P.M. Peso molecular

FIGURA 5.- CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO ETÉREO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC.



COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN EL EXTRACTO DE DICLOROMETANO.

Para obtener el extracto de alcaloides, de una porción del extracto metanólico, se sometió a un tratamiento ácido-base en presencia de Zn, con el objetivo de reducir a los N-óxidos libres. En el cuadro 8, se muestran los componentes nitrogenados extraídos con diclorometano e identificados por Cromatografía de Gases masas de las hojas de *Calea urticifolia*, los catorce compuestos identificados representan el 48.8% del extracto etéreo obtenido.

CUADRO 8.- COMPONENTES EXTRAÍDOS CON DICLOROMETANO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* CON EL SISTEMA GASES-MASAS

N.P.	COMPUESTO	T.R	Á %	S	P.M
19	2-butanol	119.83	1.2706	925	74
4	2-butanol,3-metoxi	139.33	5.39	938	104
5	1,4-butanodiamina	150.93	4.6844	806	88
18	oxirano, (etoximetil)	197.53	1.4185	750	102
22	3-metil,4-hexen-2-ona	218.23	1.99	888	112
23	2-etil,1,3-dioxilano	221.23	2.0719	848	102
38	ácido, 2- [3-(1,1-dimetiletil)-1-oxoperidropirroló [1,2] [1,3] oxazol-7-il]-, métil ester acético	340.93	1.2144	677	255
46	4-metildocosano	491.03	3.3552	725	324
45	9,10-dimetiltriciclo [4.2.1.1(2,5)] -9,10-diol decano	485.43	1.377	724	196
48	2,5,5,8a-tetrametil-4-metileno-6,7,8,8a-tetrahidro- -4α-il hidroperóxido-4H,5H-cromeno	494.43	2.8979	696	238
49	aspidospermidina-3-carboxi, 2,3-didehidro-1-metil ester	498.73	3.6336	757	352
53	5,10-dietoxi-2,3,7,8-tetrahidro-1H,6H-dipirroló dipirazina.	544.83	1.3519	745	250
60	ácido ciclopropano, 2-bromo-4-fluorofenilo ester, carboxílico	730.23	10.775	842	258
55	acético ácido, 10-hidroximetil-6-metil-12,13-dioxa-triciclo [7.3.1.0(1,6)] tridec-5-il ester	662.53	7.3789	662	284

Simbología :

T.R.= tiempo de retención A= área en % N.P.=Número de pico S= Similitud
P.M. Peso molecular

El componente mayoritario del extracto de diclorometano de *Calea urticifolia* es el hidrocarburo ácido **ciclopropano, 2-bromo-4-fluorofenilo ester, carboxílico**, que se encuentra en un 10.77 %. A este compuesto le sigue el alcaloide **aspidospermidina-3-carboxi-2,3-didehidro-1-metil éster** (figura 6), en un 3.63 %, como constituyentes de importancia. Este se agrupa dentro de los alcaloides indólicos, del tipo aspidospermidina. De acuerdo con Waller y Nawacki (1978), este tipo de alcaloide esta presente en la familia Apocynaceae y no se tiene algún reporte en la familia Asteraceae y Compositae (Lawrence, 1973). Algunas estructuras similares de algunos alcaloides tienen efecto como fungicida y bactericida por ejemplo el 6,7 dihidrota bersonina y vincadiformina (William, 1961).

La identidad de este metabolito secundario y de los demás grupos presentes en el extracto de diclorometano se confirmó tanto en el cromatograma (figura 7) y en el espectro de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (figura 8), en estos dos figuras se corroboró la presencia del alcaloide **aspidospermidina-3-carboxi-2,3-didehidro-1-metil éster**. En el cromatograma se señala en el pico 49 y en el espectro, aparece en el pico en 396 (m/z^+), 338 con una abundancia de 15, 300 con (60), 278 con abundancia de 10, 251 con (20), 182 con abundancia de 30, 149 con (30), 122 con abundancia de 30 y 43 con (100).

De igual forma se analizó el **ácido, 2-[3-(1,1-dimetiletil)-1-oxoperidropirroló [1,2] [1,3] oxazol-7-il], métil ester acético**, compuesto nitrogenado presente en un 1.21%, seguido por el **10-dietoxi-2,3,7,8-tetrahidro-1H,6H-dipirroló dipirazina**, presente en un 1.35%

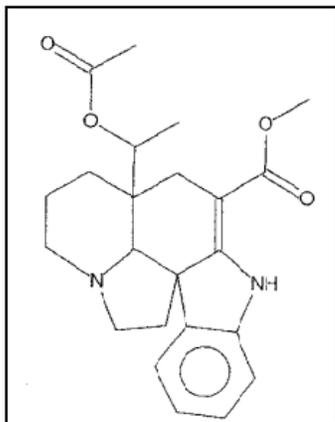


FIGURA 6. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL ALCALOIDE ASPIDOSPERMIDINA-3-CARBOXI-2,3-DIDEHIDRO-1-METIL ÉSTER

FIGURA 7.- CROMATOGRAMA DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC.

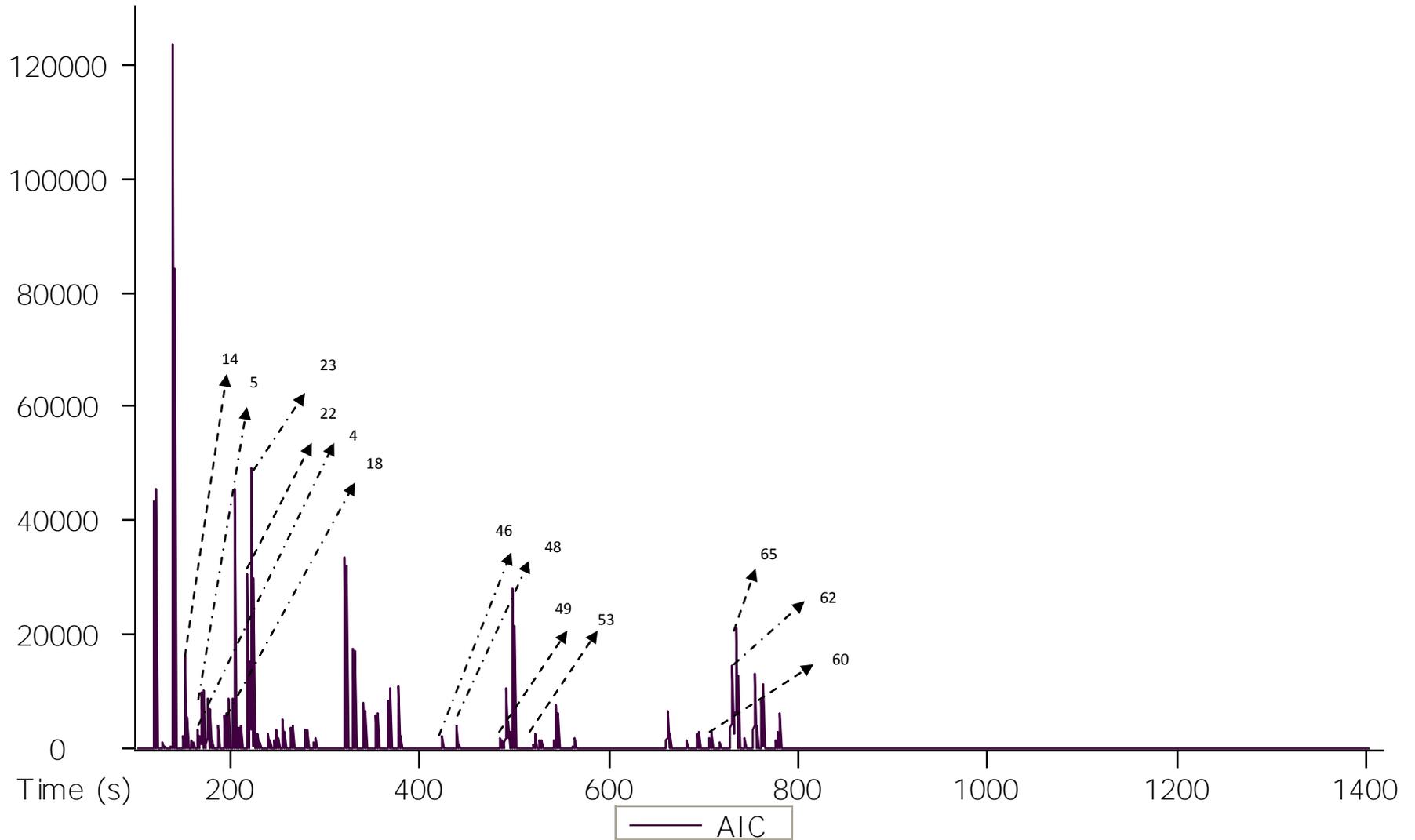
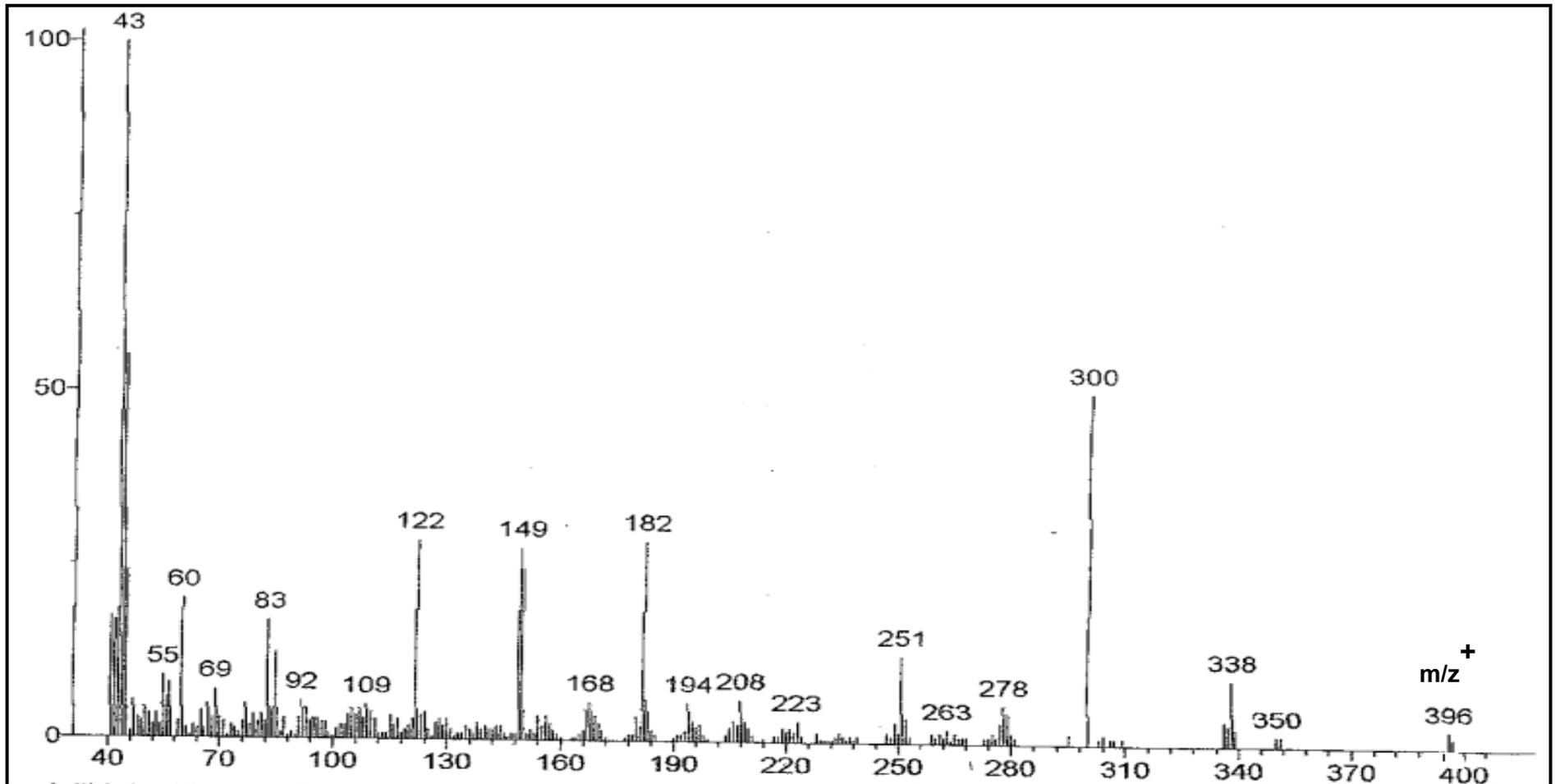


FIGURA 8. ESPECTRO DEL ALCALOIDE ASPIDOSPERMIDINA-3-CARBOXI-2,3-DIDEHIDRO-1-METIL ÉSTER EXTRACTO DE DICLOROMETANO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC.



En muy poca proporción se encuentra el alqueno **3-metil 4-hexen-2-ona**, con una proporción de 1.99 %, seguido por **2-etil,1,3-dioxilano** con un 2.07% y por los alcoholes **2-butanol**, **3-metoxi**, el cual se encuentra en 5.39 % y **2-butanol** con una proporción 1.27%, el **oxirano**, (**etoximetil**), en un 1.41 %. Seguido por la **1,4-butanodiamina** con un 4.68%. Asimismo por el **4-metildocosano**, presente en un 3.35%, seguido por el **9,10-dimetiltriciclo [4.2.1.1(2,5)] -9,10-diol decano**, en un 1.37 %, **2,5,5,8 α -tetrametil-4-metileno-6,7,8,8 α -tetrahidro-4 α -il hidroperóxido-4H,5H-cromeno**, presente en un 2.89 %. El **acético ácido**, **10-hidroximetil-6-metil-12,13-dioxa-triciclo [7.3.1.0(1,6)] tridec-5-il ester** esta presente en un 7.37%.

COMPUESTOS IDENTIFICADOS DE ACEITES ESENCIALES

PENTANO

En cuanto al rendimiento de los aceites esenciales, en la cuadro 9, se presentan los resultados, el que obtuvo mayor rendimiento fue el de pentano (24%) y con éter etílico (16%).

**CUADRO 9.- PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE ACEITES ESENCIALES DE LAS HOJAS
CALEA URTICIFOLIA MILL DC.**

ESTRUCTURA	PESO (g)	Cantidad de disolvente	Volumen del aceite esencial (mL)	% de rendimiento del aceite esencial
Hojas	50 g	50 mL de pentano	12	24
		50 mL de éter etílico	8	16

En el cuadro 10, se enlistan los 8 constituyentes que se identificaron en el aceite esencial extraído con pentano, de los cuales, el componente mayoritario fue el **α -bisaboleno** en un 6.67 %, presente este metabolito en *Calea rotundifolia* (Bohlmann *et al.*, 1981 e) seguido por el **α -pineno**, el cual representa el 5.8 %. Barbachyn *et al.*, (1993), concluyeron que los monoterpenos, son compuestos con potente actividad antibacteriana.

**CUADRO 10.- COMPONENTES EXTRAÍDOS CON PENTANO DEL ACEITE ESENCIAL DE
Calea urticifolia DETECTADO POR EL SISTEMA GASES-MASAS**

N.P	COMPUESTO	T.R	Á	S	P.M.
1	2-hexenal	109.7	1.25	965	98
2	α -pineno	1445.	5.8	945	136
12	cis 5-eteniltetrahydro- $\alpha,\alpha,5$ -trimetil-, 2-furano metanol	216.7	1.29	933	170
32	humuleno	389.3	3.16	878	204
36	nerolidol	412.1	1.45	954	222
37	óxido de cariofileno	422	4.38	936	220
43	α -bisaboleno	457.9	6.67	929	222
45	3-amino-4-metil-6,7-dimetoxiquinolina	502.9	2.99	718	218

Simbología :

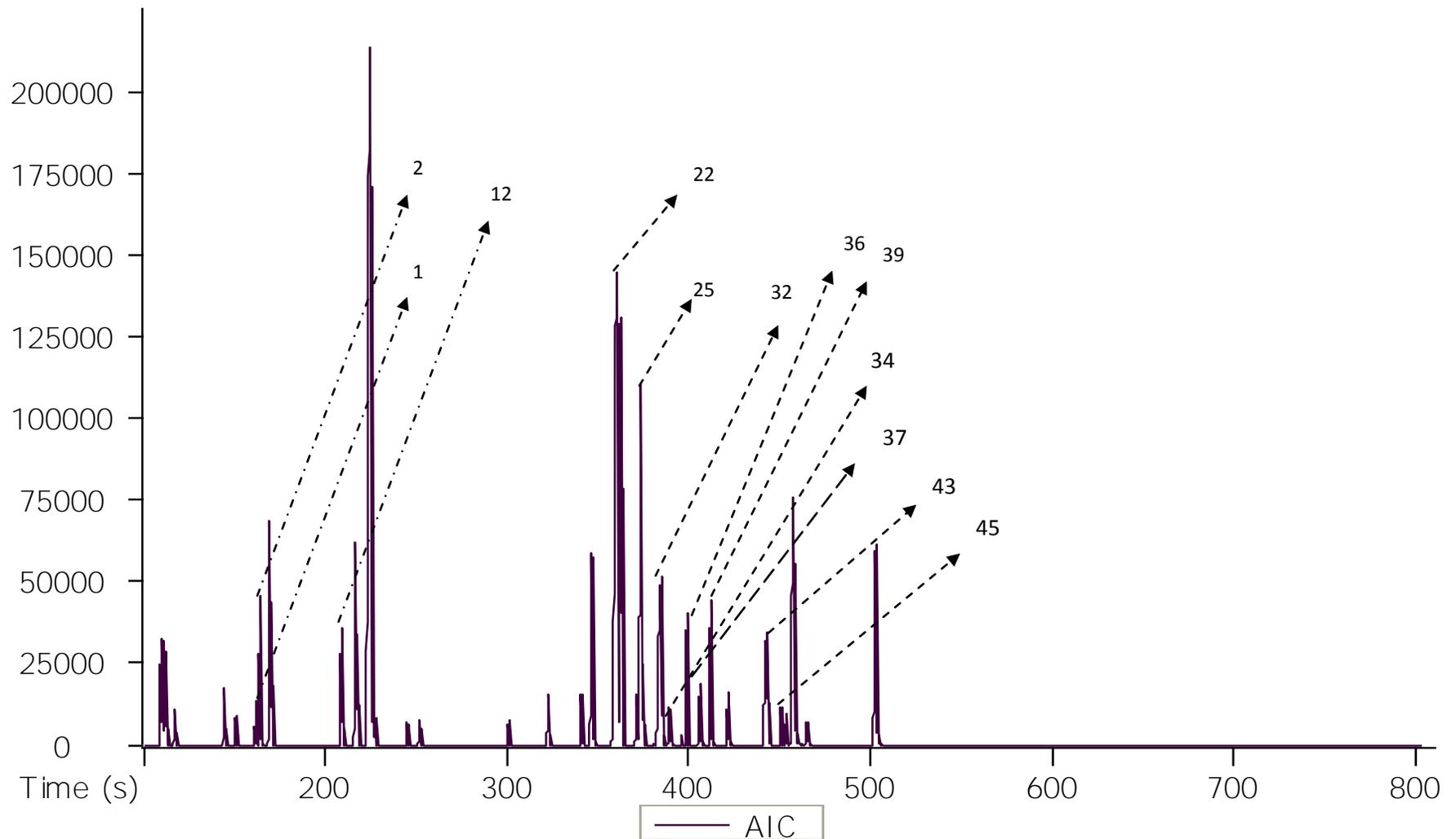
T.R.= tiempo de retención A= área en % N.P.=Número de pico S= Similitud
P.M. Peso molecular

El 2-hexenal presente en un 1.25%, seguido por el sesquiterpeno **humuleno** se encuentra en un 3.16 % y el **óxido de cariofileno**, se encuentra en una proporción de 4.38 %, los cuales según Bailac (*et al.*, 2000) tienen propiedades antibacterianas, seguido por el **nerolidol** con un 1.45 %, cuyo compuesto tiene la mismas propiedades (Fernández *et al* 2008). Este compuesto se presenta en *Calea pilosa* (Bohlmann *et al.*,1981 c y d) . El **cis 5-eteniltetrahydro- $\alpha,\alpha,5$ -trimetil-2-furano metanol** , con una proporción de 1.29 %, Ogunwande (*et al.*, 2005),le atribuye actividad antibacteriana los furanodienos.

Se detectaron α -pineno y epóxido de cariofileno en estudios realizados con *C. teucrifolia* (Gardn) Baker, *C. morii*, *C rotunfolia*, *C hymenolepis*, *C. villosa* Bohlmann, (*et al.*, 1981 a y b) y Bohlmann, (*et al.*, 1982 d, g y j) y *C. prunifolia* (Castro V ,1984).

Thorarensen (*et al.*, 2007), mencionan que las aminos cuentan con un gran potencial antibacterial, en nuestro análisis, se encontró al **3-amino-4-metil-6,7-dimetoxiquinolina**, en una proporción del 2.99 %.

