



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO  
CAMPUS IZTACALA

BO 1241/96  
Ej. 1

ESTUDIO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DE LA PLANTA  
*Eucalyptus globulus*

400282



61060

TESIS ELABORADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**BIÓLOGO**

PRESENTA:

LUIS JACOBO RUBIO CASANOVA

Tlalneantla, Edo. de Méx.

Junio 1996.



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.

## CONTENIDO

Resumen	
Introducción	
Antecedentes	3
Resistencia a los antimicrobianos	6
Importancia clínica de la resistencia a los antimicrobianos	8
Productos de origen vegetal	11
Descripción Botánica de <i>Eucalyptus globulus</i>	13
Justificación	17
Objetivos Generales y Particulares	19
Material y Métodos	21
Diagrama de Flujo	30
Resultados	31
Análisis de resultados	59
Conclusiones	66
Bibliografía	67

## RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de *Eucalyptus globulus* frente a 4 bacterias de la familia de las **enterobacteriáceas** en específico: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter agglomerans* y *Shigella boydii*. Además *Vibrio cholerae* de la familia de las **espiriláceas**, que son las responsables más frecuentes de las infecciones gastrointestinales en nuestro país.

La primer etapa del proyecto consistió en evaluar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de las hojas maduras demostrándose que el principio activo presenta propiedades bactericidas y se encuentra en la fracción de los compuestos volátiles (aceites esenciales).

La segunda etapa del proyecto consistió en aislar el principio activo y determinar su naturaleza química utilizando métodos de espectroscopía determinando que se trata del **globulol**:  $C_{15}H_{26}O$  PM 222.37, un alcohol sesquiterpénico, con un  $R_f = 0.31$  (cromatofolio AL de silica gel 60 sin indicador fluorescente y como fase móvil tolueno-acetato de etilo 93:7 v/v) y un punto de fusión a  $87^{\circ}C$ .

## INTRODUCCION

Las infecciones son las enfermedades que, sin duda alguna, han constituido uno de los principales azotes para la humanidad. Su importancia social ha sido incluso mayor de lo que puede indicar su número de orden entre las mayores causas de muerte, esto es debido a que muchas de las enfermedades infecciosas causan la muerte a personas sin importar sexo, edad, o condición social. Estas enfermedades, por su carácter epidémico, han desorganizado y aterrorizado con frecuencia a comunidades enteras y han determinado la destrucción de ejércitos y naciones. (LORDAINE, 1980)

El descubrimiento de las causas originarias de las enfermedades infecciosas permitió el desarrollo de métodos adecuados para su control, que incluyen compuestos tomados de fuentes naturales con el poder de inhibir parcial o totalmente el desarrollo de los agentes etiológicos: ahora definidos como antibióticos es decir "compuestos químicos derivados de organismos vivos o producidos por ellos, y que son capaces de inhibir procesos vitales de microorganismos a pequeñas concentraciones". (DAVIS, 1984).

## ANTECEDENTES

Entre las primeras observaciones del proceso de antibiosis podemos mencionar los trabajos de Luis Pasteur en el año de 1877 cuando, comunicó que no se había desarrollado el carbunco en animales inyectados con inóculo que contenía *Bacillus anthracis* y otros bacilos comunes, de estos resultados surgió el primer registro científico de la actividad antimicrobiana. En 1881, Tyndal en sus "Ensayos sobre la materia flotante en el aire, en relación con la putrefacción e infección" estableció que las bacterias contenidas en una infusión nutritiva, perdían su "poder de traslación" y caían al fondo del tubo poco después de ser contaminadas por *Penicillium glaucum*. Tyndal interpretó este fenómeno como el impedimento en el suministro del oxígeno a las bacterias por las películas formadas por el moho. En 1887 Emmerich descubre accidentalmente que un cobayo previamente inyectado con *Streptococcus erysipelatis* no es afectado por el cólera al ser inyectado con un cultivo virulento de *Vibrio cholerae*. De esta observación se logró evitar el ántrax en animales de laboratorio administrando *S. erysipelatis* previo al inóculo de *B. anthracis*.

En 1889 Bauchard comunicó que la *Pseudomonas aeruginosa* inhibía el desarrollo del ántrax en el conejo, en ese mismo año Wood-Head y Wood amplían la observación anterior al mostrar que cultivos estériles de *P. aeruginosa* ejercían el mismo efecto protector frente al ántrax. En 1928 el fenómeno

de antibiosis toma su forma definitiva con los trabajos de Alexander Fleming, quien observó la inhibición del crecimiento bacteriano por una colonia de *Penicillium notatum* que actuaba como contaminante dentro de sus cultivos. Fleming recomendó en su publicación, un año después, el posible uso clínico de la sustancia producida por el cultivo de *P. notatum*.

