



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ACCION "IN VITRO" DEL PRINCIPIO ACTIVO DE
LA TLATLANCUAYA (*Achyranthes calea*)
SOBRE ENTEROBACTERIAS

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ENEDINA MARTHA JIMENEZ CASTAÑEDA

MEXICO, D. F.

1978



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CLAS TESIS 1978.
ABR M. T. 245
FECHA _____
FROC. 237



JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE

PRESIDENTE: Prof. Oscar Amor Dodero.

VOCAL: Profa. Etelvina Medrano Barra.

SECRETARIO: Profa. Leonor Martínez Soto.

1er SUPLENTE: Profa. Elda Peniche Quintana.


2do SUPLENTE: Profa. Olga Velázquez Madrazo.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Facultad de Química, UNAM.

NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL SUSTENTANTE:

Enedina Martha Jiménez Castañeda.



NOMBRE COMPLETO Y FIRMA DEL ASESOR DEL TEMA:

Leonor Martínez Soto.



A MIS PADRES

LEANDRO JIMENEZ CASTRO

MARIA DE JESUS CASTAÑEDA DE JIMENEZ

A MIS HERMANOS

ENRIQUE

LEANDRO

TERE

CON SINCERO AGRADECIMIENTO A LAS MAESTRAS

LEONOR MARTINEZ SOTO Y

ELDA PENICHE QUINTANA

POR SU VALIOSA ORIENTACION.

C O N T E N I D O

- I INTRODUCCION
- II GENERALIDADES
 - A) La planta
 - B) Enterobacterias
 - C) Enfermedades entéricas
- III PARTE EXPERIMENTAL
 - A) Material
 - B) Obtención de los extractos de la Tlatlancuaya, preparación de discos, preparación de la suspensión.
 - C) Aislamiento de las cepas e identificación de los microorganismos.
 - 1) Tinción de Gram
 - 2) Desarrollo en placa
 - 3) Pruebas bioquímicas
 - 4) Conservación de microorganismos.
 - D) Efecto de los extractos sobre dichas cepas.
 - E) Antibiograma.
- IV RESULTADOS
- V CONCLUSIONES
- VI BIBLIOGRAFIA.

I INTRODUCCION

Desde épocas inmemoriales los indígenas de nuestro país y en general de toda América, han utilizado en el tratamiento de muchas enfermedades, plantas con propiedades curativas, las cuales se emplean en forma de extractos, de infusiones, o aplicadas localmente dependiendo del padecimiento y modo de acción de la hierba.

Desde su llegada al Nuevo Mundo, los conquistadores utilizaron también estas hierbas medicinales y algunos de los frailes que tomaron parte en la conquista y evangelización de América estudiaron las propiedades y efectos de estas plantas.

Estos conocimientos, preservados por la tradición y transmitidos de generación en generación, han dado lugar a la Medicina Homeopática, que se considera una creación del médico Samuel Hahnemann (1755 - 1843), quien rechazó los principios terapéuticos que dominaban en Medicina a fines del siglo XVIII, por lo que se propuso investigar con base en su experiencia personal únicamente y - mediante ensayos lo más objetivo posibles con los medicamentos, su acción y su modo de aplicación; aceptando sólo al hombre sano como apropiado para sus estudios.

En 1790, Hahnemann hizo el primer experimento con corteza de - quina, que puede provocar fiebre intermitente y concibió entonces la teoría terapéutica, que es el primer principio de la Homeopatía.

" Los medicamentos
sólo pueden curar estados
morbosos gracias a su
virtud de hacer enfermar al

hombre sano y además, sólo
son capaces de curar aquellas
enfermedades que se componen
de los mismos síntomas
que el medicamento podría
producir en el hombre sano . . . "

La corteza de quina, no sólo provoca fiebre, sino que puede -
producir un gran número de síntomas de enfermedades diferentes; por
esta razón --afirma Hahnemann-- es el remedio para numerosos pade-
cimientos.

Hahnemann confirmó de lleno su teoría, dado que ciertas enfer-
medades pueden curarse cuando se les suma una enfermedad semejante.

El segundo principio de la Homeopatía se basa en la hipótesis
de que los efectos que producen pequeñas dosis de un medicamento son
opuestos a los que se pueden presentar con grandes dosis del mismo;
de aquí que la Homeopatía utilice pequeñas dosis de sustancias, que
en dosis mayores, pueden producir la misma enfermedad y por lo tan-
to se administran todos los medicamentos en diluciones extraordina-
riamente grandes, a fin de mantenerse con seguridad, dentro de la -
dosis curativa y lejos de la patógena.

Por ejemplo, en el tratamiento de algunas fiebres con quina, -
se administran 0.06×10^{-24} g de tintura de quina; la tintura a su
vez se prepara macerando 33 % de la corteza en etanol de 65 °.

La Tlatlancuaya, que se utiliza en el tratamiento de la tifoí-
dea se administra en dosis de 1×10^{-12} g del extracto, que a su -
vez se prepara con 50 % de jugo de la planta en etanol absoluto.

Por todo esto, se piensa que la acción de los medicamentos ho-
meopáticos es independiente de la concentración de los mismos y que
su mecanismo de actividad se basa únicamente en su presencia -

en el organismo, la que probablemente reestablece el equilibrio de ciertas "fuerzas vitales", alteradas en la enfermedad.

En este caso, los medicamentos homeopáticos únicamente serán - efectivos "in vivo".

En esta tesis, se ha querido comprobar este principio para el caso del tratamiento de enfermedades entéricas con la planta Tlatlancuaya (*Achyranthes calea*), que es ampliamente utilizada en México contra tifoidea, diarreas, otras enfermedades intestinales y fiebres continuas. El trabajo representa sólo una parte del estudio, ya que se utilizan únicamente pruebas "in vitro".

Puesto que el extracto de Tlatlancuaya es utilizado en el tratamiento de infecciones entéricas se requiere de una comparación - con métodos curativos tradicionales y eficaces, empleados contra - este tipo de enfermedades. El más adecuado "in vitro" puede ser el antibiograma, que sólo tiene un valor indicativo, pero que representa un auxilio para la quimioterapia moderna, y dada la posición del Q.F.B. en el campo médico, considero útil el estudio de esta planta medicinal por dicho método.

II GENERALIDADES

A) La planta

Achyranthes calea: Tlatlancuaya, Yerba del Tabardillo de Puebla; la Farmacopea Mexicana de 1896 pág. 301 la describe con el nombre de *Iresine celocioides* ó Yerba de la Calentura, y según "La Naturaleza" de 1879 tomo II, pág. 76, *Achyranthes calea*, yerba que tiene rodillas o nudillos, familia de las *Achyranthaceas*; según ediciones posteriores de la citada Farmacopea, familia de las *Amarantáceas*. Crece en Matamoros, Atlixco, Temixco, San José Vista Hermosa, Cuautla y varios otros lugares de Puebla y Morelos que se encuentran dentro de la misma latitud. Tiene el nombre de *Achyranthes* por ser la familia a la que pertenece y el sobrenombre de *calea*, por haber sido dedicada al botánico de Puebla Don Mariano Cal.

Características:

Arbustillo de tallo estriado y nudoso, con ligeros tintes rojizos; hojas opuestas, alternas o balanceadas, enteras, lampiñas, delgadas y de color verde claro; miden de 8 a 12 cm de largo por 4 a 6 cm de ancho. Flores pequeñas, pajizas, dispuestas en panojas.

Partes usadas:

Toda la planta.

Composición química:

Según Maximino Martínez (8), el tallo y las hojas contienen celulosa, clorofila, materia grasa, pigmentos, principio extractivo amarillo, albúmina vegetal, fécula, azúcar, materias albuminoides no coagulables por el calor, óxido de potasio neutro, óxido de calcio, nitrato de potasio, cloruro de potasio y fosfato de magne-

sio; menciona además la presencia de una resina.

Análisis de la Tlatlancuaya:

Según Maximino Martínez, ex-director del Herbario Nacional, describe la siguiente composición porcentual de la Tlatlancuaya:

Grasa sólida	0.19
Aceite esencial	3.07
Caucho	0.49
Acidos cristalizables	1.95
Resina ácida soluble en éter	2.65
Resina ácida soluble en alcohol	2.60
Glocósido (semejante a la saponina)	3.85
Pectinas	1.86
Dextrina y análogos	2.32
Glucosa	1.25
Humedad	8.10
Sales minerales	11.00
Celulosa, clorofila y materia colorante amarilla (por diferencia).	60.67

Usos comunes:

La infusión se usa en el tratamiento de fiebres continuas, pues tiene efectos diaforético y diurético.

El doctor Leopoldo Hernández Chávez investigó su utilización en el tratamiento de otras enfermedades que se presentan con fiebre, principalmente en infecciones como la tifoidea, con excelentes resultados.