FIGURA 9. CROMATOGRAMA DEL ACEITE ESENCIAL EXTRAIDO CON PENTANO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC.



ÉTER ETILICO

En el cuadro 11, se muestran los componentes extraídos con éter etílico de los aceites esenciales de las hojas de *Calea urticifolia* con el sistema gases-masas. De los quince principales compuestos oxigenados identificados, el componente mayoritario del extracto etéreo de *Calea urticifolia* es el **α -bisaboleno**, en cual se encuentra en un 10.61 %, el cual se encuentra en mayor proporción, comparado con el extracto de pentano, (Arango *et al.*, 2009; Bohlmann *et al.*, 1981; Castro V, 1984).

Este componente se encuentra acompañado por el **cariofileno** en un 5.19 %, reportado por Flach *et al.*, (2002), acompañado del **elemeno** con un 1.93 %, de acuerdo a lo reportado con Bailac (*et al.*, 2000), presenta propiedades antibacterianas. En muy poca proporción se encuentra, el 1H-3a,7-metanoazuleno, 2,3,6,7,8,8a-hexahidro-1,4,9,9-tetrametil en una proporción de 1.62 %, seguido por el **3-amino-4-metil-6,7-dimetoxiquinolina**, el cual se encuentra en un 1.90%. Kumar (*et al.*, 2009), en un estudio de la evaluación de antibacteriana de 2-amino-4H-pirano y el 2-amino-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-4H-cromeno, demostró que las aminas son efectivas como antimicrobiano. Acompañado por el **naftaleno, 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metil etil)** en un 2 %, asimismo por el **α -cadinol**, con un 1.29 %, Shafaghat A. (2009), lo reporta como un compuesto con actividad antibacteriana.

El **trans longipinocarveol**, se haya en una proporción de 1.3 %, Boutaghane *et al.* (2008), demostró que dicho compuesto es un buen antibacteriano con potencial para inhibir la actividad antibacteriana sobre diversas cepas. A dicho compuesto le sigue el **óxido de aromadendreno** en una proporción de 1.12 %. Ugur *et al.*, probó la actividad antibacteriana de dicho compuesto y encontraron que el oxido de aromadendreno fue el mejor compuesto antibacteriano. En *C. platylepis* Sch Bip ex Baker, se encuentra presente el (+)-4 α ,7 β -aromadendranediol, estructura similar a la de nuestro compuesto.

CUADRO 11.- COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN EL ACEITE ESENCIAL DE ÉTER ETÍLICO DE *Calea urticifolia* DETECTADO POR EL SISTEMA GASES-MASAS

N.P	COMPUESTO	T. R.	Á%	S	P.M
26	cariofileno	362.947	5.1951	930	204
34	elemeno	390.147	1.9328	813	204
43	1H-3a,7-metanoazuleno, 2,3,6,7,8,8a-hexahidro-1,4,9,9-tetrametil	402.247	1.6298	688	204
52	naftaleno, 1,2,3,5,6,8 α -hexahidro-4,7-dimetil-1- (1-metil etil)	443.147	2.007	830	204
53	α -cadinol	448.647	1.2919	923	222
54	trans longipinocarveol	449.647	1.3788	618	220
58	α -bisaboleno	460.747	10.616	888	222
63	oxido de aromadendreno	473.047	1.1217	830	220
64	3-amino-4-metil-6,7-dimetoxiquinolina	503.147	1.9015	720	218

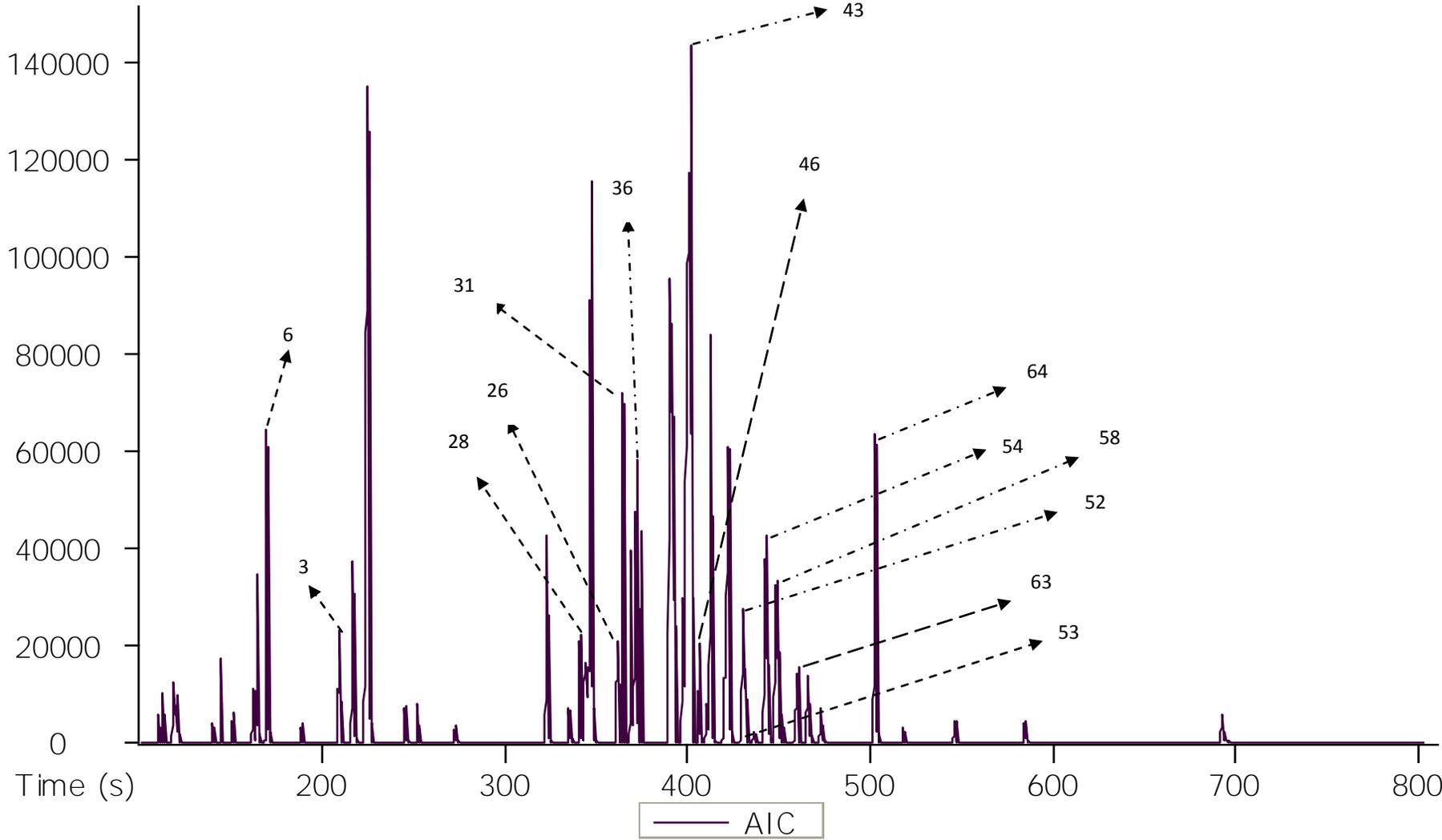
Simbología :

T.R.= tiempo de retención A= área en % N.P.=Número de pico S= Similitud

P.M. Peso molecular

Flach *et al.*, (2002), estudiaron los aceites esenciales de las flores y hojas con éter dimetílico de *Calea clematidea*, encontrando los siguientes compuestos: clemateol, 2,5,5-trimetilhepta-3--6-dien-2-ol o comúnmente conocido como alcohol yomogi conocido como el (3E)-2,5,5-trimetilhepta-3,6-dien-2-ol, α -terpineno, *o*-cimeno, *m*-cimeno, timol metil éter, carvacrol timol metílico, *o*-vainillina, α -gurjuneno, cariofileno (E), 2,5-dimetoxi-*p*-cimeno, 6-metil- γ -ioneno- (E), germacrano B, dehidro-apofarnesol (Z), espatulenol.

FIGURA 10.- CROMATOGRAMA DEL ACEITE ESENCIAL EXTRAIDO CON ÉTER ETÍLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia*



RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA PRUEBA DE DIFUSIÓN.

Como se había mencionado anteriormente, los resultados de esta prueba de sensibilidad antimicrobiana presentados para *Calea urticifolia* son los primeros de su tipo. El presente trabajo, valida el uso tradicional de dicha especie para las enfermedades gastrointestinales, epidérmicas y respiratorias. Es posible decir que dichos resultados muestran una alta actividad bactericida, de acuerdo a lo reportado por Herrera (2004) que un halo mayor de 6 mm se debe a una actividad antibacteriana alta, y Domínguez (1979) explica que si los extractos utilizados no son puros el efecto se debe al sinergismo de los metabolitos secundarios presentes en los extractos.

Varios compuestos con estructuras semejantes a las de los metabolitos secundarios encontrados en la extracción ácido base del extracto metanólico (cuadro 12) se reportan por diferentes autores con actividad antibacteriana: como las furanonas según lo reportado por Ávalos *et al.* (2009) y Baveja *et al.* (2004), de igual forma Ogunwande *et al.* (2005), mencionan a los furanodienos, Xu *et al.* (2003) encontró al benzenodiol, Kuklinski, (2000) y Domingo y López Brea (2003) a los fenoles, estos últimos también presentes en el extracto de diclorometano. En este extracto también se encuentra un alcaloide indólico, del tipo aspidospermidina, según lo reportado por Waller y Nowacki. Arango (*et al.*, 1979), mencionan al óxido de cariofileno y Thorarensen (*et al.*, 2007) a las amidas.

CUADRO 12. METABOLITOS SECUNDARIOS DEL EXTRACTO METANÓLICO CON EFECTO ANTIMICROBIANO

Extracto etéreo	Extracto de diclorometano
• 4-(1-metiletoxi),1-butanol	• 2-butanol
• 3-metil,2-ciclopentenona	• 2-butanol,3-metoxi
• 5-etil ,2(5H)-furanona	• 1,4-butanodiamina
• hidroxilactona del ácido undecanoico	• oxirano, (etoximetil)
• cis 5-eteniltetrahydro- α,α ,5-trimetil, 2-furano metanol	• 3-metil,4-hexen-2-ona
• 3-metil-4-propil ,2,5-furanodieno	• 2-etil,1,3-dioxilano
• 3,4-dimetol cis tetrahydro furano	• ácido, 2-[3-(1,1-dimetiletil)-1-oxoperidropirrol [1,2] [1,3] oxazol-7-il]-, metil ester acético
• 3-metil, 1-penteno	• 4-metildocosano
• 2-metoxi-4-vinil fenol	• 9,10-dimetiltriciclo [4.2.1.1(2,5)] -9,10-diol decano
• 4-propil,1,3-benzenodiol	• 2,5,5,8a-tetrametil-4-metileno-6,7,8 α -tetrahydro- -4 α -il hidroperóxido-4H,5H-cromeno
• 6-acetil-2,5,8-trihidroxi, 1,4-naftoquinona	• aspidospermidina-3-carboxi, 2,3-didehidro-1-metil ester
• N,N-dimetildodecanoamida	• 5,10-dietoxi-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipirrol dipirazina.
• 2,4-bis(1-fenil etil), fenol	• acido ciclopropano, 2-bromo-4-fluorofenilo ester, carboxílico
	• acético ácido, 10-hidroximetil-6-metil-12,13-dioxa-triciclo [7.3.1.0(1,6)] tridec-5-il ester

Los resultados del análisis de varianza se manejaron con una significancia de $P = 0.05$. Los datos obtenidos de los halos de inhibición de cada una de las siete cepas bacterianas se aprecian en la tabla 13. La concentración a la cual fueron más sensibles en el extracto hexánico las bacterias fueron a 10000 $\mu\text{g/mL}$, excepto para *Bacillus cereus*, que fue a 1000 $\mu\text{g/mL}$ y para *Shigella flexneri*, a 100 $\mu\text{g/mL}$. Para el extracto metanólico, la concentración a la cual fueron más sensibles las bacterias fue a 10000 $\mu\text{g/mL}$, excepto para *Shigella flexneri*, a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

CUADRO 13. RESULTADOS CUANTITATIVOS DE LA PRUEBA DE DIFUSIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE LAS HOJAS *Calea urticifolia*

Bacteria	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Halos de inhibición del extracto hexánico (mm)	Halos de inhibición del extracto metanólico (mm)
<i>B. c.</i>	10000	(10.22 \pm 0.22)	(17.88 \pm 0.67)
	1000	(17.55 \pm 0.29)	(16.11 \pm 0.87)
	100	(14.66 \pm 0.33)	(12.22 \pm 0.49)
	Cloramfenicol	(22.22 \pm 2.63)	(19.00 \pm 1.31)
<i>B. s.</i>	10000	(18.88 \pm 0.35)	(17.55 \pm 1.27)
	1000	(15.33 \pm 0.16)	(14.88 \pm 1.02)
	100	(10.33 \pm 0.23)	(11.88 \pm 0.65)
	Cloramfenicol	(20.88 \pm 0.80)	(18.33 \pm 2.20)
<i>E. c.</i>	10000	(18.56 \pm 0.24)	(21.77 \pm 1.37)
	1000	(13.00 \pm 0.40)	(16.33 \pm 0.33)
	100	(13.00 \pm 0.57)	(11.44 \pm 0.33)
	Cloramfenicol	(22.78 \pm 0.87)	(19.44 \pm 1.73)
<i>S. a.</i>	10000	(16.33 \pm 0.52)	(20.22 \pm 0.99)
	1000	(13.00 \pm 0.79)	(16.11 \pm 0.48)
	100	(12.88 \pm 0.84)	(12.44 \pm 0.60)
	Cloramfenicol	(14.22 \pm 1.36)	(21.77 \pm 1.78)
<i>S. e.</i>	10000	(21.44 \pm 1.49)	(19.55 \pm 1.24)
	1000	(9.88 \pm 0.42)	(15.33 \pm 0.47)
	100	(10.77 \pm 0.54)	(10.77 \pm 0.36)
	Cloramfenicol	(14.88 \pm 0.11)	(19.66 \pm 2.03)

Nota: Los datos presentados para cada una de las cepas son la media y el error estándar.

El cloranfenicol se manejo a 30 $\mu\text{g/mL}$

Simbología: *B.c* (*Bacillus cereus*), *B.s* (*Bacillus subtilis*), *E.c* (*Escherichia coli.*), *S.a* (*Staphylococcus aureus*) y *S.e* (*Sthaphylococcus epidermis*)

Cuadro 13. Continuación

Bacteria	Concentración (µg/mL)	Halos de inhibición del extracto hexánico (mm)	Halos de inhibición del extracto metanólico (mm)
S. t.	10000	(17.77± 0.87)	(19.77± 1.05)
	1000	(14.55± 0.44)	(16.55± 0.44)
	100	(10.00± 0.00)	(12.22± 0.77)
	Cloramfenicol	(18.55± 0.91)	(19.66± 1.47)
S. f.	10000	(21.66±0.83)	(15.88± 1.20)
	1000	(16.66± 0.83)	(16.11± 0.58)
	100	(32.77±0.087)	(11.55± 0.29)
	Cloramfenicol	(22.77± 1.21)	(18.88± 1.62)

Nota: Los datos presentados para cada una de las cepas son la media y el error estándar.

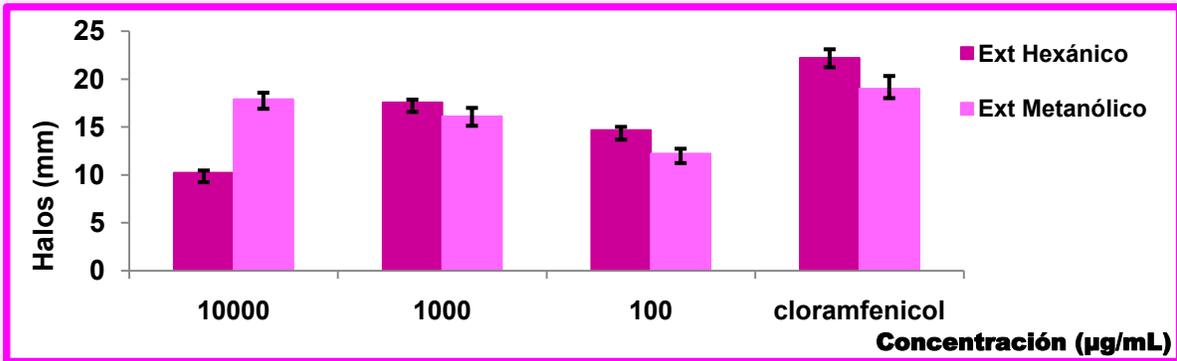
El cloramfenicol se maneja a 30 µg/mL

Simbología: *Salmonella typhi* (S. t.) y *Shigella flexneri* (S. f)

En esta prueba de sensibilidad antimicrobiana, en la Gráfica 1 se muestra el comportamiento de *Bacillus cereus* ante los extractos hexánico y metanólico. A 1000 µg/mL del extracto hexánico, es más sensible *Bacillus cereus*. Este evento se conoce como "El fenómeno paradójico o de Eagle", el cual consiste en que a una concentración menor de un extracto, hay una mayor destrucción de bacterias, entre las posibles causas por las que se presenta dicho evento puede ser la producción de artefactos al esterilizar el medio de cultivo y las impurezas presentes en el antibiótico o dado el caso en el extracto (Eagle y Musselman, 1948), las impurezas se relacionan al sinergismo de los metabolitos secundarios presentes en los extractos, caso expuesto por Domínguez (1979). Los resultados estadísticos indican que hay diferencia significativa entre las tres concentraciones del extracto hexánico (10000, 1000 y 100 µg/mL) y el control positivo y las tres tienen menor actividad que el cloramfenicol, el cual es más eficaz que el extracto.

Respecto al extracto metanólico, la concentración de 10000 µg/mL, es a la cual es más sensible *Bacillus cereus*, el diámetro promedio de sus halos de inhibición fue de 17.88 mm, comparados con su control positivo (19 mm). Al comparar estadísticamente los datos obtenidos el cloramfenicol tiene una mayor capacidad bactericida que el extracto metanólico, aunque el extracto metanólico es activo en todas las concentraciones, ya que inhibe el crecimiento de *Bacillus cereus*.

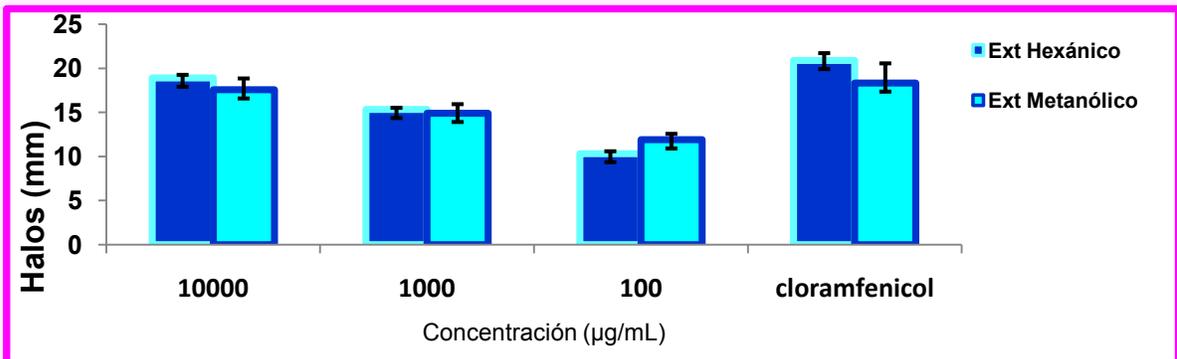
GRÁFICA 1.- INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *Bacillus cereus* CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC.



La concentración de 10000 µg/mL del extracto hexánico en *Bacillus subtilis*, dio los mayores halos de inhibición (18.88 mm), comparados con las otras concentraciones de extracto pero el control positivo presentó mayor actividad (20.88 mm). Existe diferencia significativa en las tres concentraciones del extracto hexánico, estas son activas contra *B. subtilis*, pero el cloramfenicol tiene mayor efecto (gráfica 2).

Al igual que el extracto hexánico, en el metanólico, la concentración de 10000 µg/mL es a la que es más sensible dicho patógeno, mostrando así diámetros promedio de sus halos de inhibición de 17.55 mm, comparado con su control (18.33 mm), pero la actividad bactericida del extracto metanólico a las concentraciones de 1000 y 10000 µg/mL no presentan diferencia significativa con la actividad del cloramfenicol, con lo que se deduce que tienen el mismo efecto el cloramfenicol y las concentraciones 10000 y 1000 µg/mL.