Al advenimiento de la II Guerra Mundial se inicia un programa a gran escala para la producción y ensayo de la sustancia que ahora conocemos como penicilina, así mismo, la industria y las instituciones académicas se dedicaron al estudio de otros antibióticos. Esto tuvo como resultado que a corto plazo se descubrieran la estreptomycin, aeuromicina y cloromicetina entre otros. (TREASE, 1987)

Una vez que el fenómeno de la antibiosis había quedado demostrado y que el uso de estos primeros antibióticos comenzaba a generalizarse en la terapéutica de las enfermedades infecciosas, se pensó en forma apresurada que la batalla contra estos microorganismos se tenía por fin ganada.

Así, el siguiente objetivo consistió en conocer los mecanismos de toxicidad de los fármacos y tratar de mejorar su eficacia terapéutica; de estas investigaciones surgieron las primeras clasificaciones de actividad antimicrobiana, que en forma resumida, nos indican el mecanismo de acción de los medicamentos antimicrobianos:

1. Inhibición de la síntesis de la pared celular
2. Alteración de la permeabilidad en la membrana celular.

3. Inhibición de la síntesis proteínica:

- Durante el proceso de Transcripción o
- Durante el proceso de Traducción.

4. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.

5. Bloqueo de rutas metabólicas esenciales. (Divo, 1990)

Ya con el conocimiento de la forma de acción de cada grupo de antibióticos, se pensó que sería fácil el poder controlar las infecciones bacterianas, solo sería cuestión de escoger el antibiótico adecuado para cada caso y el problema quedaría resuelto. De esta idea surgió una explotación indiscriminada y muy extendida de los antibióticos, provocando que lejos de erradicar las infecciones bacterianas, cada vez la actividad antimicrobiana de los fármacos era menor, frente a los mismos grupos bacterianos que anteriormente se habían controlado y hubo que aplicar dosis cada vez más altas o combinaciones de antibióticos, y lo que fue peor, comenzaron a registrarse brotes de enfermedades infecciosas con las que el tratamiento antimicrobiano ya no representaba una garantía para asegurar que el problema quedara bajo control. (KUMATE, 1981)

La razón por la que estaba fallando la terapéutica antimicrobiana fue muy simple: los microorganismos pueden desarrollar resistencia ante los antibióticos, un pequeño detalle al que no se le dió la importancia debida.



## RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

La primer observación surgió en 1907 con Ehrlich, quien trabajó con protozoos y descubrió que los microorganismos poseen la capacidad de desarrollar una resistencia frente a un determinado fármaco después de varias exposiciones ante la misma droga. En la actualidad se ha comprobado tal resistencia, en prácticamente todos los agentes patógenos de los organismos.

Se ha demostrado además que la resistencia a los antimicrobianos es un acompañante constante de todos los microorganismos, que se ha hecho evidente desde la introducción a gran escala de quimioterápicos y antibióticos. A modo de ejemplo cabe mencionar que en la última década las cepas de *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhi* con resistencia múltiple fueron causa de epidemias muy importantes en Centroamérica y México. (KUMATE, 1981)

Para tratar de explicar como ocurre la drogorresistencia antimicrobiana la separaremos como **Natural** y **Adquirida** con base en que la primera incluye todos los fenómenos relacionados con el genoma bacteriano previo a la exposición de los fármacos.

**Natural:** Implica una manifestación en la información que ya está presente en el cromosoma bacteriano y en la que el antibiótico hace evidente las cepas con dicha capacidad.

(KUMATE, 1981)

A continuación se describen los mecanismos más representativos que se desarrollan durante la resistencia natural:

a) *Impermeabilidad al antimicrobiano*: Cuando éste, por barreras mecánicas no puede penetrar al interior de la bacteria, por ejemplo la pared celular.

b) *Inactivación metabólica del antibiótico*: Por enzimas o toxinas producidas por la bacteria y que anulan la actividad del antibiótico.

c) *Cambios en las proteínas transportadoras de membrana*: Evitando que el antibiótico pueda penetrar en la membrana e impidiendo de esta forma traumatismos en su estructura y evitando así cambios en la permeabilidad.

d) *Producción de sitios blanco alternativos*: Que son competitivos para fijar el antibiótico, con lo que se logra proteger los sitios clave de la célula.

e) *Activación de rutas metabólicas alternativas*: Que ocurre en el momento de que una ruta es bloqueada por la acción de un antibiótico. (STANIER, 1985)

**Adquirida:** Implica un cambio genético estable, hereditario de generación en generación, puede ser a nivel cromosómico o extracromosómico.

a) *Mutación espontánea:* Que puede ser por translocación, transversión, adición, delección entre otros. Estas mutaciones son hechos arbitrarios y la alteración resultante es generalmente específica para una sola droga o clase de drogas.

b) *Transducción:* Esto se realiza con la incorporación de nuevo material genético aportado por algún bacteriófago en la etapa de eclipse en el desarrollo de un ciclo lisogénico.

c) *Transformación:* Es la adquisición de resistencia contenida en DNA que se encuentra presente en el medio y que es soluble a la membrana bacteriana, que bien puede ser un plásmido.

d) *Conjugación:* En este existe el paso de genes resistentes de célula en célula por contacto directo mediante un puente sexual y que pueden proporcionar resistencia múltiple frente a varias clases de antibióticos. (Divo, 1990)