B) Enterobacterias

Uno de los grupos más importantes de bacterias que se encuentran en el tracto intestinal es el de las enterobacterias, o bacterias entéricas, como se denominan comúnmente. En este grupo se incluyen bacterias parásitas como Salmonella y Shigella, la primera causante de la fiebre tifoidea y la paratifoidea, genéricamente denominadas salmonelosis; otras accidental u ocasionalmente patógenas como Proteus y Klebsiella; y algunas fundamentalmente saprófitas, que habitan en el intestino normalmente y sólo en circunstancias excepcionales son causa de enfermedad, como Escherichia y Aerobacter.

Los microorganismos de este grupo son bacilos rectos, gramnegativos, no esporulados y aerobios facultativos.

La mayoría de las especies son móviles; tienen flagelos peritricos, exceptuando el género Shigella, que se caracteriza por ser inmóvil. Algunas especies de Salmonella, Escherichia, Klebsiella, Shigella, Enterobacter y Proteus, tienen fimbrias o pili.

Todos ellos fermentan la glucosa; no pueden diferenciarse en base a su morfología por lo que se hace uso de diferentes medios en tubo conteniendo otros carbohidratos cuya fermentación es básica para su diferenciación y que son:

Medio de Kliegler

Medio de SIM

Caldo Manitol-rojo de fenol

Surraco.

La mayoría de las bacterias gramnegativas poseen lipopolisacáridos complejos en su pared celular. Estas sustancias, endotoxinas, tienen una variedad de efectos fisiopatológicos.

Los organismos entéricos poseen una estructura antigénica compleja.

Género Salmonella:

Hay dos tipos de antígenos en las bacterias de este género, uno asociado con la sustancia celular y otro con los flagelos. Smith y Reagh en 1903, describieron estos antígenos, denominados antígeno somático el primero y el segundo antígeno flagelar. Después los observaron Weil y Felix, quienes los llamaron respectivamente antígenos O y H. Los O fueron arbitrariamente designados con números romanos.

El antígeno flagelar es el más inestable; es destruido por ebullición y exposición al alcohol o ácido débil; el antígeno somático resiste la ebullición, el alcohol y los ácidos. En la reacción de aglutinación, las bacterias que carecen de antígenos flagelares precipitan de manera característica, finamente granular (aglutinación O), en tanto que las bacterias que contienen antígenos flagelares se aglutinan formando un precipitado floculento y grueso (aglutinación H).

Estructura antigénica.- Los componentes de los mosaicos antigénicos somático y flagelar de las bacterias de este género han sido estudiados detalladamente aplicando los métodos de análisis antigénico, o sea la absorción recíproca de aglutininas.

Tipificación de Salmonella.- La identificación parcial o completa de los serotipos de Salmonella se logra con anticuerpo apropiado; los antisueros mono-específicos pueden prepararse por absorción, para que -

contengan anticuerpo para un solo componente antigénico. La identificación serológica de las cepas de Salmonella así realizada, se conoce como tipificación de Salmonella.

Antígeno Vi.- Un antígeno somático muy parecido al complejo antigénico O, denominado antígeno Vi, se presenta en Salmonella typhi, Salmonella paratyphi A y Salmonella paratyphi C. Se descubre prácticamente - en todas las cepas de bacilo de la tifoidea aisladas primariamente, pero sólo en algunas de paratífico A y paratífico C; tiene la misma especificidad inmunológica en todos los microorganismos en que se presenta. Fue denominado antígeno Vi ó "antígeno de virulencia" porque se supuso relacionado con ésta y porque el anticuerpo para él es de caracter protector.

C) Enfermedades entéricas

Fiebre tifoidea

La fiebre tifoidea es una infección generalizada exclusiva del hombre.

La lucha contra la fiebre tifoidea ha logrado uno de los mayores triunfos de la medicina preventiva organizada. En 1900, la proporción anual de muertes por fiebre tifoidea en los Estados Unidos era mayor de 30 por 100 000; en el año de 1944 había disminuido a 0.4 por 100 000, o sea una reducción del 99 %. Aunque la fiebre tifoidea ya no es una enfermedad común en los Estados Unidos de Norteamérica, fue una de las causas de muerte principales hace cinco o seis decenios y aún lo es en algunas regiones del mundo. Hay buenas razones para tratar este tema. El hecho de que una enfermedad sea en la actualidad rara no indica que no volverá a adquirir la frecuencia que antes tuvo. Hay aún suficientes portadores en la población para causar epidemias explosivas si la sociedad llegara a desorganizarse o los departamentos de sanidad pública no actuasen. Nosotros olvidamos con mucha facilidad que si se descuidan, aunque sea en forma temporal las precauciones sanitarias, sistemas sanitarios de alcantarillado, plantas de purificación de agua, pasteurización de leche, reglamentación sanitaria sobre alimentos y restaurantes, la amenaza de las infecciones entéricas está al acecho. Por lo tanto es bueno saber algo no solo de los gérmenes causales, sino también acerca de las medidas para el saneamiento del medio.

Tras la ingestión de Salmonella typhosa ningún otro animal experimenta fiebre remitente y prolongada; la fiebre tifoidea es una infección septicémica generalizada, casi siempre con bacteremia durante las dos -

primeras semanas de la enfermedad. Los síntomas predominantes son fiebre, cefalalgia, dolor abdominal, alteraciones del funcionamiento intestinal, anorexia y lasitud. El diagnóstico se confirma al aislar los microorganismos de la sangre, heces u orina y por la demostración de un aumento en títulos de aglutininas a los antígenos somático y flagelar del bacilo.

Historia:

En 1829, Louis describió sus descubrimientos en 158 casos, incluyendo las lesiones intestinales, la adenopatía mesentérica, la esplenomegalia, las manchas rosadas, la hemorragia intestinal y la perforación. Este gran clínico fue el primero en emplear el término tifoidea. Sin embargo, los ingleses siguieron considerando la lesión intestinal como una complicación incidental del tifo. En 1836, William Gerhard, de Filadelfia, un antiguo alumno de Louis, presentó la primera diferenciación clara y definida entre el tifo y la tifoidea, basándose en datos precisos, clínicos y anatómicos.

Entre los años de 1856 y 1870, Budd, médico inglés, sugirió que la enfermedad era contagiosa y estableció la importancia de la diseminación por las evacuaciones de las personas infectadas. La confirmación de su hipótesis hubo de esperar hasta 1885, cuando Pfeiffer aisló por primera vez el germen en una muestra de materia fecal. Se le acredita el descubrimiento del bacilo a Eberth en 1880, cuando aisló el microorganismo en frotis de ganglios mesentéricos y de bazo. En 1896 Widal describió la prueba para las aglutininas en el suero de los pacientes.

Epidemiología:

Salmonella typhosa reside únicamente en el hombre y se perpetúa en la naturaleza por medio de su transmisión desde pacientes o portadores

a personas sanas. El agua, la leche y los alimentos pueden contaminarse con heces infectadas. Es un axioma epidemiológico que para todo brote o caso esporádico de tifoidea debe haber un portador, o sea un individuo que expulse microorganismos virulentos a pesar de gozar aparentemente de buena salud. Los pacientes que excretan bacilos durante el tercero al duodécimo mes después de haber sufrido una tifoidea, son llamados portadores temporales; aquellos que siguen eliminándolos por más de un año son los portadores crónicos. Algunos de éstos que eliminan bacilos con intervalos irregulares son llamados portadores intermitentes y plantean un problema real y muy difícil para el epidemiólogo que investiga casos esporádicos en una región limitada o en una institución. Una vez identificados, se debe evitar que los portadores manejen alimentos mientras no queden libres de S. typhosa.

Las moscas transmiten la fiebre tifoidea merced a su capacidad para transportar bacilos de las heces a los alimentos.

Patogenia:

Como en otras infecciones entéricas, el agente causal tiene acceso al huésped por la cavidad bucal. El bacilo de la tifoidea resiste la acidez gástrica, pasa al intestino, se multiplica e invade la barrera mucosa. Es durante las críticas 24 a 72 horas después de la ingestión que se decide el desenlace de la infección.

Las manifestaciones clínicas y los datos histopatológicos de la fiebre tifoidea han sido atribuidos a los efectos de una endotoxina. La endotoxina de S. typhosa es un complejo lipopolisacárido-proteína con propiedades tóxicas idénticas a las de otras endotoxinas. Es un derivado de la pared celular y evoca varias acciones farmacológicas.

Anatomía patológica:

Al comienzo de la enfermedad se presenta una enteritis intespecífica en el yeyuno. Otros componentes del sistema retículo endotelial (SRE) se encuentran afectados durante los primeros días de la enfermedad. Los tejidos linfáticos faríngeos y los ganglios periféricos se encuentran aumentados de volumen; posteriormente el bazo y el hígado se vuelven palpables. Las placas de Peyer primero presentan edema y finalmente sufren necrosis, formando úlceras ovales que son numerosas en la porción terminal del íleon. La ulceración puede ocurrir en el yeyuno y en los folículos linfáticos del ciego y del colon.