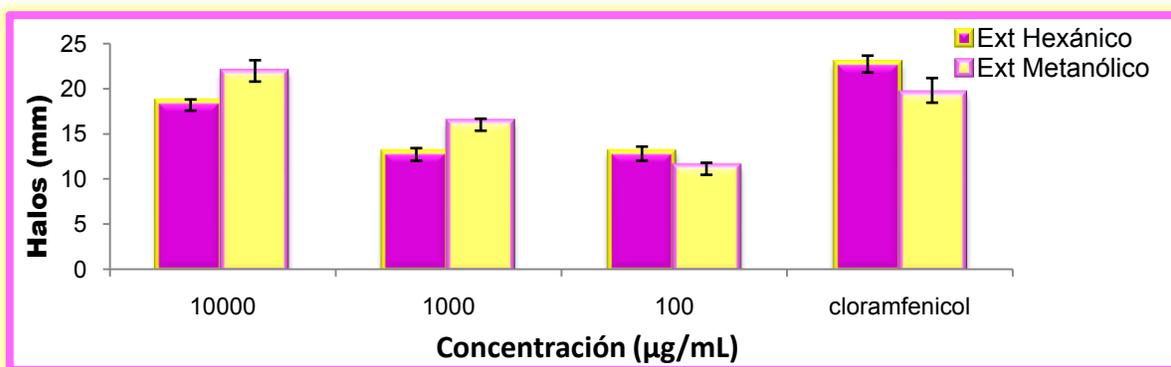
GRAFICA 2.- INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *Bacillus subtilis* CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC.



Para *Escherichia coli*, en el extracto hexánico, el halo de inhibición mayor fue de 18.53 mm a la concentración de 10000, y el halo del control positivo fue de 19.40 mm (gráfica 3). Estadísticamente las tres concentraciones con respecto al cloramfenicol presentan diferencia significativa, por lo cual se observa que el extracto hexánico si tiene efecto bactericida en sus tres concentraciones, pero es inferior al efecto del cloramfenicol. En cuanto al extracto metanólico, la inhibición mayor fue de 21.77 mm a 10000 y su control el cual fue de 19.44 mm. El extracto metanólico tiene la misma actividad bactericida en sus dos concentraciones de 1000 y 10000 µg/mL que a su vez es igual a la del cloramfenicol.

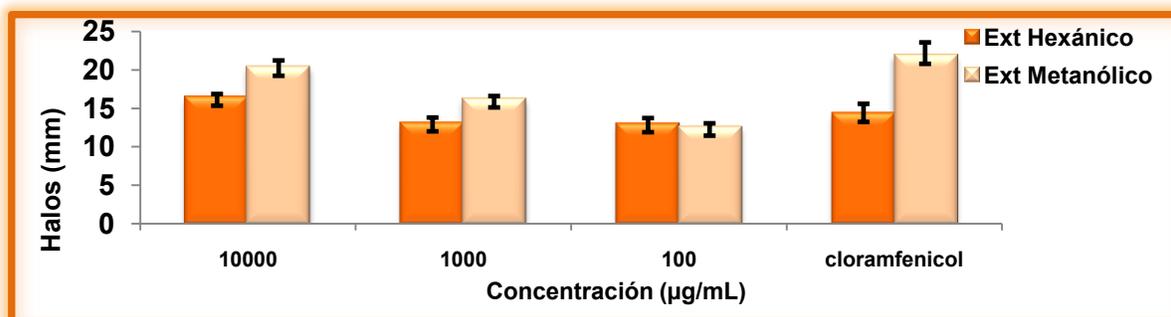
Mendes y colaboradores (2004), realizaron un estudio de la actividad antibacteriana con extracto de diclorometano, obtenido de toda la planta. Al probar los compuestos puros en *Escherichia coli* obtuvieron halos de inhibición de 7 y 8 mm, por lo que se visualiza que *Calea urticifolia*, se obtuvo un mejor resultado.

GRÁFICA 3.- INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *Escherichia coli* CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC



En la gráfica 4, se observa la actividad antibacteriana de *Staphylococcus aureus*, la cual no presenta diferencia significativa entre ninguna de sus concentraciones y el cloramfenicol, por lo que la eficacia del extracto hexánico comparada con su control es la misma. El extracto metanólico, en todas sus concentraciones presenta actividad bactericida contra *S. aureus*, pero en la concentración de 10000 su actividad es igual a la del cloramfenicol. En el 2004, Mendes y colaboradores, reportaron que con compuestos puros a concentraciones de 50 y 1000 µg/mL de *Calea platylepis*, la inhibición de sus halos en *Staphylococcus aureus* fue de 6 y 7 mm, lo *Calea urticifolia*, a la concentración de 1000 µg/mL da un mejor resultado.

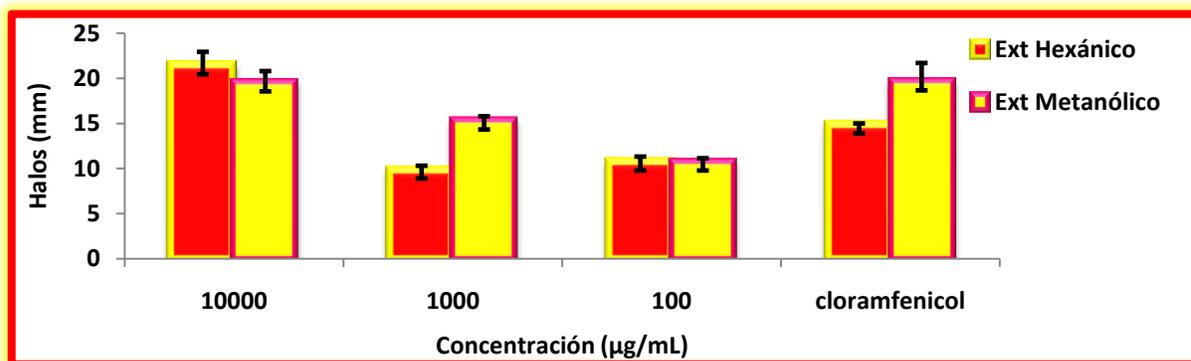
GRÁFICA 4.- INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *Staphylococcus aureus* CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC



Para *Staphylococcus epidermis*, en el extracto hexánico, el halo de inhibición mayor fue de 21.44 mm a la concentración de 10000, y el halo del control positivo fue de 14.88 mm (gráfica 5). En sus tres concentraciones (10000,1000 y 100 µg/mL), presenta diferencia significativa, pero en la de 10000 µg/mL, es la que tiene mayor efecto que el cloramfenicol, ya que muestra una actividad bactericida 1.44 veces más alta.

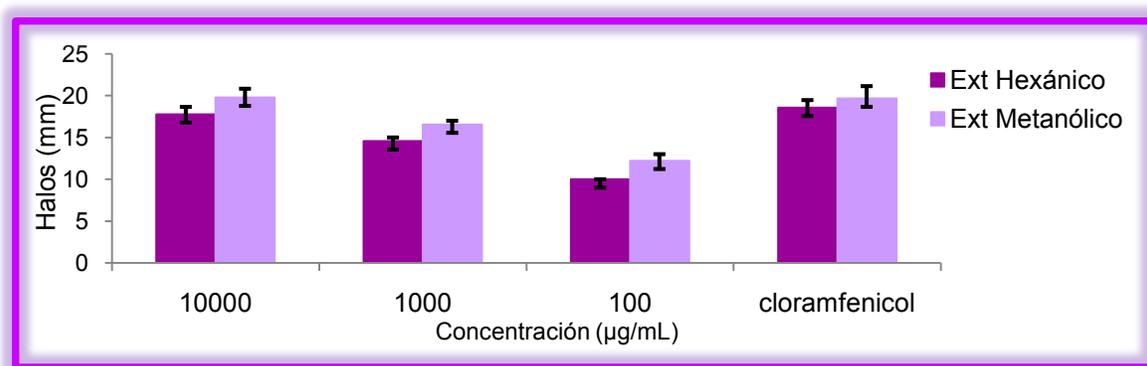
Los resultados obtenidos en la prueba del extracto metanólico, el halo de inhibición mayor fue de 19.55 mm a la concentración de 10000, y el halo del control positivo fue de 19.66 mm. Estadísticamente, la concentración de 10000 µg/mL, es la que tiene el mismo efecto bactericida que el antibiótico. En el 2004, Mendes y colaboradores, en la prueba con *Staphylococcus epidermis*, no obtuvieron la inhibición de su crecimiento.

GRÁFICA 5.- INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *Staphylococcus epidermis* CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC



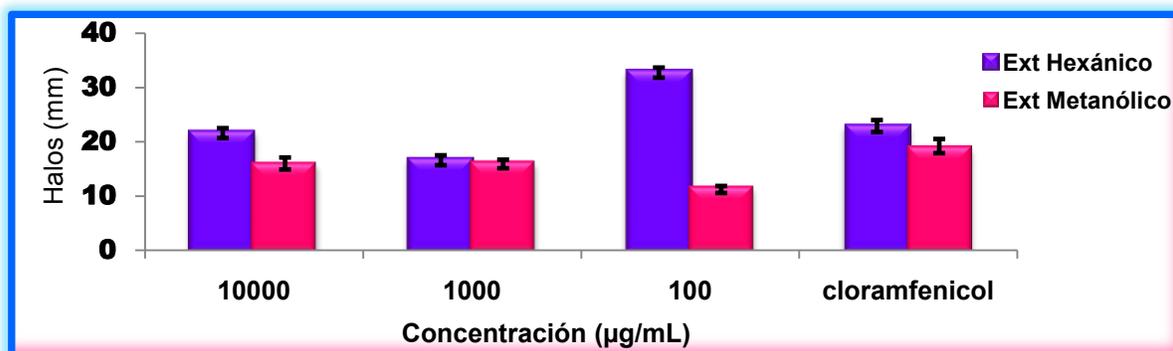
Las concentraciones tanto del extracto hexánico como el metanólico aplicadas a *Salmonella tify* se muestran en la gráfica 6. Estadísticamente el extracto hexánico en la concentración de 10000 $\mu\text{g/mL}$ (17.77 mm) es la única que presenta la misma actividad bactericida que el cloramfenicol (17.77 mm). La 1000 y 100 $\mu\text{g/mL}$ presenta una actividad menor comparada con el control. El extracto metanólico, en sus tres concentraciones presenta actividad bactericida, pero a la concentración de 10000 $\mu\text{g/mL}$, presenta la misma actividad bactericida que el cloramfenicol (19.77 mm VS 19.66 mm).

GRAFICA 6.- INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *Salmonella tify* CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC



En la gráfica 7, se muestran los resultados obtenidos en la prueba de sensibilidad *Shigella flexneri*, 100 $\mu\text{g/mL}$ fue la concentración que proporcionó los mayores halos de inhibición en esta cepa (32.77 mm), comparado con el control (22.67 mm). Dicho efecto se relaciona con lo expuesto por Eagle y Musselman, (1948). Estadísticamente presenta una actividad 1.43 veces más alta que la actividad bactericida del cloramfenicol. En cuanto al extracto metanólico, los mayores halos de inhibición en esta cepa fueron de 15.88 mm en 10000 $\mu\text{g/mL}$ y de 18.88 mm por su control, Estadísticamente, la concentración de 10000 $\mu\text{g/mL}$ es la que presenta el mismo efecto bactericida que el cloramfenicol sobre dicho patógeno.

GRÁFICA 7.- INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *Shigella flexneri* CAUSADOS POR EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC



RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA PRUEBA DE DILUCIÓN.

Se llevó a cabo la prueba de dilución en líquido, con el fin de realizar una comparación con el ensayo de difusión en agar. Para el extracto hexánico, presentó actividad antimicrobiana a la concentración de 10000 µg/mL en *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *subtilis*. Para *Staphylococcus aureus* y *epidermis*, *Salmonella tiphy* y *Shigella flexneri* en 10000 µg/mL y 1000 µg/mL, la concentración de 100 no mostró actividad antibacteriana. Comparada con la prueba de difusión, en dicho ensayo, en cada una de sus concentraciones se inhibió el crecimiento. Para el extracto metanólico, en la prueba de dilución fue activo en todas las concentraciones, excepto para *Staphylococcus aureus* y *epidermis*, comparada con la prueba de difusión, el extracto metanólico fue activo en cada una de sus concentraciones.

CUADRO 14.- RESULTADOS CUANTITATIVOS DE LA PRUEBA DE DILUCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia*

Bacteria	Concentración (µg/mL)	Absorbancias de la inhibición del extracto hexánico (nm)	Absorbancias de la inhibición del extracto metanólico (nm)
B. c.	10000, t0	(2.814 ± 0.003)	(0.409 ± 0.092)
	10000,t1	(2.381 ± 0.011)	(1.817 ± 0.086)
	1000, t0	(0.052 ± 0.005)	(0.399 ± 0.048)
	1000,t1	(0.218 ± 0.013)	(0.243 ± 0.011)
	100, t0	(-0.031 ± 0.001)	(0.139 ± 0.029)
	100,t1	(0.058 ± 0.006)	(0.035 ± 0.003)
	Caldo, t0	(-0.007 ± 0.001)	(0.376 ± 0.124)
	Caldo,t1	(0.476 ± .015)	(0.585 ± 0.120)
	Cloramfenicol,t0	(-0.022 ± 0.002)	(0.046 ± 0.012)
	Cloramfenicol,t1	(-0.007 ± 0.002)	(0.005 ± 0.001)
	B. s.	10000, t0	(2.78 ± 0.008)
10000,t1		(0.46 ± 0.057)	(1.68±0.043)
1000, t0		(0.03 ± 0.003)	(0.40± 0.047)
1000,t1		(0.20 ± 0.01)	(0.24±0.008)
100, t0		(-0.02 ± 0.001)	(0.21±0.054)
100,t1		(0.07 ± 0.006)	(0.06±0.005)
Caldo, t0		(-0.02 ± 0.002)	(0.27±0.073)
Caldo,t1		(1.03 ± 0.038)	(0.67± 0.097)
Cloramfenicol,t0		(-0.02 ± 0.002)	(0.004±0.000)
Cloramfenicol,t1		(-0.005 ± 0.0008)	(0.059±0.009)

Nota: Los datos presentados para cada una de las cepas son la media y el error estándar.

El Cloramfenicol se manejo a 30 µg/mL

Simbología: **B. c.** = *Bacillus cereus* **B.s.** = *Bacillus subtilis*

CUADRO 14.- CONTINUACIÓN

E.c.	10000, t0	(0.86± 0.002)	(1.65± 0.096)
	10000,t1	(0.27±0.009)	(1.495±0.101)
	1000, t0	(-0.005±0.000)	(0.403± 0.036)
	1000,t1	(0.05±0.006)	(0.245±0.007)
	100, t0	(-0.003±0.000)	(0.204±0.039)
	100,t1	(0.005± 0.001)	(0.06± 0.008)
	Caldo, t0	(-0.014± 0.0008)	(0.274± 0.079)
	Caldo,t1	(0.476±0.015)	(0.718±0.084)
	Cloramfenicol,t0	(-0.017±0.001)	(0.047± 0.007)
	Cloramfenicol,t1	(-0.007±0.002)	(0.006±0.0009)
	S.a	10000, t0	(2.607±0.003)
10000,t1		(0.596±0.062)	(1.923±0.036)
1000, t0		(0.934±0.007)	(0.274±0.010)
1000,t1		(0.461± 0.037)	(0.57±0.057)
100, t0		(-0.024± 0.001)	(0.089±0.018)
100,t1		(0.070± 0.006)	(0.397± 0.031)
Caldo, t0		(0.006± 0.0007)	(0.47±0.171)
Caldo,t1		(0.402± 0.031)	(0.844±0.207)
Cloramfenicol,t0		(0.036±0.0009)	(0.040±0.009)
Cloramfenicol,t1		(0.020±0.0029)	(0.014±0.002)
S.e		10000, t0	(2.454± 0.010)
	10000,t1	(0.540±0.022)	(1.923± 0.036)
	1000, t0	(0.716±0.033)	(0.318±0.014)
	1000,t1	(0.414±0.040)	(0.627±0.044)
	100, t0	(0.1002±0.002)	(0.073±0.006)
	100,t1	(0.171±0.011)	(0.436±0.048)
	Caldo, t0	(0.037± 0.005)	(0.402± 0.157)
	Caldo,t1	(0.208±0.011)	(0.893±0.182)
	Cloramfenicol,t0	(0.0342±0.007)	(0.0409±0.010)
	Cloramfenicol,t1	(0.007±0.001)	(0.021±0.008)
	S. t	10000, t0	(2.660±0.004)
10000,t1		(0.601±0.064)	(1.513±0.151)
1000, t0		(0.952±0.003)	(0.360±0.049)
1000,t1		(0.393±0.042)	(0.220±0.011)
100, t0		(0.193±0.001)	(0.172± 0.036)
100, t0		(0.16± 0.031)	(0.046±0.009)
100,t1		(0.108±0.006)	(0.316± 0.121)
Caldo, t0		(0.357±0.009)	(0.734±0.093)
Caldo,t1		(0.088± 0.002)	(0.059± 0.007)
Cloramfenicol,t0		(0.0187± 0.007)	(0.018±0.005)
Cloramfenicol,t1			
S.f	10000, t0	(2.744±0.005)	(2.117±0.133)
	10000,t1	(0.702±0.031)	(1.933±0.075)
	1000, t0	(0.562±0.006)	(0.334±0.019)
	1000,t1	(0.469± 0.053)	(0.258±0.012)
	100, t0	(0.081±0.003)	(0.291±0.061)
	100,t1	(0.233±0.005)	(0.085±0.010)
	Caldo, t0	(-0.009±0.002)	(0.228±0.078)
	Caldo,t1	(0.66± 0.054)	(0.892±0.161)
	Cloramfenicol,t0	(-0.088±0.047)	(0.125±0.0786)
	Cloramfenicol,t1	(0.005±0.0007)	(0.012±.001)

Nota: Los datos presentados para cada una de las cepas son la media y el error estándar.

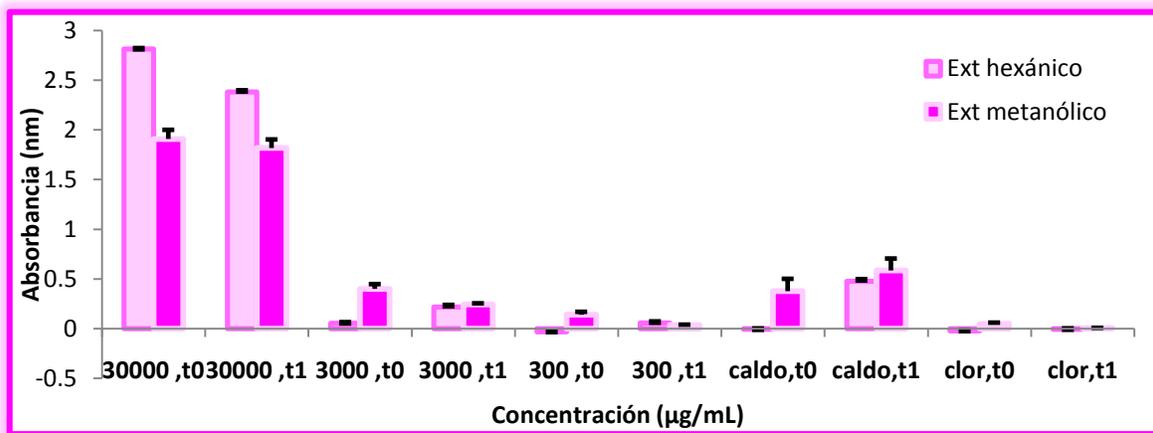
El Cloramfenicol se manejo a 30 µg/mL

Simbología: *Staphylococcus epidermis* (S. e.), *Salmonella typhi* (S. t.) y *Shigella flexneri* (S. f).

En el ensayo de *Bacillus cereus*, la concentración de 10000 µg/mL del extracto hexánico, a la que fue más sensible. Comparado con la prueba de difusión (gráfica 1), en esta última, *Bacillus cereus* fue más sensible a la concentración de 1000 µg/mL. Estadísticamente, la prueba de dilución (gráfica 8), presenta diferencia significativa, debido a que tiene mayor eficacia respecto al antibiótico. Comparando los datos estadísticos de la prueba de difusión, el cloramfenicol tiene mayor eficacia.

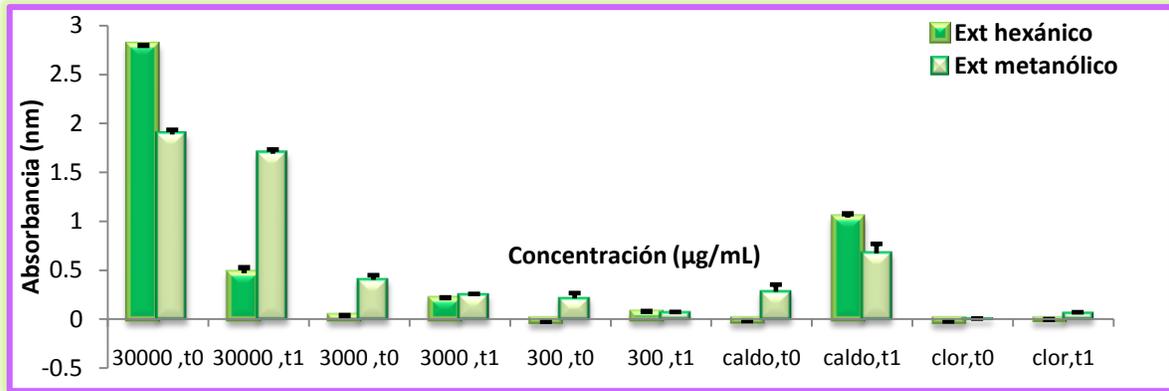
Respecto a la prueba realizada con el extracto metanólico, la concentración de 10000 µg/mL, fue la única concentración a la cual inhibió el crecimiento de *Bacillus cereus*. Los resultados estadísticos indican que el extracto metanólico tiene mayor eficacia como antibacteriano que el cloramfenicol, comparado con la prueba de difusión (grafica 1), el cloramfenicol tiene mayor eficacia que el extracto.

GRAFICA 8.-EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Bacillus cereus*.



Para *Bacillus subtilis*, en la única concentración del extracto hexánico en la cual hubo inhibición de bacterias fue en 10000 µg/mL. Estadísticamente, tanto en la prueba de difusión (grafica 2) como dilución (gráfica 9), se presenta diferencia significativa, por lo que el cloramfenicol tiene mayor eficacia comparada con el extracto. En el ensayo del extracto metanólico, éste es activo en todas las concentraciones (10000,1000 y 100 µg/mL), ya que inhibió el crecimiento bacteriano, aunque estadísticamente, el cloramfenicol, tiene mayor o igual eficacia comparado con 1000 y 100 µg/mL, respecto a 10000 µg/mL, tiene mayor eficacia el antibiótico. Comparado con la prueba de difusión tiene el mismo efecto el antibiótico y 10000 µg/mL.

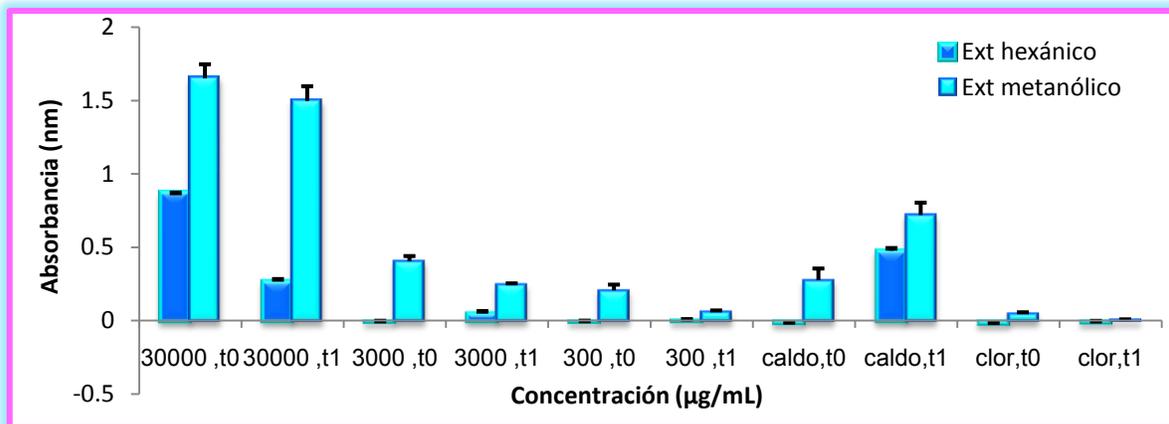
GRÁFICA 9.- EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Bacillus subtilis*



En la prueba realizada para *Escherichia coli* (gráfica 10), en 10000 y 100 µg/mL fueron las únicas concentraciones donde fue activo el extracto hexánico, siendo la de 100 µg/mL la que originó una mayor inhibición del crecimiento. Este evento se conoce como “El fenómeno paradójico o de Eagle” el cual fue reportado por Eagle y Musselman (1948). Al comparar estadísticamente los datos obtenidos, sólo en 100 µg/mL, es más activo el extracto que el cloramfenicol. Comparado con la prueba de difusión, el cloramfenicol es más activo que el extracto.

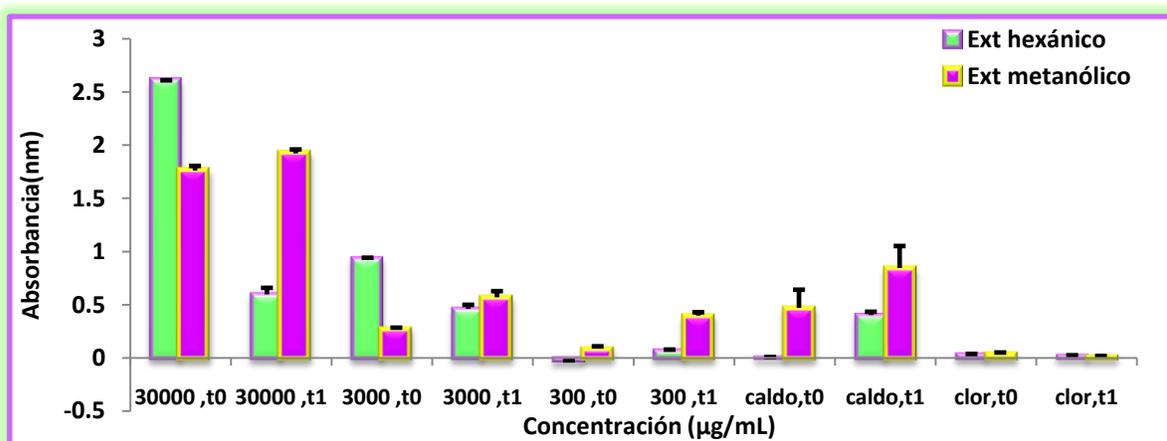
Respecto al extracto metanólico, éste es activo en todas las concentraciones, pero en 100 µg/mL, hay una mayor inhibición de crecimiento (Eagle y Musselman, 1948). Los resultados estadísticos indican que en las concentraciones de 1000 y 100 µg/mL, tienen mayor o igual eficacia que el cloramfenicol. En la prueba de difusión (gráfica 3), sólo en sus dos concentraciones de 1000 y 10000 µg/mL tiene el mismo efecto del cloramfenicol.

GRÁFICA 10.- EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli*



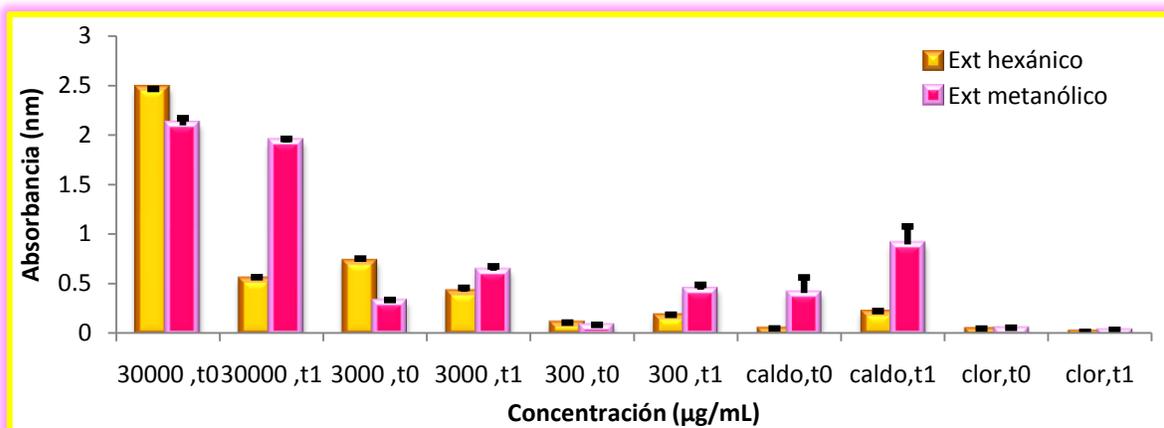
La actividad antibacteriana para *Staphylococcus aureus* en el extracto hexánico (gráfica 11), sólo es sensible a las concentraciones de 10000 y 1000 $\mu\text{g/mL}$. Estadísticamente las dos concentraciones respecto al cloramfenicol presentan diferencia significativa, ya que tienen la misma o igual eficacia de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* que el antibiótico. En la prueba de difusión, las tres concentraciones del extracto hexánico tienen la misma eficacia comparada con su control. El extracto metanólico no es activo en *Staphylococcus aureus*, por lo que estadísticamente, el cloramfenicol tiene mayor actividad antibacteriana. Comparado con la prueba de difusión, en sus tres concentraciones tiene efecto antibacteriano el extracto, siendo 10000 $\mu\text{g/mL}$, la que tiene el mismo efecto que el antibiótico.

GRÁFICA 11.- EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus*.



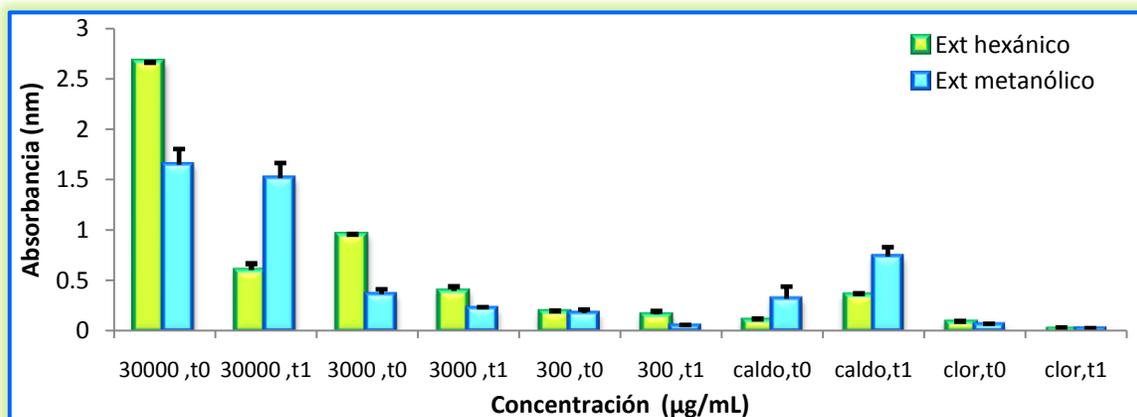
En *Staphylococcus epidermis* (gráfica 12), es activo el extracto hexánico en dos de sus concentraciones, 10000 y 1000 $\mu\text{g/mL}$, pero estadísticamente, el cloramfenicol presenta mayor efecto antibacteriano que el extracto, comparado con la prueba de difusión, sólo 10000 $\mu\text{g/mL}$, es la que tiene mayor efecto que el cloramfenicol. En el ensayo del extracto metanólico, solamente la concentración de 10000 $\mu\text{g/mL}$ es activa frente a *Staphylococcus epidermis*, pero estadísticamente, el antibiótico es el que posee mayor efecto antimicrobiano, lo contrario sucede en la prueba de difusión, ya que la concentración de 10000 $\mu\text{g/mL}$, tiene el mismo efecto antibacteriano que el cloramfenicol.

GRAFICA 12.- EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Staphylococcus epidermis*



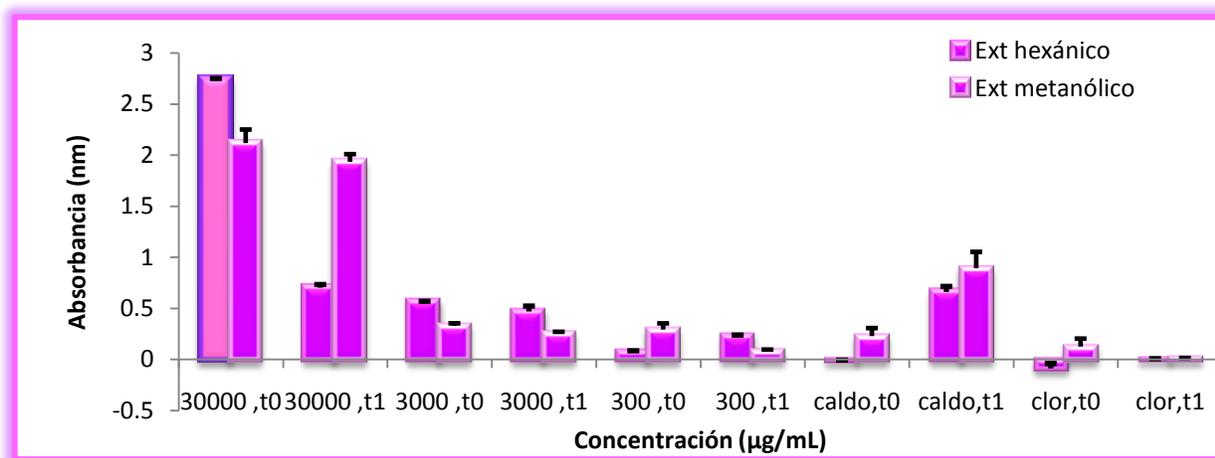
Para *Salmonella tiphy* (gráfica 13), el extracto hexánico es activo en sus tres concentraciones, ya que inhibe en gran medida el desarrollo bacteriano de dicho patógeno. Los resultados estadísticos indican que hay diferencia significativa entre las tres concentraciones comparadas con el control, por lo cual presentan mayor o igual eficacia que el cloramfenicol. En cuanto al extracto metanólico, en las concentraciones de 1000 y 100 μg/mL es donde hay una mayor inhibición bacteriana, pero estadísticamente 1000 y 100 μg/mL tienen mayor o igual eficacia que el antibiótico. En la prueba de difusión, la concentración de 10000 μg/mL, es la única que presenta la misma actividad bactericida que el cloramfenicol.

GRÁFICA 13.- EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Salmonella tiphy*.



Shigella flexneri, en las contracciones de 10000 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ del extracto hexánico (gráfica 14), es donde se inhibe el crecimiento de dicho patógeno. Al comparar estadísticamente los datos obtenidos, dichas concentraciones presentan diferencia significativa, por lo que tienen el mismo o igual efecto que el antibiótico. Contrariamente, en la prueba de difusión la concentración de 100 fue la que mostró mayor actividad antibacteriana en relación al control. Respecto a la prueba realizada con el extracto metanólico, en sus tres concentraciones es activo, pero estadísticamente 1000 y 100 $\mu\text{g/mL}$ tienen mayor o el mismo efecto antibacteriano que el cloramfenicol. En la prueba de difusión, la concentración de 10000 $\mu\text{g/mL}$ es la que presenta el mismo efecto antibacteriano que el cloramfenicol sobre dicho patógeno.

GRÁFICA 14.- EFECTO DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y EL METANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Calea urticifolia* Mill DC SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Shigella flexneri*



14.- CONCLUSIONES

1.- De la extracción ácido-base del extracto etéreo, identificaron a:

- 4-(1-metiletoxi),1-butanol
- 3-metil,2-ciclopentenona
- 5-etil ,2(5H)-furanona
- hidroxilactona del ácido undecanoico
- cis 5-eteniltetrahydro- α,α ,5-trimetil, 2-furano metanol
- 3-metil-4-propil ,2,5-furanodieno
- 3,4-dimetil cis tetrahydro furano
- 3-metil, 1-penteno
- 2-metoxi-4-vinil fenol
- 4-propil,1,3-bencenodiol
- 6-acetil-2,5,8-trihidroxi, 1,4-naftoquinona
- N,N-dimetildodecanoamida
- 2,4-bis(1-fenil etil), fenol

2.- De la extracción ácido-base, del extracto de diclorometano, se identificaron a los siguientes compuestos:

- 2-butanol
- 2-butanol,3-metoxi
- 1,4-butanodiamina
- oxirano, (etoximetil)
- 3-metil,4-hexen-2-ona
- 2-etil,1,3-dioxilano
- ácido, 2-[3-(1,1-dimetiletil)-1-oxoperidropirrol [1,2-c] [1,3] oxazol-7-il]-, metil ester acético
- 4-metildocosano
- 9,10-dimetiltriciclo [4.2.1.1(2,5)] -9,10-diol decano
- 2,5,5,8a-tetrametil-4-metileno-6,7,8,8 α -tetrahydro- -4 α -il hidroperóxido-4H,5H-cromeno
- aspidoespermidina-3-carboxi, 2,3-didehidro-1-metil ester
- 5,10-dietoxi-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipirrol dipirazina.
- ácido ciclopropano, 2-bromo-4-fluorofenilo ester, carboxílico
- acético ácido, 10-hidroximetil-6-metil-12,13-dioxa-triciclo[7.3.1.0(1,6)] tridec-5-il ester

3.- El alcaloide analizado es el aspidoespermidina-3- ácido carboxilico, 2,3-didehidro-1-metil-, metil éster, se reporta por primera vez para la familia *Asteraceae*.

4.- De la esencia extraída con pentano, los compuestos mayoritarios analizados fueron :

- 2-hexenal
- α -pineno
- cis 5-eteniltetrahidro- $\alpha,\alpha,5$ -trimetil-, 2-furano metanol
- humuleno
- nerolidol
- óxido de cariofileno
- α -bisaboleno
- 3-amino-4-metil-6,7-dimetoxiquinolina

5.- Para los aceites esenciales extraídos con éter etílico, los compuestos son:

- cariofileno
- elemeno
- 1H-3a,7-metanoazuleno, 2,3,6,7,8,8a-hexahidro-1,4,9,9-tetrametil
- naftaleno, 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metil etil)
- α -cadinol
- trans longipinocarveol
- α -bisabolol
- oxido de aromadendreno
- 3-amino-4-metil-6,7-dimetoxiquinolina

6.- De acuerdo al análisis químico, *Calea urticifolia*, está más estrechamente emparentada con: *C. angusta*, *Calea clematidea*, *C. cuneifolia*, *Calea harleyi*, *C. hispida*, *C. hymenolepis*, *C. morii*, *C. rotunfolia* *C. ternifolia* y *C. villosa*.

7.- El extracto hexánico, en la prueba de difusión, para *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, el cloranfenicol tiene mayor eficacia como antimicrobiano, para *Staphylococcus aureus*, las tres concentraciones tienen el mismo efecto que el cloranfenicol, para *Staphylococcus epidermis*, sólo 10000 $\mu\text{g/mL}$ tiene mayor efecto como bactericida, de igual forma 100 $\mu\text{g/mL}$ para *Salmonella tiphy* y *Shigella flexneri*.

8.- Para el extracto metanólico, en la prueba de difusión, a 10000 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ estadísticamente tiene mayor o igual eficacia comparadas con el cloramfenicol.

9.- En la prueba de dilución del extracto hexánico y metanólico, para *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tiphy* y *Shigella flexneri* el extracto tiene mayor eficacia que el antibiótico. Para *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus epidermis*, el cloranfenicol es más efectivo como antimicrobiano.

15.- SUGERENCIAS

- Analizar la composición del extracto hexánico
- Obtener y purificar los extractos hexánico y metanólico, de igual forma los aceites esenciales de las flores y tallo de *Calea urticifolia*.
- Obtener, purificar y realizar pruebas físico-químicas al alcaloide aspidospermidina-3-carboxílico ácido, 2,3-didehidro-1-metil-, metil éster, (5à,12á,19à), para corroborar su presencia en la familia Asteraceae.
- Evaluar la actividad antibacteriana con los compuestos puros del extracto hexánico y metanólico en *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Salmonella tiphy* y *Shigella flexneri* para comparar los resultados con los extractos crudos.
- Evaluar la actividad fungicida de los extractos crudos de hexano y metanol obtenidos de las hojas de *Calea urticifolia* (Mill) DC. en cepas de hongos, como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabatra*, *Microsporium canis*, *Microsporium nanum*, *Microsporium gypseum* *Trichophyton rubrum*, para validar su uso como fungicida
- Realizar un estudio de toxicidad para evaluar si existe repercusión al consumir *Calea urticifolia*.