Las alteraciones histológicas observadas en las lesiones intestinales son la proliferación de grandes células mononucleadas y el edema. Se presentan alteraciones similares en los ganglios mesentéricos, bazo, médula ósea e hígado (nódulos tifoídicos).

Las lesiones intestinales finalmente desaparecen, mientras que la infección en el hígado y conductos biliares puede continuar indefinidamente, lo cual caracteriza al estado del portador. Esta infección crónica no produce síntomas y no se presenta reinfección del huésped a pesar de la constante presencia de millones de bacilos en el intestino.

Sintomatología:

La infección tifoídica no diagnosticada o erróneamente tratada puede persistir como una fiebre continua o remitente durante 3 ó más semanas, con un prolongado período de convalecencia .

El promedio del período de incubación es de aproximadamente diez días y varía entre 3 y 25, lo cual probablemente depende de la dosis infectante.

La cefalalgia, el síntoma inicial más importante, es generalizada y constante y empeora a medida que aumenta la fiebre. Las molestias intestinales son de rápida instalación y se inician con continuo dolor abdominal, con frecuencia en los cuadrantes inferiores.

La fiebre aumenta en forma escalonada durante 2 ó 3 días y después toma la característica de meseta, con una elevación febril continua entre 39.5 y 40.5 °C.

Algunos pacientes tienen diarrea al principio de la enfermedad y - en muchos constituye una manifestación tardía.

Las manchas rosadas, exantema característico de las formas entéricas de salmonelosis, se presentan únicamente en 10 % de los casos.

Complicaciones:

Antiguamente se asociaban numerosas complicaciones con la prolongada convalecencia de la fiebre tifoidea. Los antibióticos y las adecuadas medidas de sostén han eliminado la profunda debilidad, pérdida de peso y demás anomalías provocadas por las deficiencias nutricionales. Sin embargo, los pacientes pueden presentar a veces tromboflebitis, artralgia y neuritis periférica a pesar de recibir alimentación suficiente.

Datos de Laboratorio:

Uno de los datos hematológicos distintivos de la tifoidea es la leucopenia, con una cifra leucocitaria de 4 000 a 6 000 células por mm^3 durante las primeras dos semanas y de 3 000 a 5 000 durante la tercera y cuarta semanas. Se observa anemia normocítica en muchos pacientes; en caso de hemorragia, es de tipo hipocrómico y microcítico.

Los gérmenes pueden aislarse de las heces y de la sangre y esta es la prueba diagnóstica más importante. Los cultivos de sangre son positivos en la mayor parte de los casos durante la primera semana febril y - parte de la segunda.

La reacción de Widal es una prueba serológica fácil y adecuada para el diagnóstico de la fiebre tifoidea. Las aglutininas específicas - aparecen en la sangre al final del séptimo o décimo días de la enfermedad. El título se eleva en forma constante alcanzando su máximo a partir de la tercera hasta la quinta semana y desciende gradualmente durante varias semanas. El título del anticuerpo flagelar (H) suele ser más alto que el del anticuerpo somático (O).

Tratamiento:

Se ha podido disminuir eficazmente la mortalidad y la morbilidad - prolongada de la tifoidea mediante la combinación de antibióticos y tratamiento de sostén.

Control e Inmunización:

Todos los casos de tifoidea deben ser comunicados a las autoridades competentes de salubridad con el fin de investigar la fuente de la enfermedad y la infección entre los contactos. Se deben cultivar las - materias fecales de los pacientes con cierta frecuencia durante la convalecencia a fin de determinar si están propagando S. typhosa. Por lo general, tres cultivos consecutivos de materias fecales negativos, obtenidos con intervalos de una semana, indican que no se ha desarrollado un estado de portador.

La eficiencia de las vacunas contra la tifoidea ha sido objeto de debate y recientemente se ha cuantificado en voluntarios su eficacia -

relativa. El microorganismo en grandes cantidades sobrepasa a la inmunidad que brinda la vacuna. Las vacunas tifoídicas pueden reducir la frecuencia de la enfermedad en áreas endémicas pero no aseguran protección completa.

III PARTE EXPERIMENTAL

A) Material

1) Cepas bacterianas

Escherichia coli

Klebsiella aerogenes

Proteus mirabilis

Proteus vulgaris

Providencia sp.

Salmonella arizona

Salmonella sp.

Shigella sp.

Salmonella paratyphi B 576

Salmonella paratyphi A

Salmonella paratyphi AH46

Salmonella typhosa 57H901

Las 8 primeras cepas fueron aisladas e identificadas en el laboratorio. Las cuatro últimas fueron proporcionadas por la Colección de Cepas de la Facultad de Química.

2) Reactivos

Solución salina isotónica

Colorantes de Gram

Papel pH

3) Medios de cultivo

Agar Salmonella-Shigella (S.S.)

Gelosa Endo

Agar eosina-azul de metileno (agar EMB)

Infusión cerebro-corazón (BHI)

Agar nutritivo

4) Antibióticos

Multidisco Bioclin para gramnegativos (multidisco para el estudio de la sensibilidad en bacterias gramnegativas a 12 antimicrobianos)

Ampicilina 10 μg

Tetraciclina 10 μg

Cloramfenicol 30 μg

Kanamida 30 μg

Gentamicina 10 μg

Estreptomicina 20 μg

Cefalosporina 30 μg

Neomicina 30 μg

Furadantina 100 μg

Acido nalidixico 30 μg

Trisulfa 150 μg

Polimixina 10 μg

5) Extractos de la Tlatlancuaya con las siguientes presentaciones:

discos

suspensión

ampolletas

tintura.

B) Obtención de los extractos de la Tlatlancuaya, preparación de los discos (impregnación con el extracto), preparación de la suspensión.

El material supuestamente antimicrobiano que se utilizó fué proporcionado por el prof. Antonio Guzmán quien obtuvo los diferentes extractos en forma similar para los tres solventes usados (hexano, etanol y cloroformo) y de las diferentes partes de la planta (tallos, hojas y raíz).

Procedimiento:

Se limpia el lugar donde se corta la planta.

Se sacan las plantas desde la raíz.

Se separan raíces, tallos y hojas.

Se cortan los tallos en pequeños trozos (y para los extractos respetivos, las hojas y las raíces).

Extracción de tallos con etanol:

Se colocan los tallos previamente pesados, en un matraz esférico de 3 000 ml, se agregan 1 500 ml de etanol (y para los extractos respectivos, hexano y cloroformo), se agita, se le coloca un refrigerante y se calienta hasta reflujo, mateniéndolo durante una hora.

Se deja enfriar y se decanta filtrando a través de una gasa, ésta se lava tres veces con porciones de 10 ml de etanol y se exprime con la ayuda de un agitador.

Se concentra (recuperando el solvente) hasta 180 ml y se transfiere a un matraz esférico de 300 ml; se sigue concentrando hasta obtener un volúmen de 25 ml y se transfiere a un matraz de 50 ml previamente pesado. Se evapora a sequedad. Se deja enfriar. Se pesa y se saca el peso del extracto por diferencia.