Anexo 16.1-COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *Calea*

7.1- COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *CALEA*

CUADRO 4.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *Calea*

ESPECIE	METABOLITO	COMPUESTO
<i>Calea zacatechichi</i> (Hertz and Kumar (1980))	Germacranólido	1) 1 α -acetoxi-zacatechinólido 2) 1-oxo-zacatechinólido 3) germacrano D 4) caleina A y B 5) neurolenina
<i>Calea pinnatifida</i> <i>Bank</i> Bohlmann (<i>et al</i> , 1981 c y d)	Germacranólidos	6) auracranólido
<i>Nueva especie</i> Bohlmann (<i>et al</i> , 1981)	Germacranólidos	7) timol (11 a) e isobutirato (11 b) 8) derivado de germacrano 12 y 13 9) derivado de 8 β -angeloiloxi atripliciólido pirazolidino (1) 10) acetato de 1-epi-niveusin C 11) 5 hidroxinerolidol y 5 acetoxinerolidol 12) caleteucrino (17) 13) 9-acetoxicaleateucrino (18) 14) 9-isobutiriloxicaleateucrino (19) 15) 9-hidroxicaleateucrino (20) 16) 9- isobutiriloxicalefolieno (21) 17) 9-angeloiloxicalefolieno (22) 18) caleteucrifoleno 19) iso timol metil éter 20) 8-O-dihidrocaleteicrino angelato
<i>Calea teucrifolia</i> Bohlmann (<i>et al</i> , 1981 c y d)	Sesquiterpeno Lac (heliangólido) derivados de neurodiol derivados de benzofuranos	
<i>Calea pilosa</i> Bohlmann (<i>et al</i> , 1981 c y d)	Lactonas	21) nerodiol (7) 22) derivados de hidroxí (8) 23) espatulenol 24) angelato 15 de oxibudleina A (21) 25) atriplicólido 22 y 26 26) 9 α -hidroxiatriplicólido 8- O-angelato (24) 27) 9 α -hidroxiatriplicolidotiglato (25) 28) 11,13-dihidro-11,13-epoxiatripliciólido angelato (27)* 29) 11,13-dihidro-11,13-epoxiatripliciólido tiglato (28)* 30) 11,13-dihidro-11,13-epoxiatripliciólido metacrilato (29) 31) 11-hidroxi-13-cloro-11,13-dihidroatripliciólido-8-O-angelato (33 a)* 32) 9 α ,11-dihidroxi-13-cloro-11,13-dihidroatripliciolido-8-O-angelato 33) 3 β -acetoxi-8 β -angeloiloxi-1,10-dihidro- 1 α ,10 β -epoxicostunólido 34) 5-mirtenil-4,5-11,13-tetrahidro,11-13,epoxiatripliciolido-8-O-angelato (38)

Anexo 16.1-COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *Calea*

CUADRO 4.-CONTINUACIÓN

ESPECIE	METABOLITO	COMPUESTO
<i>Calea morii</i> Bohlmann (<i>et al</i> , 1981 c y d)		35) 2,3 dimetil-6-[acetoxi acetil]7-metoxicromeno (16) 36) 2-[2-acetoxietil]-5-prop-1-inil-ditienil (18) 37) 11-hidroxi-13-cloro-11,13-dihidroatripliciolido-8-O-tiglato (34)
<i>Calea cuneifolia</i> Lourenco (<i>et al</i> , 1981)	Derivados de acetofenona	38) 2-senecionil-4-(1-hidroxietyl) fenol 39) 1'1-bis-[2-senecionil-4-(1-etil)-fenoxi]éter (1 b) 40) meso-1,1-bis[2-senecionil-4-(1-etil)-fenoxi]éter (1c) 41) 2-senecionil-4-(1-acetoxietil)-fenol (1d) 42) 2-senecionil-4-(1-acetilsarricinoyloxietil)-fenol (1e) 43) 2-(3-metil-3-hidroxibutanoil-1)-4-(1-hidroxietyl)-fenol (2) 44) 2-senecionil-4-vinilfenol (3) 45) 6-hidroxi-2,2-dimetilcromano-4-one (4) 46) ácido de acetilsarricínico (5)
<i>Calea rotundifolia</i> Bohlmann (<i>et al</i> , 1981e	germacranólido heliangino heliangólido eudesmanólidos norterpeno	47) bisaboleno (1 y 2) 48) 1b,1 O α -epoxi-8 β -tiglinpiloxi-1,10-dihidrocostinólido (3) 49) heliangino (4) 50) acetato de heliangino-3-O (5) 51) 8 β - tiglinoiloxi reinosin 6 52) 1 β -hidroxí-8 β -tiglinoiloxi arbusculino Bv (7) 53) 8 β - tiglinoiloxibalchanino (8) 54) 3-hidroxi-octa-1,5t-dien-7-ona (9)
<i>Calea angusta</i> Bohlmann (<i>et al</i> , 1982 f)	furanoheliangólidos epóxidos	55) isocomeno 5 56) β - isocomeno 6 57) silfineno 58) escualeno 1-3 59) 11,13-dihidro-11,13-epoxiatripliciolido-2-metilbutirato (13) 60) 9 α -hidroxi-11,13-dihidro-11,13-epoxiatripliciolido-2-metilbutirato (14)
<i>Calea hispida</i> Bohlmann (<i>et al</i> , 1982 g)	Furanoheliangólidos y derivados de farnesol	61) 1,2 - dihidroxi - 3,4 - dehidromentona 62) 5 β - mirtenil - 9 α - hidroxi - 4,5 - dihidroatripliciolido - 8 - 0 - angelato 63) 5 β ,9 α - dihidroxi - 4,5 - atripliolido - 8 - 0 - angelato 64) 15 - acetoxi- 5 - hidroxifarnesil acetato 65) 15 - acetoxi - 5,10 - dihidroxi - 12,13 - dehidro - 10,11 - dihidrofarnesil acetato

Anexo 16.1-COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *Calea*

CUADRO 4.- CONTINUACIÓN

ESPECIE	METABOLITO	COMPUESTO
<i>Calea hymenolepis</i> Bohlmann (et al, 1982 h)	Furanoheliangólidos	66) 8-0-dihidrocaleteucrina acetato 67) senecioato de calelepino 68) caleahimenona A 69) caleahimenona B 70) isoatripliciolido angelato 71) caleamircenólido
<i>Calea lantoides</i> (Vichnewski et al, 1982)	Heliangólidos	72) derivado 15 deoxi
<i>Calea oxilepis</i> Bohlmann (et al, 1982i)	Heliangólidos	73) 1 β -hidroxi-8-desacilzacatechinólido-(2-metil butirato) (7). 74) 1 α -acetoxli-8-desacilzacatechinólido-(2-metil butirato) (8). 75) 1-0x0-8-desacetilzacatechinólido-(2-metil butirato) (9). 76) alcohol de acetato 1,2-acetoxi-1,2-dihidroartemisina (10).
<i>Calea reticulata</i> Bohlmann (et al, 1982 j)	Germacrano y derivados de eudesmano	77) ichtierol 78) germacra-4(15), 5, 10(14)-trieno-l-ona (4). 79) 6-epi- β -verbésinol coumarato (5).
<i>Calea ternifolia var calyculata</i> (Lee et al., 1982)		80) 9a-acetoxizexbrevino (1) 81) 9 α -hidroxi-11,13 - dihidro - 11 α ,13 - epoxiatripliciolido - 8 β - 0-[2-metilacrilato] (4)
<i>Harleyi</i> Bohlmann (et al, 1984 l)	Germacranólidos Derivados de B- hidroxiacetofenona	82) 8-desacilacetilchaplitrino angelato (1). 83) caleharloido-8-0-[2',3'-epoxi-2'-metilbutirato] (3). 84) caleharloido-8-O-[ent-2',3'-epoxi-2'-metilbutirato] (4). 85) caleharloido-8-0-[2'-hidroxi-2'-metil-but-3'-enoato] (5). 86) 9-0-dihidrocalefolieno (7). 87) 9-0-dihidrocalefolieno angelato (8).

Anexo 16.1-COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *Calea*

CUADRO 4.- CONTINUACIÓN

ESPECIE	METABOLITO	COMPUESTO
<i>Prunifolia</i> Castro V (1984)	Sesquiterpeno y derivados de acorano	88) acora-6.8-dienO (1) 89) acora-6,8(1 5)-dieno (2). 90) acora-4(14),8-dieno (3). 91) 8-desmetil acor-6-en-ona (5) 92) dauca-3,11-dien-2-ona (6) 93) 2-isopropenil-5,6,7-trimetoxi benzofurano (9) 94) 5-aceto-6,7-dimetoxibenzofurano (10) 95) 11 -acetoxicalepruna-1,4E,9-trien-6- ol(11) 96) 6-hidroxi-norcalepruna-1.4E,8E-trien-10-ona (1 2) 97) apocalepruna-1,4E-dien-6,9-olido (13). 98) 6 β ,10-oxidocalepruna-1,4E-dien-9 β -ol (14) 99) 6,9-oxido calepruna-1,4E-dien-10-ol (115)
<i>Subcordata</i>	Eudesmanólido	100) subcordatólido B.
<i>Subcordata</i> G.Ober (et al. 1984 a y b)		101) 8-epi-isobutirilrupicolino A 102) 8-epi-isobutirilrupicolino B (2), 103) subcordatólido A (3), 104) diacetano de subcordatólido A (6)
<i>Ternifolia</i> Fisher (et al. 1984)	Furanoheliangólidos	105) 9a-acetoxizexbrevino (I) 106) 8 β - angeloiloxi-9 α -hidroxicaliculatolido(2) 107) 8 β - metilacriloiloxi-9 α - hidroxicaliculatolido (3) : 108) 11,13-dihidro-11 α . 13-epoxiatripliciolido-8 β -angelato(4) 109) 11,13-dihidro-11 α ,13-epoxiatripliciolido-8 β -O-metilacrilato (5) 110) 15-hidroxi-11,13-dihidro-11 α ,1 3-epoxiatripliciolido-8 β -O-angelato(6) 111) 9a-hidroxi-11 a.1 3-epoxyatripliciolido-8 P-0-angelato (8)
<i>Trichomata</i> G.Ober (et al. 1984 c)	Eudesmanólidos	112) 8 β -tigloxireinosino (1) 113) tricomatólido A (5), 114) diacetato de tricomatólido A (6).
<i>Trichomata</i> G.Ober (et al. 1984d)		115) 3-deoxi-2,3-dehidroheliangino (1) 116) trucomatólido B (2) 117) tricomatólido C (3) 118) tricomatólido D (5) 119) acetato de tricomatólido D (6) 120) acetato de tricomatólido E (8)

Anexo 16.1-COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *Calea*

CUADRO 4.- CONTINUACIÓN

ESPECIE	METABOLITO	COMPUESTO
<i>Ternifolia var caliculata</i> Fisher (et al. 1984)		121) 8β-angeloiloxi-9α-hidroxicaliculatolido(2) 122) 8 β-metilacriloxi -9α -bidroxicaliculatoildo (3) 123) 11,13-dihidro-11α,13-epoxiatripliciolido-8β-O-angelato(4) 124) 11,13-dihidro-11α,13-epoxiatripliciólido-8β-O-metalacrilato (5) 125) 15-hidroxi-11,13-dihidro-11α,13-epoxiatripliciólido-8β-O-angelato 6 126) 9α-hidroxi-11α-13-epoxiatripliciólido-β-O-angelato (8)
<i>Clematidea</i> Schmeda (et al,1985)		127) acetato de eupatólido 128) acetado de ovatifolin 129) acetato de ridentino-8-O (4). 130) 8β-acetoxi derivado de anhidroverlotorino (5).
<i>Divarcata</i> G.Ober (et al. 1985 e)	flavonas lactonas heliangolidos	131) 0-metil acacetino (1), 132) acacetino (2) 133) apigenino (3) 134) angelato atripliciólido(4) 135) 11,13-dihidroxi-11,13-atripliciólido (5) 136) 11,13-dihidroxi-11 α,13-epoxiatripliciólido 8β-O-angelato(5) 137) acetato de leptocarpino (9) 138) 2α-hidroxi-eupatólido-8-O-angelato (10)
<i>Berteriana</i> G.Ober (et al. 1985 f)	Germacranólidos- Calbertolidos	139) calbertólido A 8-epi-8-tigllirupicolina A' 140) calbertólido B 141) calbertolido C
<i>Solidaginea</i> G.Ober (et al. 1985 g)	guaianolidos	142) solidaginólido A(1) 143) artecanino (2) 144) derivado de tricloroacetil carbamato ++ 145) canino 146) solidaginólido B (5)
<i>Leptocephala</i> G.Ober (et al. 1986 h)	Sesquiterpeno lactona	147) 8β-angeloiloxi-9α-hidroxi-caliculatólido (1) 148) 8 β-Angeloiloxi-9α -acetoxicaliculatólido (2). 149) desacetilcaleina A(3). 150) caleina A 151) erioflorina (6) 152) 8β-angeloiloxileptocefalido (7)

Anexo 16.1-COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *Calea*

CUADRO 4.- CONTINUACIÓN

ESPECIE	METABOLITO	COMPUESTO
<i>Jamaicensis</i> G.Ober (et al. 1986i)	Sesquiterpeno lactona	153) prunicromeno 1 154) O-metil acacetino (2) 155) acacetino (3) 156) jamaicólido A (4a). 157) jamaicólido B (5) 158) jamaicólido (7a) 159) jamaicólido D (8a).
<i>Rupícola</i> Schmeda (et al, 1986)	Furanoheliangólidos	160) 9 α -hidroxiatripliólido-8-O-isoburato (4). 161) 5 β -mirnetil-4 β -5-dihidroatripliólido-8-O-Isovalerato (6)
<i>Septuplinervia</i> G.Ober (et al. 1987j)	Sesquiterpeno lactona	162) telekino (1) 163) septiplinólido (2)
<i>Septuplinervia</i> G.Ober (et al. 1987j)	Sesquiterpeno lactona	162) telekino (1) 163) septiplinólido (2)
<i>Subcordata</i> G.Ober (et al. 1986 k)	Sesquiterpeno lactona	164) subcordatólido D (1) 165) subcordatólido D- β -bromobenzoato (4) 166) subcordatólido E (5)
<i>Zacatechichi</i> Martinez (et al, 1987)	caleinas	167) caleina E (1) 168) caleine F (2). 169) neurolenina (6)
<i>Prunifolia</i> Castro (et al. 1989)	Sesquiterpeno lactona	170) 7-metoxicaleteucrino (5) prunicromeno B A y C 171) 3,4,5-Trimetoxisalicialdehído 8* 172) caleprunifolina (16) 173) 2-senecioidil-hidroxiquinona-4-O-metil éter(17). 174) 5 α -hidroperoxi-costol acetato (23).

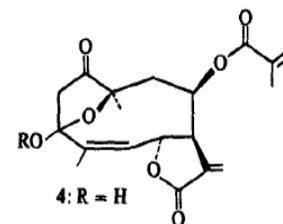
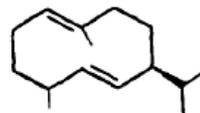
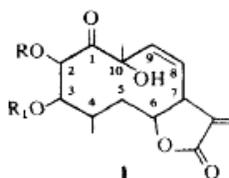
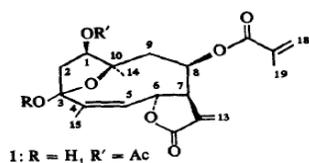
Anexo 16.1-COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *Calea*

CUADRO 4.- CONTINUACIÓN

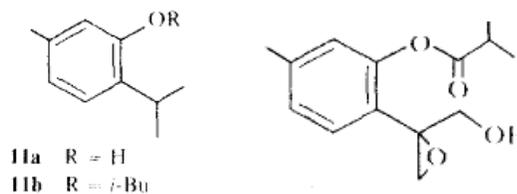
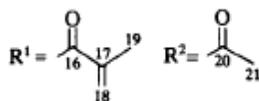
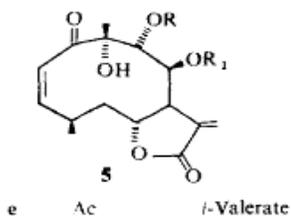
<p style="text-align: center;"><i>Peckii</i> <i>Castro (et al. 1989)</i></p>	<p>Sesquiterpeno lactona</p>	<p>175) 4,6-dimetoxi-2-isopropil ideno-3-oxo-2,3-dihidrobencofurano (3) 176) 1β-hidroxi-bisabola-2,10-dien-4-ona (24). 177) 1α-hidroxi-bisabola-2,10-dieno-4-ona (25)</p> <p>178) 4-hidroxi-3-metoxibisabola-1,10-dieno (26). 179) 1α-hidroperoxi- 8β-tigloiloxi guaia-3,9,11 (13)-trien-12,6α olido(28) 180) 3β-hidroxi-8β-tigloiloxiheliangólido (31).</p>
<p style="text-align: center;"><i>Crocinnervosa</i> <i>Ortega (et al 1989)</i></p>	<p>Sesquiterpeno lactona</p>	<p>181) crocinnervólido (1) 182) carbamato (3)</p>
<p style="text-align: center;"><i>Nelsonii</i> <i>Martínez (et al, 1987;Maldonado et al, 1992)</i></p>	<p>Derivados de timol</p>	<p>183) 10-acetoxi-8,9-epoxi-7-isobutiriloxitimol isobutirato (2). 184) 10-acetoxi-8,9 epoxi-7-hidroxitimol isobutirato (3) 185) 8-hidroxi- 9 acetoxi-10- isobutiriloxitimol (4). 186) 7-acetoxi-8-hidroxi-9,10- diisobutirioxitimol (5). 187) 7-isobutiriloxi-8,9-dihidroxitimol (6) 188) 7,9-di-isobutiriloxi-8-metoxitimol (7)</p>
<p>Platylepis Sch. Bip. ex Baker <i>Mendes et al.,(2002)</i></p>	<p>Flavona Sesquiterpeno lac benzofuranos</p>	<p>189) genkwanina 190) (+)- 4α, 7β aromadendranediol 191) euparina 192) caleprunina a 193) caleprunina b 194) euparona</p>

ANEXO 16.2.

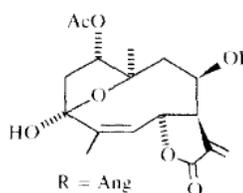
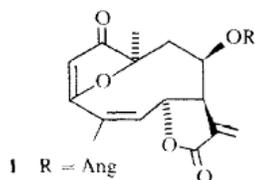
FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA



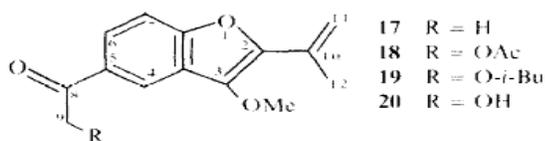
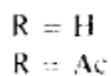
- 1) 1 α -acetoxi-zacatechinólido 2) 1-oxo-zacatechinólido 3) germacrano D 4) caleina A y B



- 5) neurolenina 6) auracranólido 7) timol (11 a) e isobutirato (11 b) 8) derivado de germacrano 12 y 13

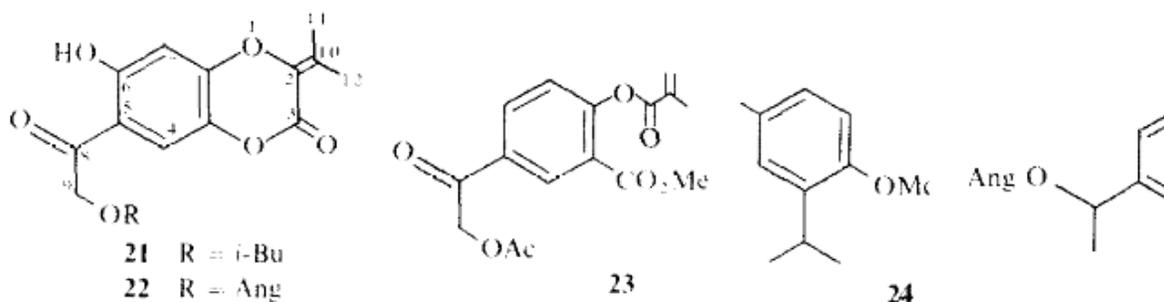


- 9) derivado de 8 β -angeloiloxi atriplicíólido pirazolidino (1) 10) acetato de 1-epi-niveusin C

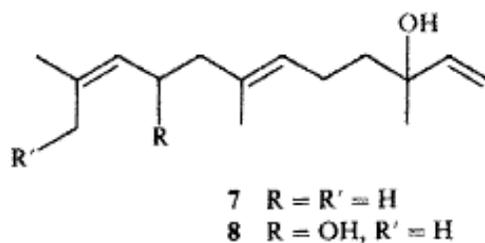


- 11) 5 hidroxinerolidol y 5 acetoxinerolidol 12) caleteucrino (17) 13) 9-acetoxicaleateucrino (18) 14) 9-isobutiriloxicaleateucrino (19) 15) 9-hidroxicaleateucrino (20)

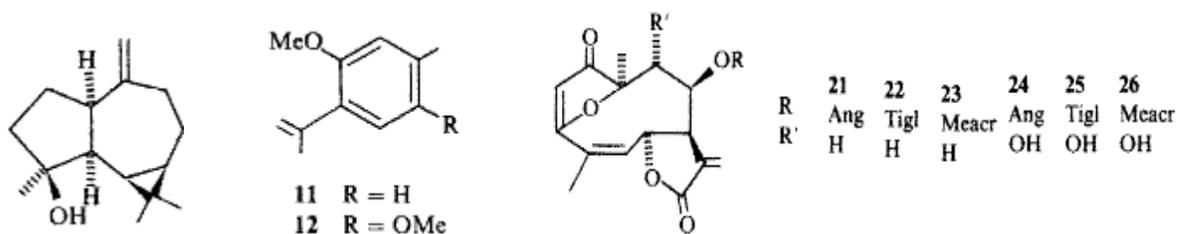
FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA