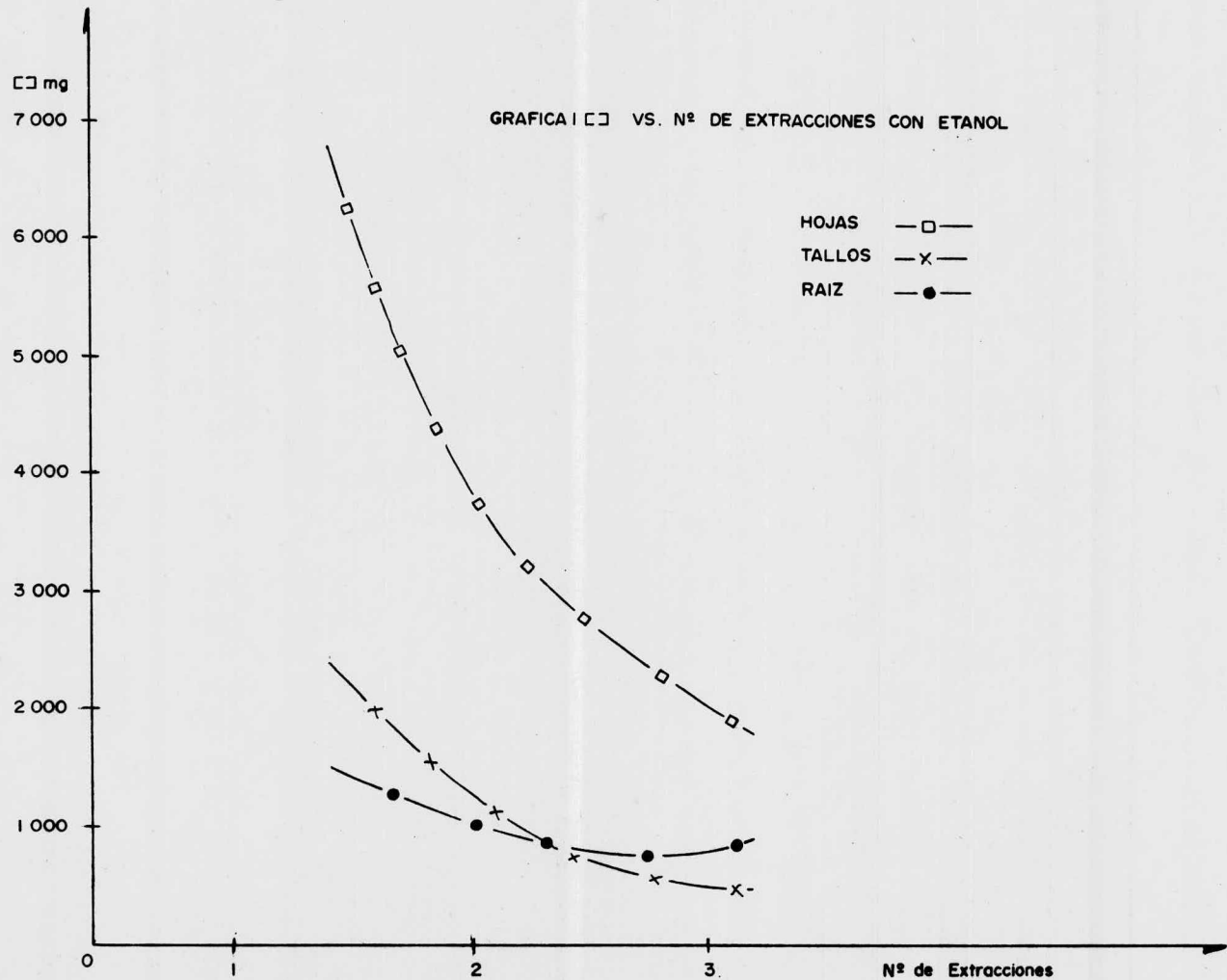
Los tallos se someten a dos extracciones más siguiendo el mismo procedimiento.

Las gráficas núm. 1 al 6 muestran las concentraciones obtenidas con cada uno de los solventes en las diferentes extracciones.

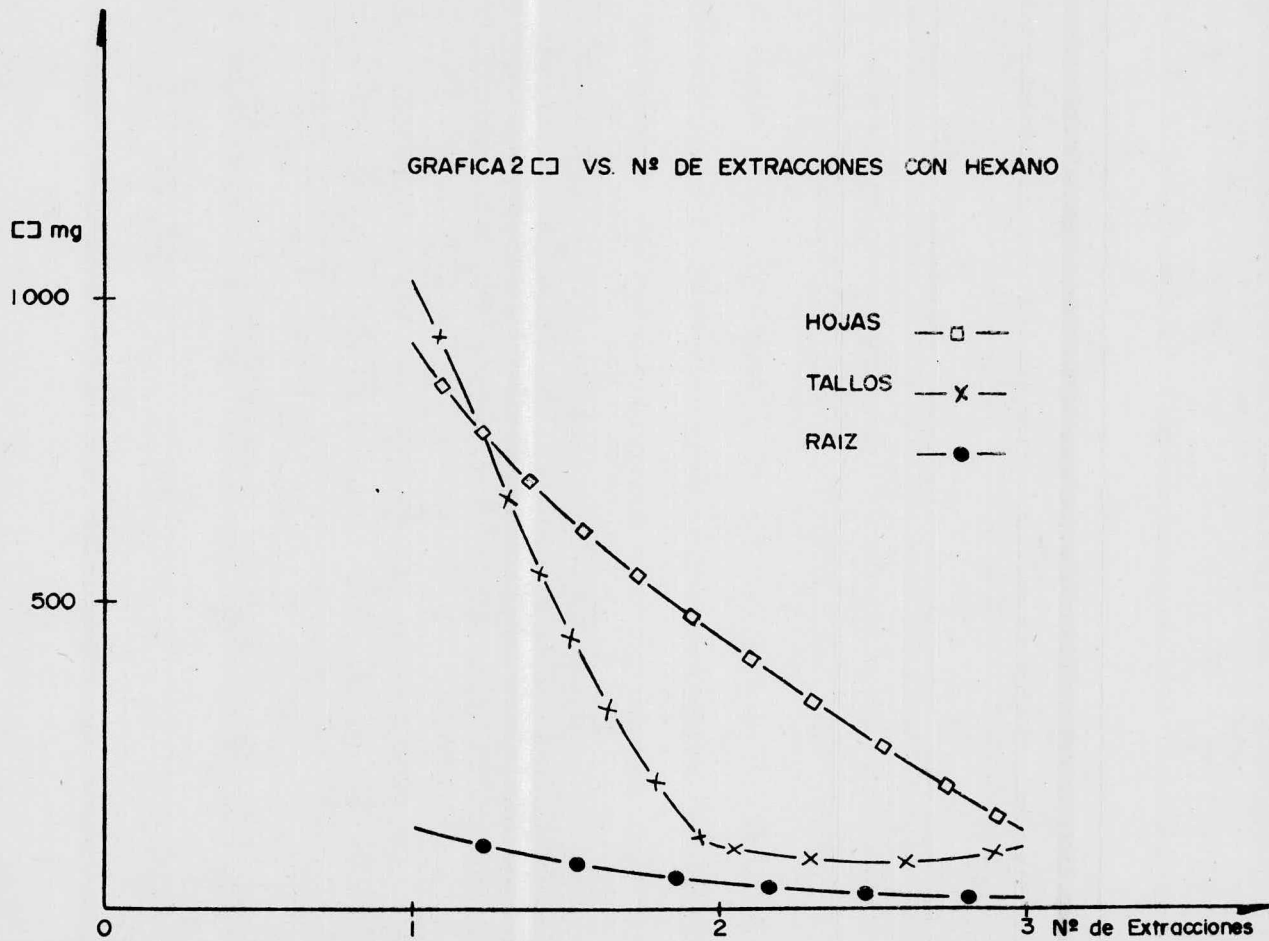
Se prepararon los siguientes extractos:

- 1) primera, segunda y tercera extracciones de hojas en etanol
- 2) primera, segunda y tercera extracciones de hojas en hexano
- 3) primera, segunda y tercera extracciones de hojas en cloroformo
- 4) primera, segunda y tercera extracciones de tallos en etanol
- 5) primera, segunda y tercera extracciones de tallos en hexano
- 6) primera, segunda y tercera extracciones de tallos en cloroformo
- 7) primera, segunda y tercera extracciones de raíz en etanol
- 8) primera, segunda y tercera extracciones de raíz en hexano
- 9) primera, segunda y tercera extracciones de raíz en cloroformo.

En la tabla 1 se puede observar la clave y concentración obtenida en cada una de las extracciones, para las diferentes partes de la planta y con los diferentes solventes.

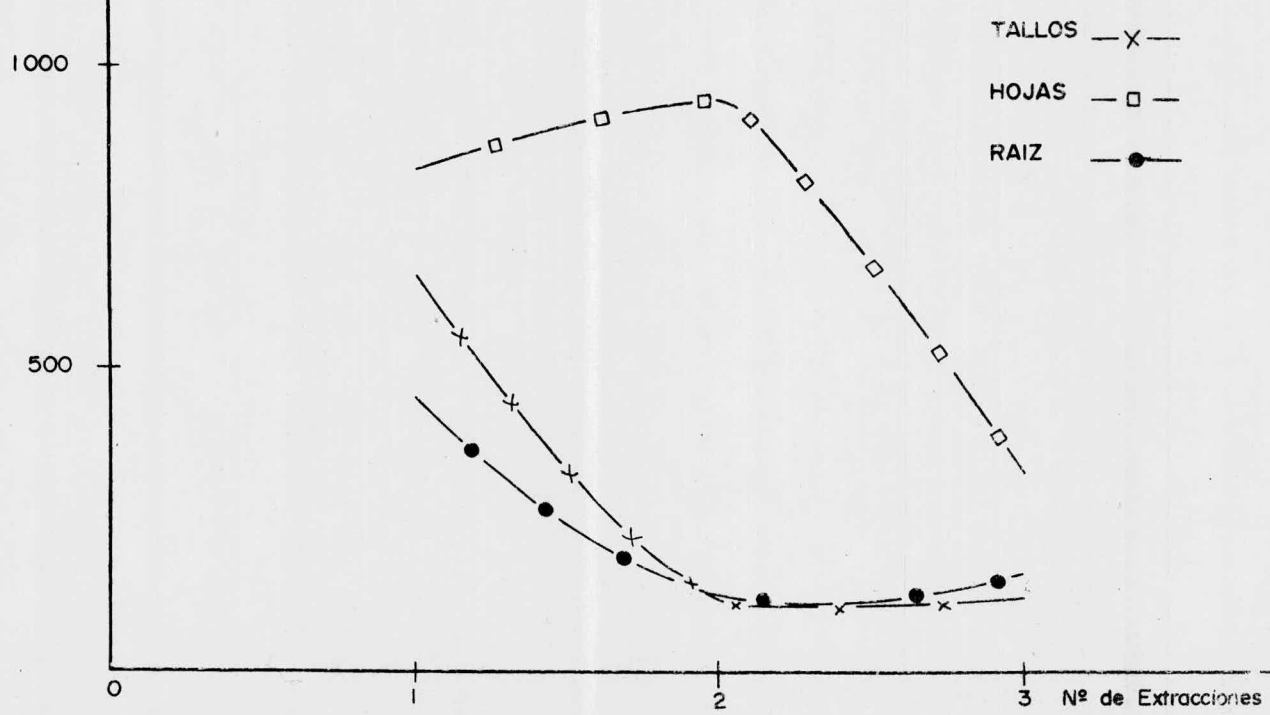


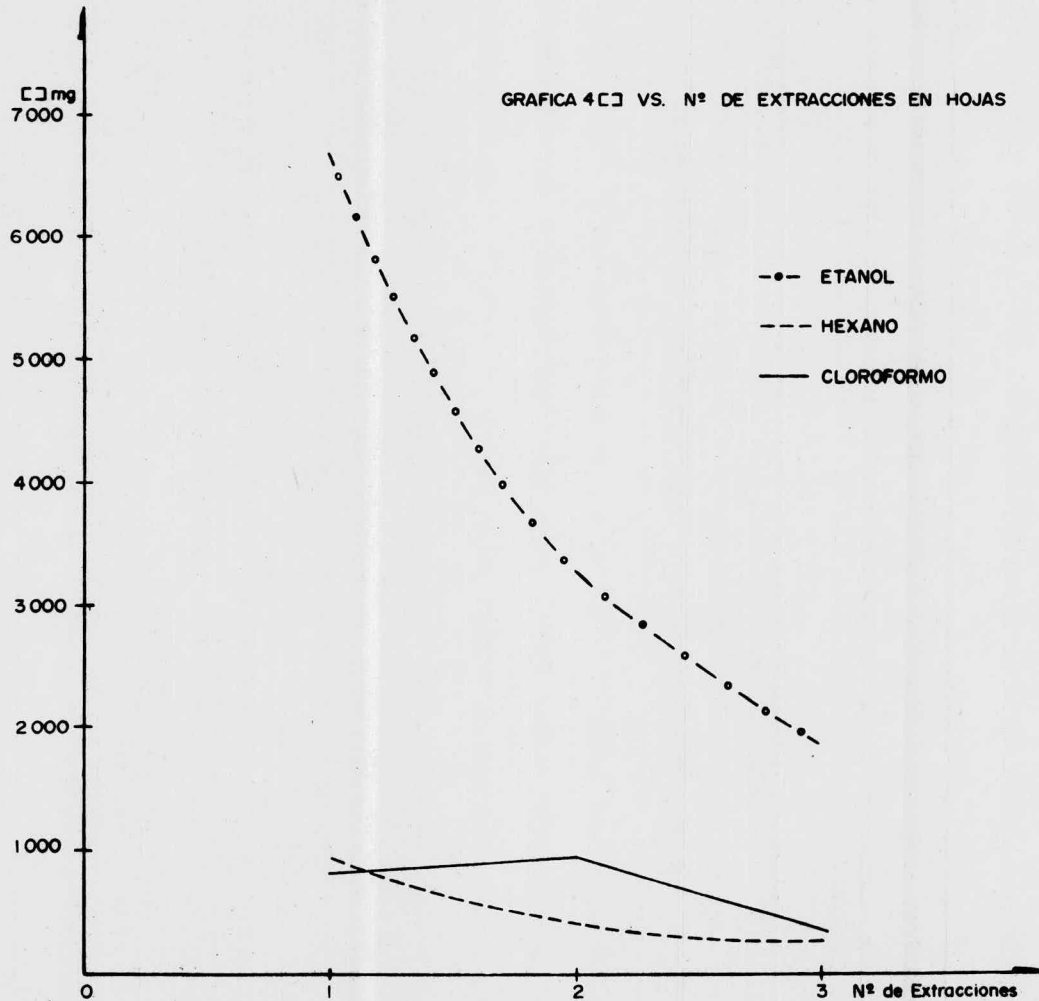
GRAFICA 2 □ VS. N° DE EXTRACCIONES CON HEXANO