16) 9- isobutiriloxicalefolieno (**21**) **17)** 9-angeloiloxicalefolieno (**22**) **18)** caleteucrifoleno **19)** iso timol metil éter **20)** 8-O-dihidrocaleteicrino angelato (**25**)

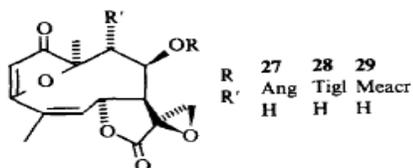


21) nerodiol (**7**) y **22)** derivados de hidroxi (**8**)

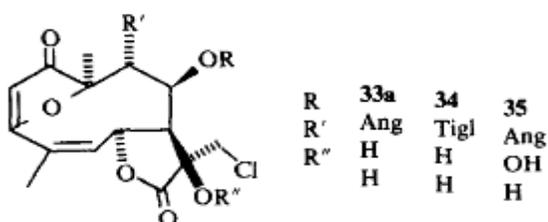


23) espatulenol **24)** angelato 15 de oxibudleina A (**21**) **25)** atripicólido **22** y **26** **26)** 9 α -hidroxiatriplicólido 8- O-angelato (**24**) **27)** 9 α -hidroxiatriplicólidotiglato (**25**)

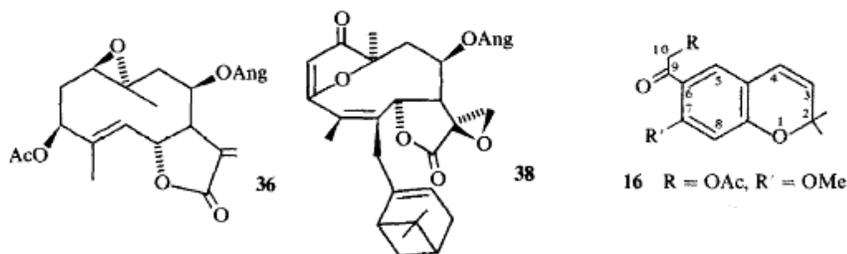
FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA



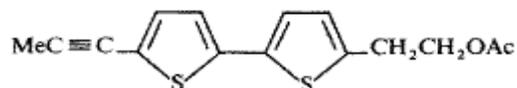
28) 11,13-dihidro-11,13-epoxiatripliciólido angelato (**27**)* **29)** 11,13-dihidro-11,13-epoxiatripliciólido tiglato (**28**)* **30)** 11,13-dihidro-11,13-epoxiatripliciólido metacrilato (**29**)



31) 11-hidroxi-13-cloro-11,13-dihidroatripliciólido-8-O-angelato (**33 a**)* **32)** 9 α ,11-dihidroxi-13-cloro-11,13-dihidroatripliciólido-8-O-angelato **33)** 3 β -acetoxi-8 β -angeloiloxi-1,10-dihidro- 1 α ,10 β -epoxicostunólido

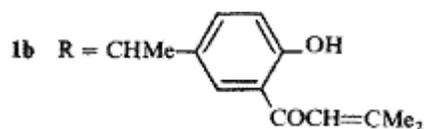
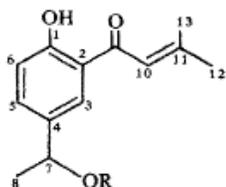


34) 5-mirtenil-4,5-11,13-tetrahydro,11 13,epoxiatripliciolido-8-O-angelato (**38**) y **35)** 2,3 dimetil-6-[acetoxi acetil]7-metoxicromeno (**16**)



36) 2-[2-acetoxietil]-5-prop-1-inil-ditienil (**18**) y **37)** 11-hidroxi-13-cloro-11,13-dihidroatripliciólido-8-O-tiglato (**34**)

FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA



38) 2-senecionil-4-(1-hidroxietil) fenol **39)** 1'-bis-[2-senecionil-4-(1-etil)-fenoxi]éter (1 b)

1c = 1b

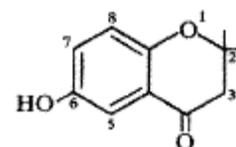
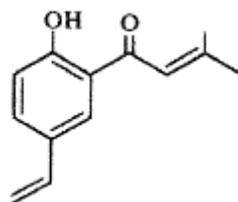
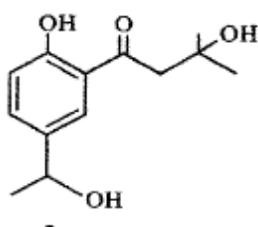
40) meso-1,1-bis[2-senecionil-4-(1-etil)-fenoxi] éter (1c)

1d R = Ac

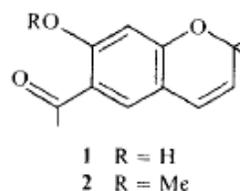
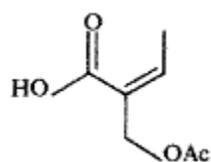
41) 2-senecionil-4-(1-acetoxietil)-fenol (1d)

1e R = COC(CH₂OAc)CHMe

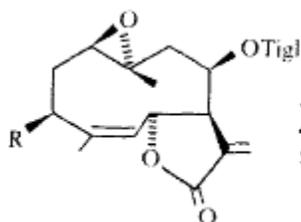
42) 2-senecionil-4-(1-acetilsarricinoyloxietil)-fenol (1e)



43) 2-(3-metil-3-hidroxi-butanoil-1)-4-(1-hidroxi-etil)-fenol (**2**) **44)** 2-senecionil-4-vinilfenol (**3**) y **45)** 6-hidroxi-2,2-dimetilcromano-4-one (**4**)



46) ácido de acetilsarricínico (**5**) y **47)** bisaboleno (**1** y **2**)



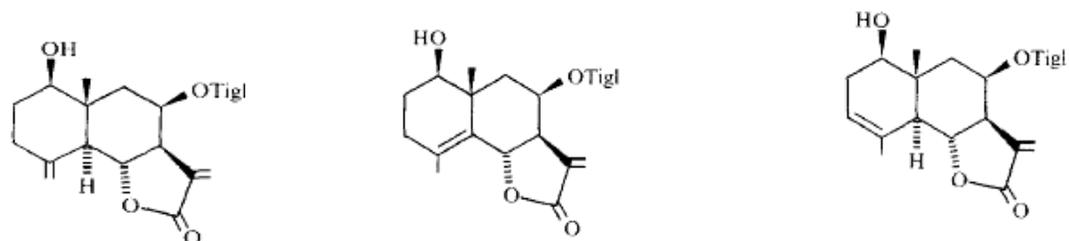
3 R = H (4,5-trans)

4 R = OH

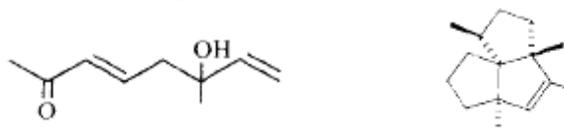
5 R = OAc

48) 1b,1 Oα-epoxi-8β-tiglinpiloxi-1,10-dihidrocostinólido (**3**) **49)** heliangino (**4**) y **50)** acetato de heliangino-3-O (**5**)

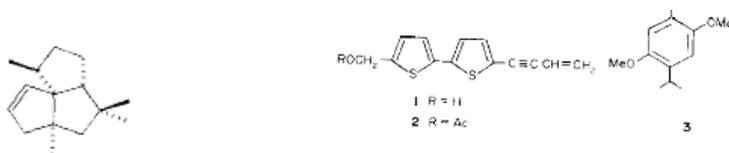
FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA



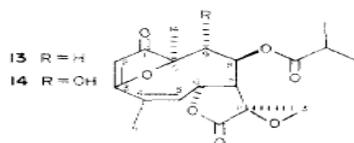
51) 8β-tigloiloxi reinosin 6 **52)** 1β-hidroxi-8β-tigloiloxi arbusculino Bv (7) y **53)** 8β-tigloiloxibalchanino (8)



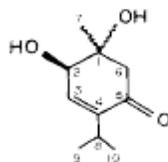
54) 3-hidroxi-octa-1,5t-dien-7-ona (9) **55)** isocomeno 5 **56)** β-isocomeno 6



57) silfino y **58)** escualeno 1-3

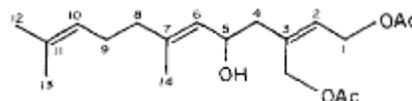
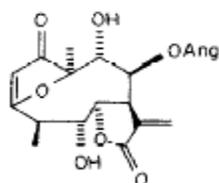


59) 11,13-dihidro-11,13-epoxiatripliciolido-2-metilbutirato (13) **60)** 9α-hidroxi-11,13-dihidro-11,13-epoxiatripliciolido-2-metilbutirato (14)



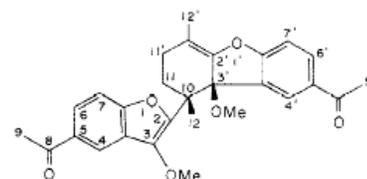
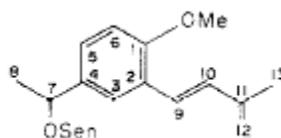
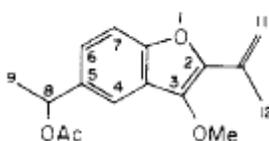
61) 1,2-dihidroxi-3,4-dehidromentona y **62)** 5β-mirtenil-9α-hidroxi-4,5-dihidrotripliciolido-8-O-angelato

FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA

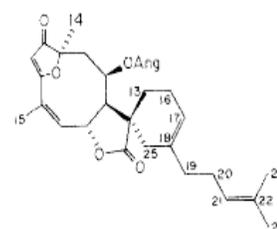
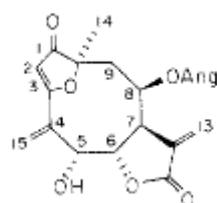
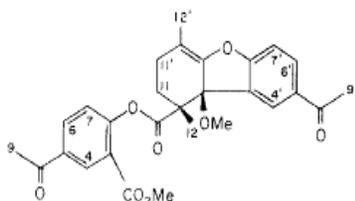


63) 5 β ,9 α - dihidroxi - 4,5 - atrípliciolido - 8 - O - angelato y **64)** 15 - acetoxi - 5 - hidroxifarnesil acetato y

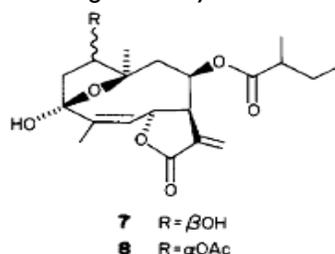
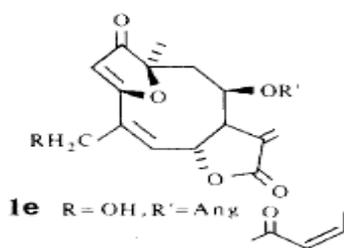
65) 15 - acetoxi - 5,10 - dihidroxi - 12,13 - dehidro - 10,11 -



66) acetato de 8-O-dihidrocaleteucrina **67)** senecioato de calelepino y **68)** caleahimenona A



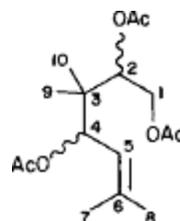
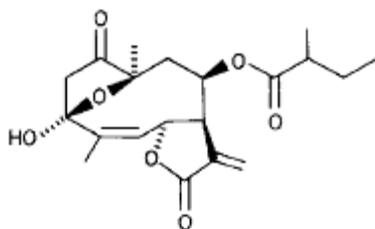
69) caleahimenona B **70)** isoatrípliciólido angelato **71)** caleamircenólido



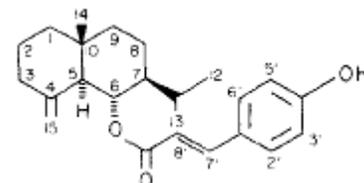
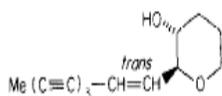
na

72) derivado 15 de oxi **73)** 1 β -hidroxi-8-desacilzacatechinólido-(2-metil butirato) (7). **74)** 1 α -acetoxi-8-desacilzacatechinólido-(2-metil butirato) (8).

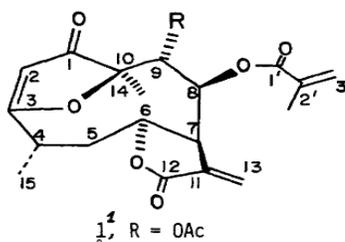
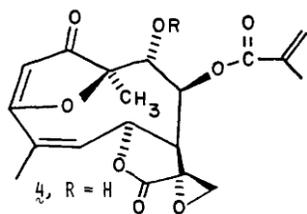
FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA



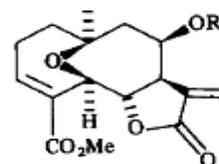
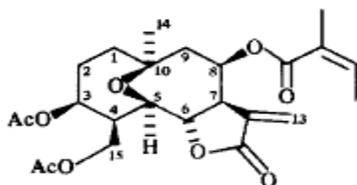
75) 1-oxo-8-desacetilzacatechinólido-(2-metil butirato) (9) **y76)** alcohol de acetato 1,2-acetoxi-1,2-dihidroartemisia (10).



77) ictierol **78)** germacra-4(15), 5, 10(14)-trieno-l-ona (4). **79)** 6-epi-β-verbesinol coumarato (5).



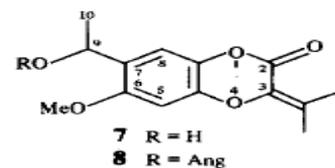
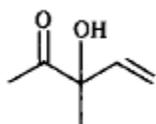
80) 9α-acetoxizexbrevino (1) **81)** 9α-hidroxi-11,13 - dihidro - lla,13 - epoxiatripliciolido - 8β - O-[2-metilacrilato] (4)



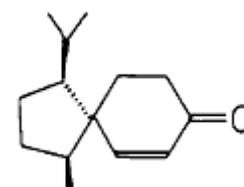
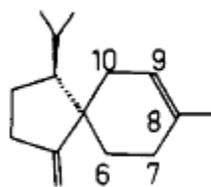
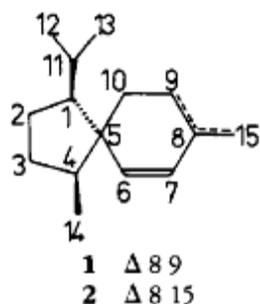
82) 8-desaclacetylchaplatriño angelato (1). **83)** caleharloido-8-O-[2',3'-epoxi-2'-metilbutirato] (3).

84) caleharloido-8-O-[ent-2',3'-epoxi-2'-metilbutirato] (4).

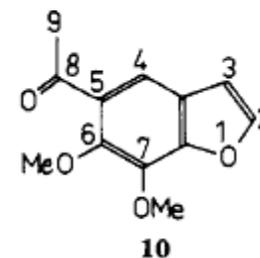
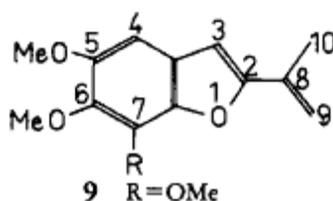
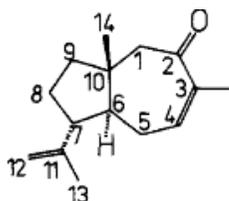
FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA



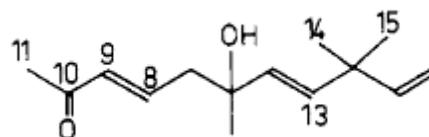
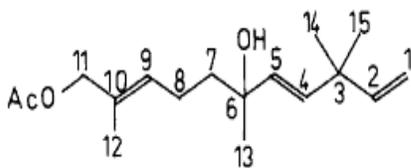
85) caleharloido-8-0-[2'-hidroxi-2'-metil-but-3'-enoato] (5). **86)** 9-0-dihidrocalefolieno (7). **87)** 9-0-dihidrocalefolieno angelato (8).



88) acora-6.8-dienO (1) **89)** acora-6,8(1 5)-dieno (2). **90)** acora-4(14),8-dieno (3). y **91)** 8-desmetil acora-6-en-ona (5)

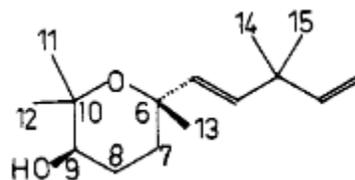
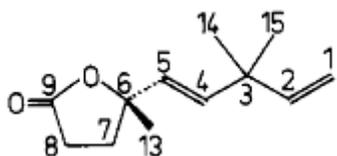


92) dauca-3,11-dien-2-ona (6) **93)** 2-isopropenil-5,6,7-trimetoxi benzofurano (9) **94)** 5-aceto-6,7-dimetoxibenzofurano (10)

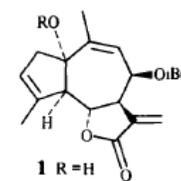
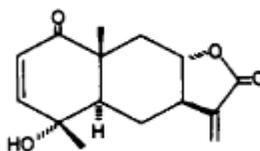
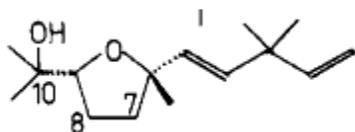


95) 11 -acetoxicalepruna-1,4E,9-trien-6- ol(11) **96)** 6-hidroxi-norcalepruna-1.4E,8E-trien-10-ona (12)

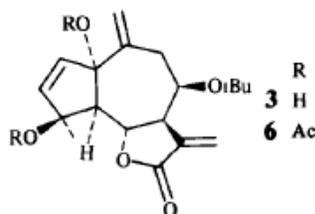
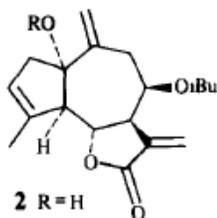
FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA



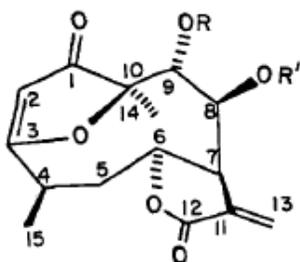
97) apocalepruna-1,4E-dien-6,9-olido (13) y 98) 6β,10-oxidocalepruna-1,4E-dien-9β-ol (14)



99) 6,9-oxido calepruna-1,4E-dien-10-ol (115) 100) subcordatólido B. 101) 8-epi-isobutirilrupicolino A



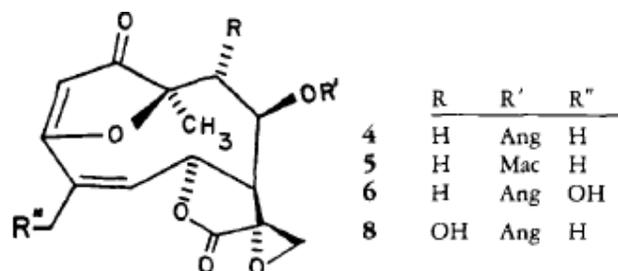
102) 8-epi-isobutirilrupicolino B (2), 103) subcordatólido A (3), 104) diacetano de subcordatólido A (6)



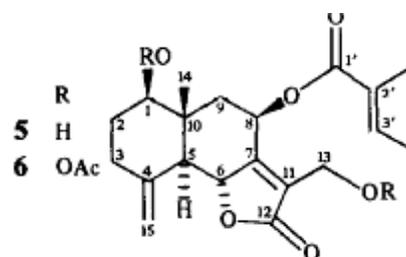
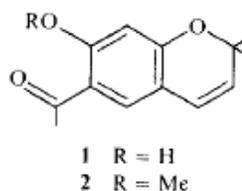
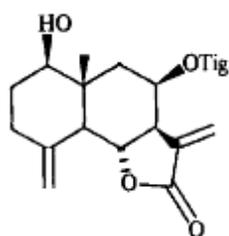
1 R=Ac, R¹=Mac*
2 R=H, R¹=Ang*
3 R=H, R¹=Mac

105) 9a-acetoxizexbrevino (1) 106) 8β - angeloiloxi-9α-hidroxiculicatulido(2)
107) 8β- metilacriloiloxi-9α- hidroxiculicatulido (3)

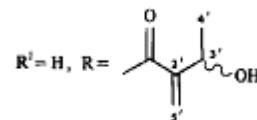
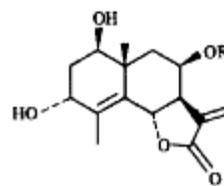
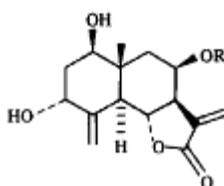
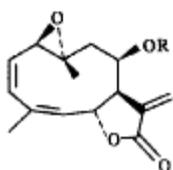
FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA



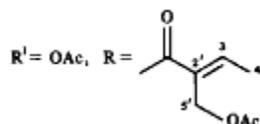
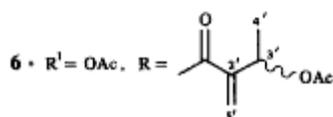
108) 11,13-dihidro-11 α . 13-epoxiatripliciolido-8 β -angelato(4) **109)** 11,13-dihidro-11 α ,13 epoxiatripliciolido-8 β -O-metilacrilato (5) **110)** 15-hidroxi-11,13-dihidro-11 α ,1 3-epoxiatripliciolido-8 β -O-angelato(6) **111)** 9a-hidroxi-11 a.1 3-epoxyatripliciolido-8 P-O-angelato (8)



112) 8 β -tigloxireinosino (1) **113)** tricomatólido A (5), **114)** diacetato de tricomatólido A (6).