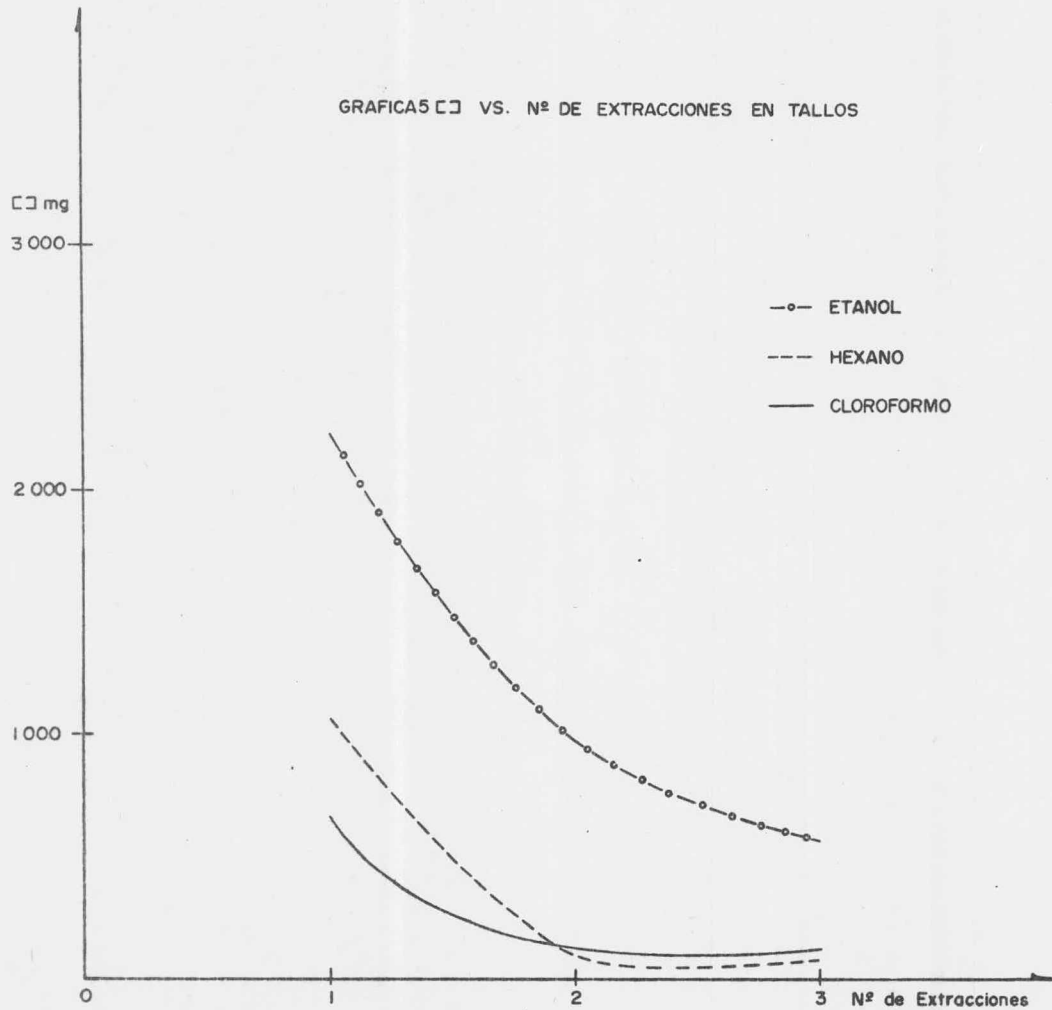
□ mg

GRAFICA 3 □ VS. Nº DE EXTRACCIONES CON CLOROFORMO





GRAFICA 5 \square VS. N° DE EXTRACCIONES EN TALLOS



2000
□ mg

GRAFICA 6 □ VS. N° DE EXTRACCIONES EN RAIZ

1500

1000

500

●- - ETANOL
- - - - - HEXANO
— CLOROFORMO

0

1

2

3

N° de Extracciones

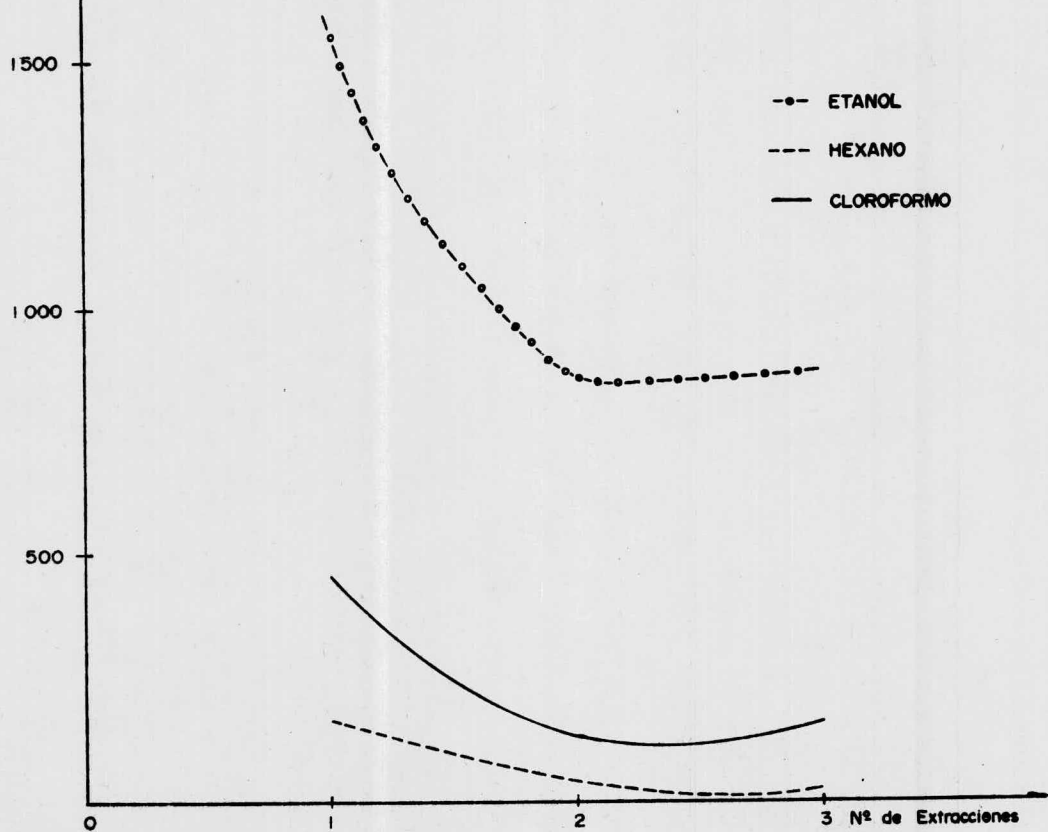


TABLA N°1

CLAVE Y CONCENTRACION OBTENIDA EN CADA UNA DE LAS EXTRACCIONES PARA LAS DIFERENTES PARTES DE LA PLANTA Y CON LOS DIFERENTES SOLVENTES.

	ETANOL			HEXANO			CLOROFORMO		
	1ª ext.	2ª ext.	3ª ext.	1ª ext.	2ª ext.	3ª ext.	1ª ext.	2ª ext.	3ª ext.
HOJAS	15RLLB(A)	19RLLB(A)	19RLLB(B)	17 RLLB(A)	17RLLB(B)	17 RLLB(C)	27RLLB(A)	27RLLB(B)	27 RLLB(C)
	6.680 g	3.323 g	1.830 g	0.925 g	0.440g	0.262 g	0.831 g	0.951 g	0.336 g
TALLOS	9 RLLB (A)	9 RLLB (C)	9RLLB (E)	11RLLB (B)	11RLLB (D)	11RLLB (F)	25RLLB(A)	25RLLB(B)	25RLLB(C)
	2.215 g	0.960 g	0.560 g	1.030 g	0,0980 g	0,090 g	0.657 g	0,113 g	0,114 g
RAIZ	21RLLB(A)	21RLLB(B)	21RLLB(C)	23RLLB(A)	23RLLB(B)	23RLLB(C)	29RLLB(A)	29RLLB(B)	29RLLB(C)
	1.580 g	0.845 g	0.900 g	0.160 g	0.047 g	0.028 g	0.455 g	0.127 g	0.174 g

Preparación de discos (impregnación con el extracto):

Se prepararon 90 discos de papel filtro, de 1.2 cm de diámetro. Cada uno de estos discos previamente esterilizados, se impregnó con extracto seco, que se obtuvo de cada una de las primeras extracciones.

La impregnación de los discos se efectuó en un lugar aséptico y - el material utilizado (pinzas, espátulas, etc.) estéril.

Una vez impregnados los discos con el extracto, se colocaron en cajas y tubos de ensayo estériles.

Se prepararon 10 discos de cada extracto y se les asignaron las siguientes claves:

RLLB35A a los 10 discos impregnados con el extracto 9RLLBA
RLLB35B a los 10 discos impregnados con el extracto 11RLLBB
RLLB35C a los 10 discos impregnados con el extracto 25RLLBA
RLLB37A a los 10 discos impregnados con el extracto 15RLLBA
RLLB37B a los 10 discos impregnados con el extracto 17RLLBA
RLLB37C a los 10 discos impregnados con el extracto 27RLLBA
RLLB37D a los 10 discos impregnados con el extracto 21RLLBA
RLLB37E a los 10 discos impregnados con el extracto 23RLLBA
RLLB37F a los 10 discos impregnados con el extracto 29RLLBA

Preparación de la suspensión:

Se prepararon 16 suspensiones mediante el siguiente procedimiento, trabajando en zona aséptica:

Se pesan 50 mg de goma arábica.

Se pesa la cantidad indicada del extracto.

Se colocan ambas sustancias en un mortero asepticado con etanol.

Se mezclan hasta formar una papilla.

Se añaden 3 ml de agua destilada estéril y se sigue mezclando.

Se pasa a un frasco gotero limpio y seco, con ayuda de una pipeta Pasteur.

Se enjuaga el mortero con 2 ml más de agua y se pasa al frasco - gotero.

Se tapa bien el frasco.

Se obtuvieron 5 ml de cada suspensión; a continuación se indican sus claves, el extracto del que proceden y la cantidad de éste utilizada para prepararlas:

RLLB451	preparada con	53 mg del extracto	9RLLBA
RLLB452	preparada con	248 mg del extracto	9RLLBA
RLLB453	preparada con	53 mg del extracto	11RLLBA
RLLB454	preparada con	250 mg del extracto	11RLLBB
RLLB455	preparada con	61 mg del extracto	25RLLBA
RLLB456	preparada con	251 mg del extracto	25RLLBA
RLLB471	preparada con	50 mg del extracto	15RLLBA
RLLB472	preparada con	252 mg del extracto	15RLLBA
RLLB473	preparada con	50 mg del extracto	17RLLBA
RLLB474	preparada con	250 mg del extracto	17RLLBA
RLLB475	preparada con	50 mg del extracto	27RLLBA
RLLB476	preparada con	250 mg del extracto	27RLLBA
RLLB491	preparada con	50 mg del extracto	21RLLBA
RLLB492	preparada con	250 mg del extracto	21RLLBA
RLLB495	preparada con	51 mg del extracto	29RLLBA
RLLB496	preparada con	308 mg del extracto	29RLLBA

C) Aislamiento de las cepas e identificación de los microorganismos.

Algunas de las cepas utilizadas fueron aisladas de cultivos obtenidos de muestras clínicas. A dichas cepas se les hizo tinción por el método de Gram y se observaron al microscopio, ya que un carácter taxonómico importante de las bacterias es su respuesta a la coloración de Gram; se determinaron así sus características morfológicas y tintoriales y su pureza.

Mediante la técnica de descarga y estría se inocularon las placas con los medios selectivos y diferenciales para llevar a cabo el aislamiento de colonias; se incubaron dichas placas a 37°C durante 24 horas.

Del desarrollo obtenido se llevaron a cabo nuevas tinciones de Gram y se observó al microscopio; ya que las características morfológicas y tintoriales demostraron que se tenían cultivos puros de los bacilos, se procedió a realizar las pruebas bioquímicas, para lo cual se llevaron a cabo las que se consideran de rutina en el laboratorio y que son:

a) Medio inclinado de Kligler, con dos azúcares que son: glucosa y lactosa, para detectar si los microorganismos tienen o no acción fermentadora sobre ellos y con citrato de hierro para detectar la producción de H_2S .

b) Medio de SIM semisólido, el cual se siembra por piquete para la identificación de H_2S e indol y para probar la movilidad.

c) Caldo manitol-rojo de fenol, en el cual se observa la fermentación de este azúcar.

d) Medio líquido sacarosa-urea (SURRACO), en el que se determinan fermentación de sacarosa e hidrólisis de urea.