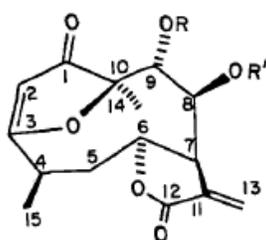


115) 3-deoxi-2,3-dehidroheliangino (1) **116)** trucomatólido B (2) **117)** tricomatólido C (3) **118)** tricomatólido D (5)

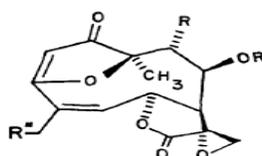


119) acetato de tricomatólido D (6) y **120)** acetato de tricomatólido E (8)

FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA

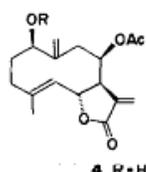


2 R=H, R¹=Ang*
3 R=H, R¹=Mac

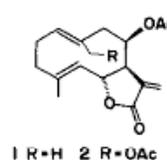
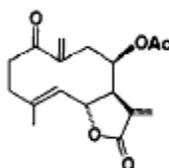


	R	R'	R''
4	H	Ang	H
5	H	Mac	H
6	H	Ang	OH
8	OH	Ang	H

- 121)** 8β-angeloiloxi-9α-hidroxicaliculatolido(2) **122)** 8 β-metilacriloxi -9α -bidroxicaliculatoildo (3)
123) 11,13-dihidro-11α,13-epoxiatripliciolido-8β-O- angelato(4) **124)** 11,13-dihidro-11α,13-epoxiatripliciólido-8β-O- metalacrilato (5) **125)** 15-hidroxi-11,13-dihidro-11α,13-epoxiatripliciólido-8β-O-angelato 6 **126)** 9α-hidroxi-11α-13-epoxiatripliciólido-β-O-angelato (8)

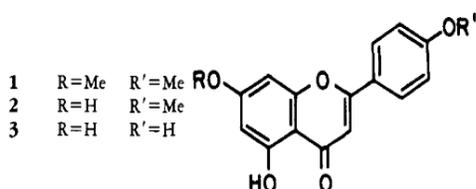


4 R=H

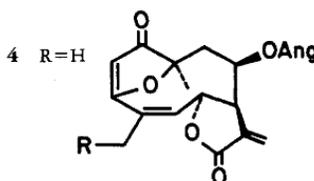


1 R=H 2 R=OAc

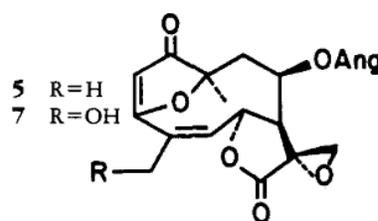
- 127)** acetato de eupatólido **128)** acetado de ovatifolin **129)** acetato de ridentino-8-O (4) y **130)** 8β-acetoxi derivado de anhidroverlotorino (5).



1 R=Me R'=Me
2 R=H R'=Me
3 R=H R'=H

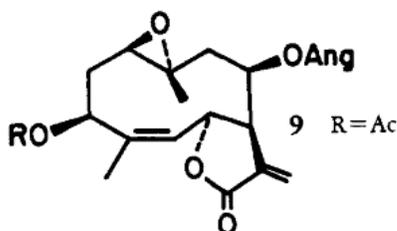


4 R=H

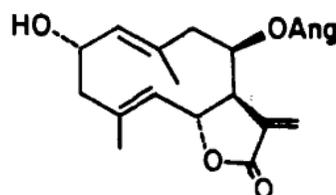


5 R=H
7 R=OH

- 131)** 0-metil acetino (1), **132)** acetino (2) y **133)** apigenino (3) **134)** angelato atripliciólido(4)
135) 11,13-dihidroxi-11,13-atripliciólido (5) **136)** 11,13-dihidroxi-11 α,13-epoxiatripliciólido 8β-O-angelato(5)

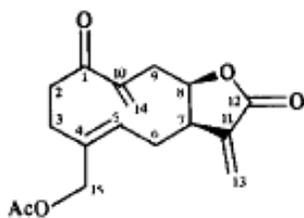


9 R=Ac

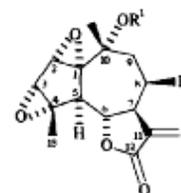


- 137)** acetato de leptocarpino (9) **138)** 2α-hidroxi-eupatólido-8-O-angelato (10)

FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA

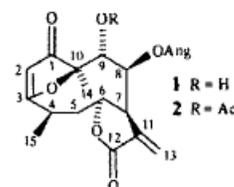
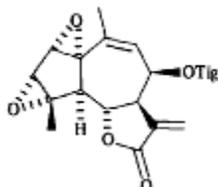
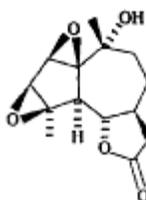


- 1 R = OTiglate, R¹ = H
 2 R = H, R¹ = H
 3 R = OTiglate, R¹ = CONHCOCCl₃



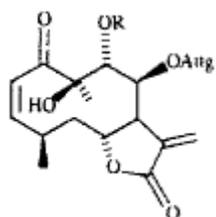
139) calbertólido A 140) calbertólido B 141) calbertólido C 142) solidaginólido A(1)

143) artecanino (2) y 144) derivado de tricloroacetil carbamato

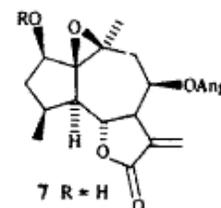
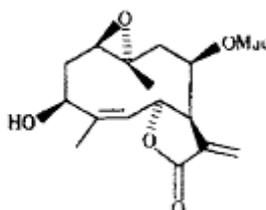


- 1 R = H
 2 R = Ac

145) canino 146) solidaginólido B (5) 147) 8β-angeloiloxi-9α-hidroxi-calicutólido (1) 148) 8 β-Angeloiloxi-9α -acetoxicalicutólido (2).

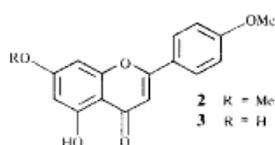
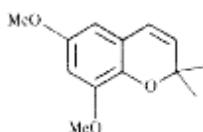


- 3 R = H
 4 R = Ac



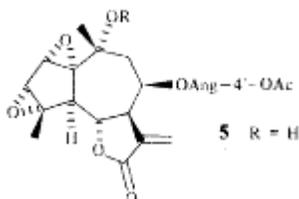
- 7 R = H

149) desacetilcaleina A(3). 150) caleina A 151) erioflorina (6) 152) 8β-angeloiloxileptocefalido (7)

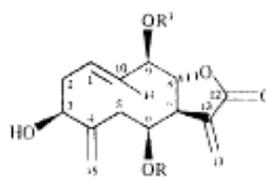


- 2 R = Me
 3 R = H

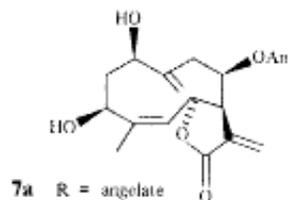
153) prunicromeno 1 154) O-metil acetino (2) 155) acetino (3) y 156) jamaicólido A (4a).



- 5 R = H



- 8a R¹ = Ang. R = Ac



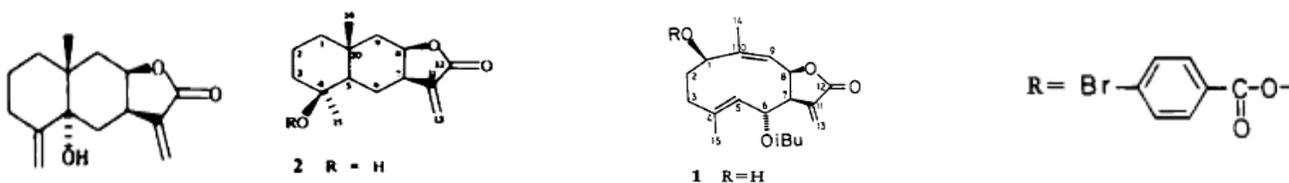
- 7a R = angelate

157) jamaicólido B (5) 158) jamaicólido (7a) 159) jamaicólido D (8a).

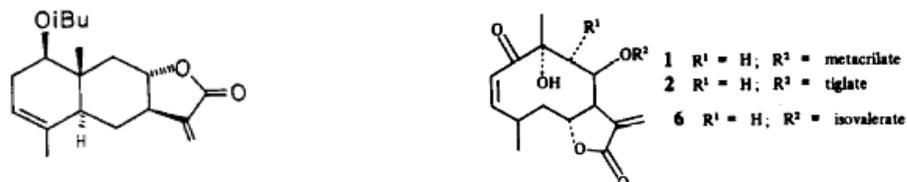
**FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS
ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA**



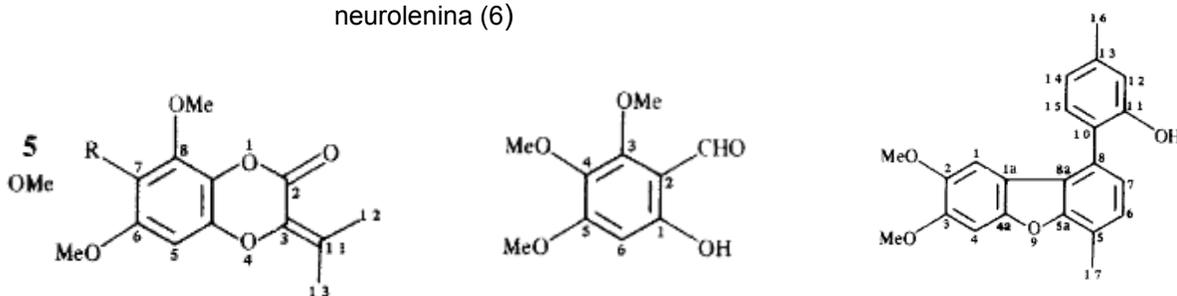
160) 9 α -hidroxiatriplicíolido-8-O-isoburato (**4**) y **161)** 5 β -mirnetil-4 β -5-dihidroatriplicíolido-8-O-Isovalerato (**6**)



162) telekino (**1**) **163)** septiplinólido (**2**) **164)** subcordatólido D (**1**) **165)** subcordatólido D- β -bromobenzoato (**4**)

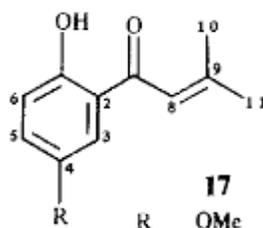


166) subcordatólido E (**5**) **167)** caleina E (**1**) **168)** caleine F (**2**). **169)** neurolenina (**6**)

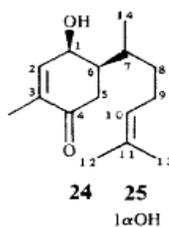


170) 7-metoxicaleteucrino (**5**) prunicromeno B A y C **171)** 3,4,5-Trimetoxisalicialdehido **172)** caleprunifolina (**16**)

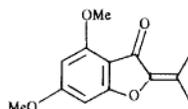
FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA



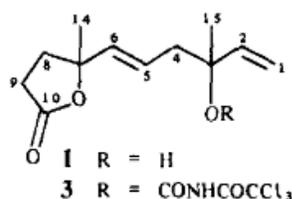
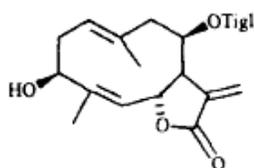
172) caleprunifolina (16) y **173)** 2-senecioil-hidroquinona-4-O-metil éter(17). **174)** acetato de 5 α -hidroperoxi-costol (23).



175) 4,6-dimetoxi-2-isopropil ideno-3-oxo-2,3-dihidrobenzofurano (3) **176)** 1 β -hidroxi-bisabola-2,10-dien-4-ona (24) y **177)** 1 α -hidroxi-bisabola-2,10-dieno-4-ona (25)

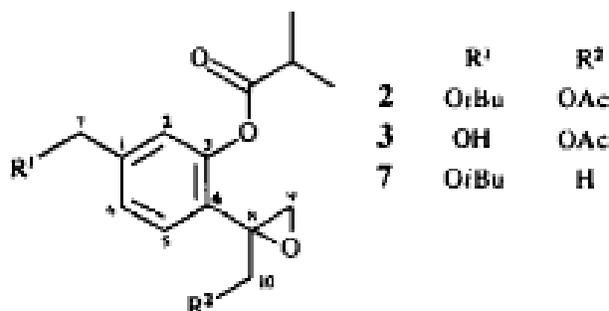


178) 4-hidroxi-3-metoxibisabola-1,10-dieno (26) **179)** 1 α -hidroperoxi- 8 β -tigloiloxi guaia-3,9,11 (13)-trien-12,6 α olido(28)

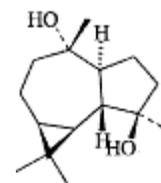
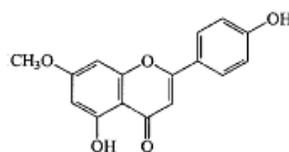
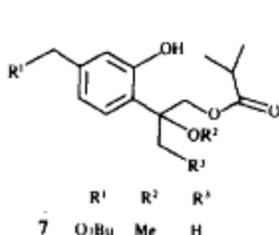


180) 3 β -hidroxi-8 β -tigloiloxiheliangólido (31) **181)** crocinnervólido (1) **182)** carbamato (3)

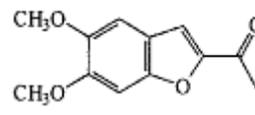
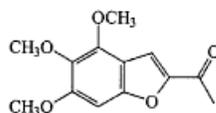
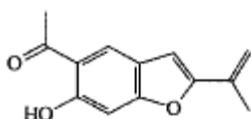
FIGURA 3.- ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ENCONTRADOS EN EL GÉNERO DE CALEA



183) 10-acetoxi-8,9-epoxi-7-isobutiriloxitimol isobutirato (2). **184)** 10-acetoxi-8,9 epoxi-7-hidroxitimol isobutirato (3) **185)** 8-hidroxi- 9 acetoxi-10- isobutiriloxitimol (4). **186)** 7-acetoxi-8-hidroxi-9,10-diisobutirioxitimol (5). **187)** 7-isobutiriloxi-8,9-dihidroxitimol (6)



188) 7,9-di-isobutiriloxi-8-metoxitimol (7) **189)** genkwanina **190)** (+)- 4 α , 7 β aromadendranediol



191) euparina **192)** caleprunina a **193)** caleprunina b **194)** euparona

Anexo 16.3.- PREPARACIÓN DE LA ESCALA MC-FARLAND

Se utiliza dicha escala para realizar suspensiones bacterianas, ajustándolas a un patrón. Generalmente se suele usar el 0.5, para esto se toma una muestra de nuestra bacteria y la inoculamos en un tubo con solución salina, en el momento en que se produzca un poco de turbidez, ya estamos en el 0.5 (de forma visual). La finalidad, es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. La escala se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia del ácido sulfúrico (tabla 14).

- Agregar a los tubos los volúmenes de los reactivos que se mencionan en la tabla
- Una alícuota de 0.1 ml de BaCl_2 (1%) se agrega a 9.9 ml de H_2SO_4 al 1% con agitación constante para mantener la suspensión.
- La suspensión de sulfato de bario debe transferirse en alícuotas de conforme indica la tabla a tubos con tapa atornillada del mismo tamaño, como los que se usan para el crecimiento o dilución del inóculo de bacterias.
- Estos tubos deben estar bien sellados y almacenados en la obscuridad a temperatura ambiente.
- El estándar de turbidez debe ser bien agitado. El estándar de sulfato de bario debe ser reemplazado o verificado su densidad mensualmente.

CUADRO 15.- ESQUEMA DE LAS CONCENTRACIONES DE LA ESCALA DE MCFARLAND

Tubo	Ba Cl ₂ 1%	H ₂ SO ₄ 1%	U.F.C/ml
1	0.1 ml	9.9 ml	3.0×10^8
2	0.2ml	9.8 ml	6.0×10^8
3	0.3ml	9.7 ml	9.0×10^8
4	0.4 ml	9.6 ml	1.2×10^9
5	0.5 ml	9.5 ml	1.5×10^9
6	0.6 ml	9.4 ml	1.8×10^9
7	0.7 ml	9.3 ml	2.1×10^9
8	0.8 ml	9.2 ml	2.4×10^9
9	0.9 ml	9.1 ml	2.7×10^9
10	1 ml	9 ml	3.0×10^9

17- BIBLIOGRAFÍA

1. Akira Hiraishi 1999. Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88: 449-460
2. Alejo. C., J.M., Tun S.J.M., Moguel C. S., Marbán M. N., Medina B. L., Simá P. P., Peraza S.S.R., Gamboa A. M.M. (2006). *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native Yucatecan plants. *Nematrópica*. 36: 89-96
3. Armstrong W. D., Wesley W. Spink and Jeanne Kahnke. 1943. Antibacterial Effects of Quinones. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 53:230-234
4. Atta ur R., Iqbal C.M, Thomsen J.W. (2001). *Biosat: Techniques for drug development* Ed. Harwood Academic Publisher. 47-60
5. Bailac. P, *Dellacasa A, Bernasconi H. O, H. Firpo N. H y Ponzi M.* (2000). Composición del aceite esencial y actividad antimicrobiana de *Eupatorium patens*. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 45: 207-211. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-1644200000200006&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0366-1644. doi: 10.4067/S0366-1644200000200006
6. Balleza . J. De. J. y Villaseñor .J. L. (2002), La familia Asteraceae en el estado de Zacatecas (México). *Acta Botánica Mexicana* 59: 5-69
7. Barbachyn R.M, Douglas K. Hutchinson, Dana S. Toops, Raymond J. Reid, Gary E Zurenko, Betty H. Yagi, Ronda D. Schaadt, John W. Allison.(1993). U-87947E, a protein quinolone antibacterial agent incorporating a bicycle[1.1.1]pent-1-yl (BCP) subunit Original Research Article. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 3:671-676
8. Bauer D.J.(1986). *Análisis clínicos: métodos e interpretación*. Editorial Reverté. S.A. Barcelona España. 917-924
9. Baveja J.K, Willcox M.D, Hume E.B, Kumar N, Odell R, Poole Warren L.A. (2004). Furanones as potential antibacterial coatings on biomaterial. *Biomaterial* 25:5003-5012
10. Bermúdez. A., Oliveira M. M. y Velázquez D., (2005). Science Scientific Electronic Library Online 30:8. Consultada el ocho de abril del 2010. En línea: <http://scielo.investigaciónnetnobotanica.html>
11. Bryan H.A., A. Bryan C., G. Bryan C., (1971). *Bacteriología: principios y practicas*, Compañía editorial continental México D.F. pp 15, 97-111, 125-126
12. Bohlmann F., K. und Jakupovic. J. (1979a). Neue germacranolide aus *Calea urticifolia*. *Phytochemistry*.18: 119-123
13. Bohlmann F., ZDero C Mohammadi D., M.King. R., and Robinson H.(1981b) Heliangolides and Neurolidol and p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea species*. *Phytochemistry*.20: 1643-1641
14. Bohlmann F., ZDero, Fritz U, King M.R, Robinson H. (1981c). Fourteen heliangolides from *calea species*. *Phytochemistry*.20: 743-749
15. Bohlmann F., K. Gupta. R., Jakupovic. J, M.King. R and Robinson H.(1981d). Eudesmanolides and Heliangolides from *Calea rotundifolia*. *Phytochemistry*.20: 1635-1637
16. Bohlmann F., K. Gupta. R., Jakupovic. J, M.King. R and Robinson H.(1982e). Two furanoheliangolides from *Calea angusta*. *Phytochemistry*.21: 2117-2118
17. Bohlmann F., K. Gupta. R., Jakupovic. J, M.King. R and Robinson H.(1981f). Furanoheliangolides and Farnesol derivatives from *Calea hispida*. *Phytochemistry*.21: 2899-2903
18. Bohlmann F., Mathur R, Jakupovic. J, K. Gupta. R., King M. R and Robinson H.(1982g). Furanoheliangolides and other compounds from *Calea hymenolepis*. *Phytochemistry*.21: 2045-2048
19. Bohlmann F., Bapuji. M, and Robinson H.(1982h). New Heliangolides from *Calea oxylepis*. *Phytochemistry*.21:1164-1166
20. Bohlmann F., Borthakur N., R and Robinson H. (1982i). Germacrane and Eudesmane derivatives from *Calea reticulata*. *Phytochemistry*.21:1793-1794
21. Bohlmann F., Mohammadi D., Sepehrouy P. M., Jakupovic J., M.King. R., and Robinson H.(1982j). Three furanoheliangolides from *Calea villosa*. *Phytochemistry*.22: 1069-1072
22. Bohlmann F., Mohammadi D., Sepehrouy P. M., Jakupovic J., M.King. R., and Robinson H.(1984k). Germacranolides related to chaplatrin from *Calea harleyi*. *Phytochemistry*.22: 1095-1097