Después de haber realizado las siembras de las diferentes cepas - aisladas e incubado a 37°C durante 24 horas, en todos los casos se confirmó la identidad de los microorganismos aislados.

Conservación de los microorganismos:

Los microorganismos se conservaron en tubos con agar cerebro corazón, los cuales se taparon con papel parafilm, se colocaron en refrigeración y se resembraban cada cuatro semanas.

D) Efecto de los extractos sobre dichas cepas.

Para estas pruebas se utilizaron diluciones de los cultivos microbianos, frente a las cuales se probaron los extractos de Tlatlancuaya - en forma de suspensiones, discos, ampollitas y tintura.

1) Diluciones:

Se utilizaron cultivos de 24 horas en BHI y se prepararon diluciones en solución salina isotónica estéril, como se indica a continuación:

Tomar	de	+	sol. salina	para obtener una dilu ción de:
1 ml	cultivo	+	9 ml	1:10
1 ml	dil. 1:10	+	9 ml	1:100
1 ml	dil. 1:100	+	9 ml	1:1000
1 ml	dil. 1:1000	+	9 ml	1:10000
1 ml	dil. 1:10000	+	9 ml	1:100000

2) Como material de comparación, se elaboró lo siguiente:

Blanco: tubo con medio de cultivo, sin inóculo y sin extracto.

Testigo de desarrollo: tubo con medio de cultivo, inoculado con la cepa en estudio.

Control de extracto: tubo con medio de cultivo, adicionado de extracto.

3) Para determinar el efecto de los extractos en forma de suspensión sobre las cepas estudiadas, el procedimiento fue el siguiente:

Se inocula un tubo de ensayo conteniendo 9.6 ml de BHI con 0.2 ml del cultivo (y en su caso, de cada dilución).

Se agregan 0.2 ml del extracto a probar (y en su caso, de cada uno de los extractos experimentados).

Se incuba durante 24 horas a 37⁰C, junto con los tubos de comparación.

Se observa el desarrollo, comparándolo con el testigo de desarrollo, el blanco y el control de extracto.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla núm. 2

4) Resistencia de los microorganismos:

Al observar la resistencia de las cepas con que se trabajó y considerando que el extracto en estudio actúa en casos de tifoidea, se decidió trabajar solamente con las 4 cepas de Salmonella ya tipificadas que nos proporcionó la Colección de Cepas de la Facultad de Química. Además, dado que el resultado del desarrollo era el mismo tanto en el testigo de desarrollo como en los problemas, se optó por cambiar el pH del medio - BHI. Los resultados obtenidos con diferentes valores de pH se muestran - en la tabla núm. 3.

5) Para determinar el efecto de los extractos en forma de discos sobre las cepas estudiadas, el procedimiento fue el siguiente:

En una caja de petri con agar nutritivo se hace una siembra masiva con 0.1 ml del cultivo (y en su caso, de cada dilución).

Se colocan 3 discos del extracto a probar (y en su caso, de cada uno de los extractos experimentados en forma de discos).

Se refrigera la caja durante 30 minutos.

Se saca de refrigeración y se incuba durante 24 horas a 37⁰C.

Se observa el desarrollo y se compara con el testigo de desarrollo, el blanco y el control de extracto.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla núm. 4.

6) Para determinar el efecto de los extractos en forma de ampollitas sobre las cepas estudiadas, el procedimiento fue el siguiente:

Se inocula un tubo de ensayo conteniendo 9.7 ml de BHI con 0.1 ml del cultivo. En este caso, no se trabajó con diluciones.

Se agregaron 0.2 ml del contenido de la ampolleta (la prueba se hizo por triplicado).

Se incuba durante 24 horas a 37°C, junto con los tubos de comparación.

Se observa el desarrollo, comparándolo con el testigo de desarrollo, el blanco y el control de extracto.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla núm. 5.

7) Para determinar el efecto de los extractos en forma de tintura sobre las cepas estudiadas, el procedimiento fue el siguiente:

Se inocula un tubo de ensayo conteniendo 9.0 ml de BHI con 0.1 ml del cultivo. En este caso, tampoco se trabajaron diluciones.

Se agregaron 0.9 ml de la tintura (la prueba se hizo por triplicado).

Se incuba 24 horas a 37°C, junto con los tubos de comparación.

Se observa el desarrollo, comparándolo con el testigo de desarrollo, el blanco y el control de extracto.

Los resultados obtenidos también se muestran en la tabla núm. 5.

E) Antibiograma

Para determinar la sensibilidad de las cepas bacterianas a una serie de antibióticos, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Se hicieron cultivos de 24 horas en BHI de cada una de las cepas.

Se inoculan 0.1 ml del cultivo en una caja de petri con agar-BHI y se coloca encima de la capa de bacterias un multidisco de sensibilidad a antibióticos (Bioclín).

Se coloca en refrigeración durante 30 minutos.

Se incuba a 37°C durante 24 horas, observando a las 12 y 18 horas.

Se observa el patrón de resistencia o sensibilidad a los siguientes antibióticos: ampicilina 10 ug, tetraciclina 10 ug, cloramfenicol 30 ug, kanamicina 30 ug, gentamicina 10 ug, estreptomina 20 ug, cefalosporina 30 ug, neomicina 30 ug, furadantina 100 ug, ácido nalidíxico 30 ug, trisulfa 150 ug, polimixina 10 ug.

Los resultados se muestran en la tabla núm. 6.

IV R E S U L T A D O S

TABLA N°2

EFEECTO DE LOS EXTRACTOS EN FORMA DE SUSPENSION SOBRE LAS CEPAS ESTUDIADAS

CEPA	CLAVES EXTRACTO (SUSPENSION)															
	451	452	453	454	455	456	471	472	473	474	475	476	491	492	495	496
<u>Escherichia coli</u>	+		+		+		+		+		+		+		+	
<u>Klebsiella aerogenes</u>		+		+		+		+		+				+		
<u>Salmonella arizona</u>	+			+				+			+				+	
<u>Salmonella sp</u>		+			+		+			+				+		+
<u>Proteus vulgaris</u>			+		+	+			+		+		+			
<u>Providencia</u>		+		+			+			+			+		+	
<u>Escherichia coli</u> DIL 1:10		+		+				+		+		+				
<u>Proteus mirabilis</u> DIL 1:10	+				+		+			+			+			+
<u>Salmonella arizona</u> DIL 1:10			+			+			+			+		+		
<u>Shigella sp</u> DIL 1:10	+		+				+			+						+
<u>Salmonella paratyphi</u> DIL 1:10 B 576		+		+		+		+			+		+		+	
<u>Salmonella paratyphi</u> "A" DIL 1:10	+				+		+		+		+		+		+	

PRESENCIA DE DESARROLLO SIGNO +

AUSENCIA DE DESARROLLO SIGNO -

LOS CUADROS EN BLANCO INDICAN QUE NO SE PROBO ESE EXTRACTO FRENTE A ESA CEPA

TABLA No. 2 (Continuacion)

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS EN FORMA DE SUSPENSION SOBRE LAS CEPAS ESTUDIADAS

CEPA		CLAVES EXTRACTO															
		451	452	453	454	455	456	471	472	473	474	475	476	491	492	495	496
<u>Salmonella paratyphi</u>	DIL 1:10 AHA 6	+			+		+			+		+			+		+
<u>Salmonella typhosa</u>	DIL 1:10 57H901		+			+		+			+			+		+	
<u>Salmonella arizona</u>	DIL 1:100	+		+			+		+			+		+			+
<u>Shigella sp</u>	DIL 1:100		+			+			+		+			+		+	
<u>Salmonella paratyphi</u>	DIL 1:1000 B 576	+		+				+		+			+			+	
<u>Salmonella paratyphi</u>	DIL 1:1000 "A"	+			+		+		+		+		+		+		+
<u>Salmonella paratyphi</u>	DIL 1:10000 AHA6			+		+		+			+			+		+	
<u>Salmonella typhosa</u>	DIL 1:10000 57 H 901	+		+		+		+		+		+		+		+	
<u>Salmonella paratyphi</u>	DIL 1:100000 "A"		+		+			+		+		+			+		
<u>Salmonella typhosa</u>	DIL 1:100000 57 H 901			+			+					+				+	
<u>Salmonella paratyphi</u>	DIL 1:10000 B 576					+				+			+			+	
<u>Salmonella paratyphi</u>	DIL 1:100000 AHA 6		+				+				+			+			

TABLA N°3

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS EN FORMA DE SUSPENSION SOBRE 4 DE LAS CEPAS ESTUDIADAS.
(CAMBIO DEL PH DEL MEDIO BHI)

CEPA	CLAVES EXTRACTO															
	451	452	453	454	455	456	471	472	473	474	475	476	491	492	495	496
<i>Salmonella paratyphi</i> PH 4 B 576			+				+				+				+	
<i>Salmonella paratyphi</i> PH 6 "A"	+			+					+				+			
<i>Salmonella paratyphi</i> PH 8 AHA 6			+			+						+				+
<i>Salmonella typhosa</i> PH 10 57 H 901		+						+		+				+		
<i>Salmonella paratyphi</i> PH 10 "A"			+				+				+					+
<i>Salmonella paratyphi</i> PH 10 B 576	+			+			+				+				+	
<i>Salmonella paratyphi</i> PH 8 "A"			+					+					+			
<i>Salmonella paratyphi</i> PH 6 AHA 6		+				+			+		+				+	
<i>Salmonella typhosa</i> PH 4 57 H 901	+				+					+			+			+
<i>Salmonella paratyphi</i> PH 8 B 576						+						+				
<i>Salmonella paratyphi</i> PH 10 AHA 6		+							+							
<i>Salmonella typhosa</i> PH 6 57 H 901						+					+				+	

* PRESENCIA DE DESARROLLO SIGNO +
AUSENCIA DE DESARROLLO SIGNO -

LOS CUADROS EN BLANCO INDICAN QUE NO SE PROBO ESE EXTRACTO FRENTE A ESA CEPA.

TABLA N°4

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS EN FORMA DE DISCOS SOBRE LAS CEPAS ESTUDIADAS

CEPA	CLAVES DISCOS								
	35 A	35 B	35 C	37 A	37 B	37 C	37 D	37 E	37 F
<u>Salmonella typhosa</u> 57 H 901 DIL 1:1000	+				+				
<u>Salmonella paratyphi</u> B 576 DIL 1:10000		+					+		+
<u>Salmonella paratyphi</u> "A" DIL 1:100000						+		+	
<u>Escherichia coli</u>			+						
<u>Proteus vulgaris</u>	+				+				
<u>Salmonella sp</u>				+					
<u>Shigella sp</u>		+				+			

* PRESENCIA DE DESARROLLO SIGNO +

AUSENCIA DE DESARROLLO SIGNO -

LOS CUADROS EN BLANCO INDICAN QUE NO SE PROBO ESE EXTRACTO FRENTE A ESA CEPA

TABLA N°4 (CONTINUACION)

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS EN FORMA DE DISCOS SOBRE LAS CEPAS ESTUDIADAS

CEPA	CLAVES DISCOS									
	35A	35B	35C	37A	37B	37C	37D	37E	37F	
<u>Salmonella paratyphi</u> B 576	+				+	+				
<u>Salmonella paratyphi</u> "A"				+			+			
<u>Salmonella paratyphi</u> AHA 6			+			+			+	
<u>Salmonella typhosa</u> 57 H 90I							+	+		
<u>Salmonella paratyphi</u> DIL 1:10 B 576		+				+				
<u>Salmonella paratyphi</u> DIL 1:100 "A"			+					+		
<u>Salmonella paratyphi</u> DIL 1:10 AHA 6				+		+			+	

* PRESENCIA DE DESARROLLO SIGNO +

AUSENCIA DE DESARROLLO SIGNO —

LOS CUADROS EN BLANCO INDICAN QUE NO SE PROBO ESE EXTRACTO FRENTE A ESA CEPA

TABLA N°5

EFEECTO DE LOS EXTRACTOS EN FORMA DE AMPOLLETAS Y EN FORMA DE TINTURA SOBRE LAS CEPAS ESTUDIADAS.

CEPA	AMPOLLETA	TINTURA
<u>Salmonella paratyphi</u> B 576	+	+
<u>Salmonella paratyphi</u> "A"	+	+
<u>Salmonella paratyphi</u> AHA 6	+	+
<u>Salmonella typhosa</u> 57 H 901	+	+

* PRESENCIA DE DESARROLLO SIGNO +

AUSENCIA DE DESARROLLO SIGNO -

LOS CUADROS EN BLANCO INDICAN QUE NO SE PROBO ESE EXTRACTO FRENTE A ESA CEPA.

TABLA N°6

RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA.

CEPA	ANTIBIOTICOS					
	AMPICILINA 10 µg	TETRACICLINA 10µg	CLORAMFENICOL 30 µg	KANAMICIDA 30µg	GENTAMICINA 10 µg	ESTREPTOMICINA 20µg
<u>Salmonella paratyphi</u> B 576	—	—	—	—	—	—
<u>Salmonella paratyphi</u> " A "	—	—	—	—	—	—
<u>Salmonella paratyphi</u> AHA6	—	—	—	—	—	—
<u>Salmonella typhosa</u> 57 H 901	—	—	—	—	—	—

* PRESENCIA DE DESARROLLO SIGNO +

AUSENCIA DE DESARROLLO SIGNO —

TABLA N° 6 (CONTINUACION)

RESULTADOS DEL ANTIBIOGRAMA

CEPA	ANTIBIOTICOS					
	CEFALOSPORINA 30 μ g	NEOMICINA 30 μ g	FURADANTINA 100 μ g	AC.NALIOXICO 30 μ g	TRISULFA 150 μ g	POLIMIXINA 10 μ g
<u>Salmonella paratyphi</u> B 576	—	—	—	—	—	—
<u>Salmonella paratyphi</u> "A"	—	—	+	—	—	—
<u>Salmonella paratyphi</u> AHA6	+	—	—	—	—	—
<u>Salmonella typhosa</u> 57 H 901	—	—	—	—	—	—

* PRESENCIA DE DESARROLLO SIGNO +
 AUSENCIA DE DESARROLLO SIGNO —

V CONCLUSIONES

1) El extracto de Tlatlanquaya, considerado en Medicina Homeopática como un agente efectivo contra los microorganismos causantes de la fiebre tifoidea, es inefectivo contra dichas bacterias "in vitro", independientemente de la concentración del extracto.

2) Esto concuerda con la teoría básica de la Medicina Homeopática, según la cual la actividad de dichos medicamentos se basa únicamente en su presencia en el organismo, la que probablemente reestablece el equilibrio de ciertas "fuerzas vitales", alterado en la enfermedad.

3) El pH no tiene efecto sobre la actividad del extracto "in vitro"; pues los cambios efectuados hacia la acidez y alcalinidad lo demostraron; por lo tanto se considera que ni el pH ácido del estómago ni el alcalino del intestino son factores que intervengan en la actividad "in vivo".

4) Las cepas probadas frente al extracto de Tlatlanquaya también fueron comparadas frente a los agentes quimioterapéuticos más usados contra microorganismos gramnegativos, obteniéndose resultados satisfactorios con estas pruebas.

5) Cabe la posibilidad de que el método para la extracción del principio activo no fuera el adecuado.

VI BIBLIOGRAFIA

- 1) Burrows, W. (1974). Tratado de Microbiología. 3^a edición. Interamericana. México. 429.
- 2) Frobisher, M. y Fuerst, R. (1976). Microbiología. 13^a edición. Interamericana. México. 292.
- 3) Frobisher, Hindshil, Crabtree, Goodheart. (1974). Fundamentals of Microbiology. W.B. Saunders Co.mpany. U.S.A. 506-508.
- 4) Hornick, R. B. y Woodward, T. E. "Fiebre tifoidea". Medicina - Interna, Rev. 5: 904-910.
- 5) Koljensić, B. y Kragujević, D. (1969). Cloramfenicol, 20 años de experiencia. Rev. 29-40.
- 6) Legorreta de Luis, G (1961). Materia Médica Homeopática de Plantas Mexicanas. México.
- 7) Legorreta de M., M. "Patogenesis de cinco medicinas introducidas en la Materia Médica Homeopática para la curación del tifo y otras piroxias" editadas en "La verdad" en el año de 1911, aumentadas por el Dr. G. Legorreta. 17-22.
- 8) Martínez, M. "Las plantas medicinales en México". (1969). 5^a edición. Botas. 324-325.
- 9) Pelczar, M. J. y R.D. Reid. (1974). Microbiology. 3^a ed. Mac Graw Hill. Nueva Delhi. 431-434.
- 10) Starkenstein, D. E. (1956). Tratado de Farmacología, Toxicología y arte de recetar. México, 8-12.
- 11) Zinsser. (1972). Microbiology. 15^a ed. Appleton-Century Crofts. U.S.A. 444-450.

**Esta Tesis se imprimió en Julio de 1978
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset,
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A., Av.
Colonia del Valle No. 535 (Esq. Adolfo Prieto),
Tels. 523-03-33 y 523-21-05 México 12, D. F**