23. Borges del Castillo J y T. Manresa M. F., (1980b). Salvadoriam Compositae. I. Calein D y 2,3-epoxycalin D, 2 germacranolidos from *Calea urticifolia*. *Anales de Química*, 77(1)
24. Borges del Castillo J., T. Manresa M. F., F. Rodríguez L and P. Vázquez Bueno. (1981a). Salvadoriam Compositae. II. Juanislamin and 2,3-Epoxy-Juanislamin, Two new Sesquiterpenic Lactone from *Calea urticifolia*. *Journal of Natural Products*. 44,348-350
25. Boutaghane, A Kabouche, A.M. El-Azzouny and Z.Kabouche.(2008). Composition of the essential oil of *Chrysanthemum macrocarpum* from Algeria. *Chemistry of Natural Compounds*. 44:817-818
26. Castro V.(1984). A new type of sesquiterpene and acorane derivate from *Calea prunifolia*. *Journal of Natural Products*. 47:802-808
27. Castro V, Tamayo C.G, Jakupovic J. (1989).Sesquiterpene lactone and otherconstituents from *Calea prunifolia* and *peckii*. *Phytochemistry* 28:2415-2418
28. Cebrian J., Torreclavero, R y Guarga, J. (2002). Enciplopedia Integral de Plantas medicinales . EgesaRBA, Barcelona. Pp 6-11
29. Crespo M. Del P.(2005). La resistencia bacteriana: ¿estamos preparados para detectarla?. *Revista de Asociación Colombiana de Infectología*, 9:31-42
30. Cronquist A. (1981). An Integrated system of classification of flowering plants. Ed Colombia University Press, E.U.A. Pág., 851-852
31. Domingo D, López-Brea M., (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista. Española. Quimioterapia*. 16:385-388
32. Domínguez X.A. (1979). Métodos de investigación Fitoquímica. Ed Limusa. Pág. 81,93,111, 155,161, 173
33. Eagle H and Musselman A.D. (1948). The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration and its paradoxically reduced activity at high concentrations agains certain organisms. *Journal Experimental Medicine*.88:127-133
34. Enríquez L. Comunicación personal de vendedores del mercado de sonora, (2009).
35. Escobar. O., y Ochoa Gaona. (2007). Estructura y composición florística de la vegetación del Parque Educativo Laguna Bélgica, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78: 391- 419
36. Evans A.(1996). Viral infections of humnas. *Epidemiology and control*. Ed. Plenum medical. 900-1250
37. Ferdinand B and Jasmin J., (1979). New germacranolidos of *Calea urticifolia*. *Phytochemistry*. 18: 119-123.
38. Fernandez J, D. Buitrago, J. Velasco, L. Rojas, A. Morales.(2008). *Revista Latinoamericana de Química*. 36:30. En línea: <http://www.relaquim.com/archive/2008/p2008361-29.pdf>
39. Ferraz F.A, Pinheiro S.P, de Oliveira de P, Lino L.F, N. Pivada J, Pereira P. (2009). Pharmacological and evaluation of *Calea clematidea* and *Calea uniflora*
40. Ferreira S.Z, Roque F.N, Gottlieb R.o, Oliveira F and Gottlieb E.H. (1980). Structural clarificación of germacranolidos from *Calea* especies. *Phytochemistry*. 19: 1481-1484
41. Fischer.N.,Young L I., R. Fronczek F.,(1982). Two sesquiterpene lactones of *Calea ternifolia* var. *calyculata*. *Journal of Natural* .21. . 2313-2316.
42. Fischer.N H., Young L I., R. Fronczek F.,(1984). Three new furanone-type heliangolidos from *Calea ternifolia* and the molecular structure of 8 β -angeloyloxy-9 α -hydroxycalyculatolide. *Journal of Natural Product*. 47:419-425.
43. Flach A. Gregel B., Simionatto E, da Silva F.U. Zanatta N, Morel F.A. Linares B.E and Alve H.S. (2002). Chemical analisis and antifugal activity of the essential oil of *Calea clematidea*. *Planta medica* 68: 836-838
44. Gamazo de la R., López G. I., Diaz R., (2008). Manual de microbiología. 3ra edición. Ed Elseviermasson. Barcelona España. 127-131
45. Garavito G, Rincon J, Arteaga L, Hata Y, Bourdy G, Jimenez A, Pinzón R, Deharo E. (2006). Antimalarial activity of some colombian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology* 107: 460-462
46. Gomes C. M.R., Márcia E.S. Viana, Israel Felzenszwalb, Francisco J.R. Paumgarten.(2005). Evaluation of β -myrcene, α -terpinene and (+)- and (-)- α -pinene in the *Salmonella*/microsome assay Original Research Article. *Food and Chemical Toxicology*, Volume 43: 247-252

47. G. Ober. A., Fronczek R and H Fisher (1984a).The molecular structure of new eudesmanolido, subcordatolido B, from *Calea subcordata*. Journal of Natural Products. 47:626-629
48. G. Ober. A., Quijano L, E. Urbatsch and Nicolaus H. Fischer. (1984b). Guaianolides from *Calea subcordata*. *Phytochemistry*. 23:1289-1292
49. G. Ober. A., Quijano L, E. Urbatsch and Nicolaus H. Fischer. (1984c).Eudesmanolides from *Calea trichomata*. . *Phytochemistry*. 23:910-912
50. G. Ober. A., Quijano L, E. Urbatsch and Nicolaus H. Fischer. (1984d).Eudesmanolides, trichomatolides B-E and A heliangolide from *Calea trichomata*. . *Phytochemistry*. 23: 1439-1443
51. G. Ober. A., Fronczek R.F and Nicolaus H. Fischer. (1985e). Sesquiterpene lactone of *Calea divaricata* and molecular structure of leptocapin acetato. Journal of Natural Products. 48:302-306
52. G. Ober. A., Lowell E. U., and Nicolaus H. Fischer. (1985f). Germacranolides, calbertolides a, b and c, from *Calea berteriana*. *Phytochemistry*. 24:1743-1745
53. G. Ober, A., Lowell E. U., and Nicolaus H. Fischer.(1985g).Two guaianolides from *Calea solidaginea*. *Phytochemistry*. 24: 2728-2730.
54. G.Ober. A., Lowell E. U., and Nicolaus H. Fischer. (1986h). Sesquiterpene lactones from *Calea leptcephala*. *Phytochemistry*. 23:467-470
55. G.Ober. A., Nicolaus H. Fischer.and Parodi F (1986i). Jamaicolides A-D four sesquiterpenos lactones de from *Calea jamaicensis*. *Phytochemistry*. 25:887-881
56. G.Ober. A., Nicolaus H. Fischer.and Parodi F (1987j).Sesquiterpene lactones from *Calea septuplinervia*. *Phytochemistry*. 26:848-849
57. G. Ober . A., Fronczek R and H Fisher (1987k).Two new sesquiterpene lactone from *Calea subcordata* and the molecular structure y absolute configuration of subcordatolido D. Journal of Natural Products. 50:604-611
58. Granados P. R., Villaverde P. Ma. C.,(1996). Microbiología.Ed Paraninfo. 25,26
59. Hertz W. and Kumar N. (1980). Sesquiterpene lactones of *Calea zacatechichi* and *C. urticifolia*". *Phytochemistry*. 19: 593-597.
60. Herrera Hidalgo, M.L. (2004). Interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica)*,39:61-65. ISSN 1017-8546
61. Herrera P.E, Alejo C.J, Tun S, Gamboa A.M, Marbán M, Extractos acuosos de *Calea urticifolia* para el control de *Meloidogyne incognita*. (2009). *Nematropica* 39:289-296
62. Hutterer, E.O., (2000).La medicina tradicional cuestionada: antecedentes, perspectivas y prospectivas en México y Latinoamérica. 2ª ed. Extra excell. Mexico D.F. pág. 135-140
63. Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gérard A. (2004). Microbiología médica. Tercera edición. Editorial Iberoamericana, México.130-136
64. Koneman W.E., Allen D.S., Janda M. W., (1999). Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas color. 5ª edición. Editorial Medica panamericana. 748-789
65. Kuklinski C. (2000). Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ed Omega. Barcelona –España. 106-109, 112-116, 119-124, 134-140, 146-153. 167-186
66. Kurt Königsberger, Herfried Griengl.1994. Microbial Baeyer-Villiger reaction of bicyclo[3.2.0]heptan-6-ones — a novel approach to sarkomycin A Original Research Article. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2; 595-604
67. Kumar D, V. Buchi Reddy, Shashwat Sharad, Urvashi Dube, Suman Kapur.(2009).A facile one-pot green synthesis and antibacterial activity of 2-amino-4H-pyrans and 2-amino-5-oxo-5,6,7,8-tetrahydro-4H-chromenes. *European Journal of Medicinal Chemistry, Volume 44: 3805-3809*
68. Lawrence P, (1973). *Phytochemistry*. Tomo II. Organic metabolites.Van Nostrand the in Hold company New York. 120-150
69. Lee Y.I, Fronczek R.F, Malcolm A and Fisher H. (1982).New germacranolides from *Calea ternifolia* and molecular structure of 9 α -hidroxy-11,13-dihidro-11 α ,13-Epoxyatripliciolido-8 β -o-[2-methylacrylate]. Journal of Natural Products 45:311-316
70. Linares E, Flores P. B, Bye R., 1993. Selección de plantas medicinales en de México. Ed UTEHA. México D.F.19-21

71. Lock. U. O. (1994). Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios. Pontificada Universidad de Perú. Consultada el 12 de abril del 2010. Disponible en línea: <http://Plantas medicinales del Perú - ANÁLISIS FITOQUIMICO Y METABOLITOS SECUNDARIOS.mht>
72. Luna M.C. del C., (2002). Ciencia, conocimiento tradicional y etnobotánica. *Etnobiología* 2: 120-135
73. Maldonado E, Márquez C and Ortega A. (1992). A thymol derivate from *Calea nelsonii*. *Phytochemistry* 31:2527-2528
74. Mannfried, P., (2002). Gran manual de plantas medicinales. 3ª Ed. Everest. México D.F.164-165
75. Martini N. D., D. R. P. Katerere, J. N. Eloff. 2004. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 93: 207-212
76. Martínez. L. J., López F., Mendoza L., Quintanilla M., (2006). Plantas medicinales: una propuesta de enseñanza de química orgánica a través de un enfoque didáctico para su comprensión. Análisis preliminar. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 5:100-106
77. Martínez M, Sánchez A.V and Nathan J.P, (1987). Thymol derivatives *Calea nelsonii*. *Phytochemistry* 26:2577-2579
78. Martínez M, Esquivel B and Ortega A (1987). Two Caleines from *Calea zacatechichi*. *Phytochemistry* 26:2104-2106
79. Matsuura. N., Yamada. M., Suzuki. H., Hasegawa. N., Kurosaka Ch., Ubukata M., Tanaka T. and linuma M., (2005). Inhibition of Preadipocyte Differentiation by Germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 Cells. *Biochemistry*. 69: 2470-2474
80. Mendes do Nascimento A, Sosa. F., Rodrigues de Olivera C.D. (2002a). Constituents of *Calea platylepis* Sch. Bip. Ex Baker. *Biochemical systematic and ecology*.30: 993-996
81. Mendes do Nascimento A., Salvador.M.,J.,Candido. C.,R., Ito Y. I., C.R. de Oliveira D., (2004b). Antimicrobial activity of extracts and some compounds from *Calea platylepis*. *Fitoterapia* 75.514–519
82. Mendes do Nascimento A, Rodrigues de Olivera C.D. (2007c). A new-deoxyflavone glycoside from aerial parts of *Calea clauseniana*. *Science Direct: Carbohydrate Research*. (342). Pp1261-1263
83. Meyers A. (1974). Heterocycles in organic synthesis. John Wiley&Sons. New York. 99,140,156
84. Nakagawa Y, Munekazu I., Nobuyasu M., Kong Y., Makoto N., Toshihiro N. and Yukihiro A.(2005). A Potent Apoptosis-Inducing Activity of a Sesquiterpene Lactone, Arucranolide, in HL60 Cells: a Crucial Role of Apoptosis-Inducing Factor *Journal. Pharmacology Scient*. 97:242-252.
85. Nash L..D and O.Williams. (1976). Flora of Guatemala. Ed.FieldMuseum of Natural History. G. 24:222-223
86. Lourenco O .T., Akisue G. and F. Roque N.(1981). Reduced acetophenone derivatives from *Calea cuneifolia*. *Phytochemistry*. 20: 773-776.
87. Pérez G. R. M.2009. An antibacterial sesquiterpene lactone from fresh-water alga *Vaucheria sessilis*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8, 289-294 Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica Chile
88. Pino A. J. A., Ortega L. Ariel G, Rosado P. Aristides Rodriguez J. M. y Baluja R.2006. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) n. e. Brown. *Rev Cubana Farm* [online]. 1996, 30(1) Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475151996000100007&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0034-7515.
89. Pradeu D y Cohen Y. (1998). Análisis químicos y Farmacéuticos de medicamentos. Ed Noriega editores. Mexico D.F. 818-836
90. Ogunwande I.A, Olawore N.O, Schmidt J.M, Setzer W.N, Ekundayo O, Waker T.M. (2005). Studies on the essential oils composition antibacterial and citotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *The international Journal of Aromatherapy*. 15:147-152
91. Ohguchi. K. I, Masaaki I, Kouji Y, Munekazu I, Tomohiro I, Yoshinori N, and Yukihiro A, (2009), Effect of sesquiterpene lactones on Melanogenesis in Mouse B16 Mellanona Cells. *Biology Pharmacology Bulletin*.32:308-310
92. Onzaga I.L, Rincón J, Guerrero F.M, (2008). Perfil vasodilatador y la fracción flavonoide acetilada de *Calea prunifolia* HBK. *Colombia Médica* 39:33-40

93. Ortega A, del C. P, Maldonado E. (1989). A trisnorsesquiterpeno lactone and other sesquiterpenes from *Calea crocinervosa*. *Phytochemistry* 28:2735-2736
94. Osuna Torres L, Tapia P. E. Aguilar Contreras A. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fisicoquímico y farmacológico. Ed Publicaciones Ediciones Universitat de Barcelona.16-19
95. Plaus A, Saez F. G. y Ataucusi G. S. 2001. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Revista Medica Herediana*12:16-19. ISSN 1018-130X. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v12n1/v12n1ao3.pdf>
96. Prescott M, Harley P, Klein A. (1999). Microbiología. Cuarta edición. Mc-Garw-Hill Interamericana. España. 1000-1010
97. Ramos, G., P. Frutos, F.J. Giráldez y A.R. Mantecón. (1998). Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. *Archivo. Zootecnia*. 47: 597-620.
98. Ramirez, M. R., Geracitano, L., MARTI B. D, 2009.Efectos beneficiosos de extractos de frutas rojas y de sus antocianos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8:460-461. En línea: http://scholar.google.com.mx/scholar?hl=es&q=hidroxitolueno%2C+butilado+and+antibacteriana&lr=&as_ylo=&as_vis=0
99. Rahmann M.M, Middleton M, Nahart L, Murphy E, Sarker D, Bryes M, Kumarasa M, Siakalima M. 2005. Bioactividad de la umbelluprenina, principal componenete de las semillas de *Agelica sylvestris*. *Ars Pharmaceutica* 46:35-41
- 100.Robersts I, Margaret F.J, Wink Michael.1998. Alkaloids: Biochemistry, ecology and medicinal applications .Ed Margaret F Roberts and Michael Wink. .398-400
- 101.Rzedowki J. (1983). Vegetación de México. Ed. Limusa, México.13-21
- 102.Sárda R.V.L., Avancini.C., Gonçalves K., Toigo E. and von Poser G., (2008). Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary parasitology*. 151: 351-354
- 103.Sepúlveda J G, Porta D H y Rocha S M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21: 355-363
- 104.Schemeda H.G, Jakupovic J and F. Bohlmann. (1986). A Myrtenylfuranoheliangolide from from *Calea rupicola*. *Phytochemistry* 25:1753-1754
- 105.Schemeda H.G, Zdero C, Baraua N.R and F. Bohlmann. (1985). Further sesquiterpene lactones from *Calea* and *Viguiera* species. *Phytochemistry* 24:2019-2022
- 106.Shafaghat A.(2009). Composition and Antibacterial Activity of the Volatile Oils from different parts of *Achillea tenuifolia* Lam. from Iran. *Journal of Medicinal Plants*. 8:93-98. En línea: http://sid.ir/en/VEWSSID/J_pdf/82220093112.pdf
- 107.Solano Camacho Eloy, comunicación personal (2009).
- 108.Thorarensen Atli, Brian D. Wakefield, Donna L. Romero, Keith R. Marotti, Michael T. Sweeney, Gary E. Zurenko, Douglas C. Rohrer, Fusen Han, Garold L. Bryant Jr.2007. Preparation of novel anthranilic acids as antibacterial agents. Extensive evaluation of alternative amide bioisosteres connecting the A- and the B-rings *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Volume 17, Issue 10, 15 May 2007, Pages 2823-2827
- 109.Trease G.C. and Evans.G.E. (1973). Farmacognosia. 13 ed., Ed Interamericana- Mc Graw-Hill. 261-279
- 110.Tyler.V.E, Brady. R.L., Robbers. E.J., (1979). Farmacognosia. Ed el Ateneo. Buenos Aires, Argentina 7ª edición. 114-149
- 111.Ugur A, Sarac N, Duru M, (2009). Antimicrobial activity and chemical composition of senesio sandrasicus on antibiotic resistant staphylococci. *Nat Prod Commun* 4:579-584
- 112.Umemura. K. , Tomohiro I, Nanako H, Yasunori F, Yukihiro A, Yoshinori N,Nobuyasu M, Mune kazu I, Masafumi I,(2008).Preconditioning by sesquiterpene lacton enhances H2O2-induced Nrf2/ARE activation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 368: 948–954
- 113.Vanden B.D.A. and Vlietinck A.J. (1991). Screening Methods for Antibacterial and antiviral agents from Higher plants. *Method in plant Bioquemistry* 6: 47-60

114. Vargas D, Ober A.G, Fisher N. (1989) Sesquiterpene lactone from three populations of *Calea urticifolia*. *Revista Latinoamericana de Quimica*.20:11
115. Venegas F.H., Segura. C.D., Vázquez. C. B., (2002). Antiinflammatory Activity of the Aqueous Extract of *Calea zacatechichi*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 45: 110-111
116. Vichnewski W, García G.E, Herz W. (1982). Heliangolido from *Calea lantoides*. *Phytochemistry*. 21:464-465
117. Vieyle C. G J P. Macedo Ceja, M Hernández-Arroyo, G Arteaga-Aureoles, D Espinosa-Galván, J F. Rodríguez-Landa. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica*. 15:123- 136
118. Waller G. and Nowacki E. (1978). Alkaloid biology and metabolites in plants. Ed Plenum Press. New York. 1-40
119. Wussow J. R, E. Urbatsch L., A.G. Sullivan. (1985). *Calea* (Asteraceae) in Mexico, Central America and Jamaica. *Systematic Botany*. 10: 250-256. Consultado el 26 de enero del 2010. En línea: <http://www.jstor.org/stable/2418590>
120. Yadava R.N. y Jharbade J. 2008. New antibacterial triterpenoid saponin from *Lactuca scariola* *Fitoterapia* 79:245-49
121. Yamada M., Nobuyasu M., Hiroto S., Chihiro K., Hasegawa N., Makoto U., Toshiyuki T., Munekazu I., (2004). Germacranolides from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry*. 65: 3107-3111
122. Young L I., Fischer. N., Malcolm A and Fischer. N., (1982). New Germacranolides from *Calea ternifolia* and the molecular structure of 9p-hidroxy-11,13-dihydro-11 α ,13-Epoxyatripliciolide-8 β -O-[2-Methylacrylate]. *Journal of Natural Products* .45:311-316.
123. Zorn H, F. Neuser, R. G. Berger. 2004. Degradation of α -pinene oxide and [2 H $_7$]-2,5,6-trimethyl-hept-(2E)-enoic acid by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11761 Original Research Article. *Journal of Biotechnology*. 107: 255-263