## IMPORTANCIA CLINICA DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS

Los microorganismos que adquieren resistencia a un determinado agente antimicrobiano cobran importancia clínica debido a la selección. Particularmente cuando el uso de una droga es amplio y generalizado, las cepas sensibles se suprimen y las resistentes se multiplican fácilmente; con el tiempo predominan los microorganismos resistentes. (STANIER, 1985)

Se ha demostrado en algunos estudios que más del 50% de las personas son portadoras de bacilos entéricos que contienen factores de resistencia múltiple, y estas bacterias se han aislado en un gran número de ríos que contienen desechos sanitarios no procesados. Estos bacilos pueden incluir a un gran número de patógenos, entre los cuales se encuentran las **enterobacteriáceas** que constituyen una familia de bastones gramnegativos capaces de crecer en condiciones aerobias o anaerobias en medio simple; estos microorganismos se encuentran normalmente formando parte de la flora del intestino de vertebrados, aunque algunos de sus géneros son saprófitos o parasitan a ciertas plantas. Está formada por 4 tribus y 10 géneros de gran importancia médica a nivel mundial como son : **Escherichieae** (*Escherichia* y *Shigella*), **Salmonelleae** (*Salmonella*, *Arizona* y *Citrobacter*); **Klebsielleae** (*Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*) y **Proteae** (*Proteus* y *Providencia*). Que son los responsables de muy diversas y frecuentes infecciones, localizadas y sistémicas,

además de ser agentes etiológicos de gran importancia, se trata de un grupo bacteriano con gran plasticidad génica que tiene entre otras características una gran heterogeneidad en la susceptibilidad a los antimicrobianos y factores de resistencia. (DAVIS, 1984)

Por lo que se han convertido en un problema de salud mundial que obliga al investigador a una búsqueda constante de nuevos fármacos que permitan hacer frente a las cepas resistentes.

En lo que a México se refiere los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI 1992) sobre la tasa de defunciones registradas por capítulos de causa de muerte de 1985 a 1989, nos permiten observar que la muerte por enfermedades infecciosas gastro-intestinales, continúan presentándose como una de las principales causas de mortalidad de la última década en nuestro país.

#### CUADRO 1

#### DEFUNCIONES POR CAPITULOS DE CAUSA DE MUERTE 1985 - 1989. (INEGI, 1992)

CAUSA DE MUERTE (CAPITULOS)	1985	1986	1987	1988	1989
Enfermedades infecciosas y parasitarias	47 093	44 031	43 991	39 668	38 655
Tumores	36 299	37 327	38 822	40 826	42 017
Enfermedades del aparato circulatorio	75 081	73 584	75 703	80 019	82 710
Enfermedades del aparato respiratorio	49 186	41 994	40 709	40 118	45 064
<b>Enfermedades del aparato digestivo</b>	<b>33 495</b>	<b>32 005</b>	<b>31 670</b>	<b>32 338</b>	<b>32 432</b>
Enfermedades del aparato genitourinario	10 640	10 516	10 395	10 587	10 585
Anomalías congénitas	6 839	7 177	7 686	8 467	8 892
Trastornos mentales	4 695	4 510	4 818	5 328	5 204

## PRODUCTOS DE ORIGEN VEGETAL

Una alternativa para atenuar la proliferación de infecciones producidas por bacterias, son los productos naturales de origen vegetal, puesto que se ha observado que muchos vegetales poseen principios activos antibacterianos. (MARTÍNEZ, 1969) Estas sustancias pueden estar previas al ataque de algún patógeno o producirse bajo condiciones de infección y le confieren a la planta una resistencia natural, tal es el caso de muchos compuestos fenólicos, y en este sentido se cree que los polifenoles oxidados reducen la actividad de las enzimas proteolíticas, también figuran en este ejemplo los alcaloides y algunas fitoalexinas.

De este hecho, se puede ampliar la definición de los antibióticos, dada por Waskman. (WASKMAN, 1962) Que se limita a la producción de estos compuestos solo por microorganismos, ya que en la actualidad se cuenta con sustancias con semejante acción terapéutica existentes o elaboradas por plantas superiores, y de los cuales mencionamos algunos ejemplos:

**Líquenes.** Muchos de ellos parecen deber sus propiedades bacteriostáticas y antifúngicas al ácido úsnico o al ácido vulpínico.

**Monocotiledóneas.** El ajo fresco debe su acción antibiótica a la aliína, aminoácido que contiene azufre.

**Dicotiledóneas.** El Lúpulo (Fam. **Cannabinaceae**) que contiene las cetonas humuleno y lupuleno; En la *Anemona pulsatilla* y

en muchas otras **ranunculáceas** está la lactona protoanemonaína.

Cabe mencionar que se han aislado varios principios activos de plantas superiores desde principios de siglo, hasta la fecha de los cuales, algunos ejemplos se muestran en la siguiente lista.

#### PRINCIPIOS ANTIMICROBIANOS DE PLANTAS SUPERIORES:

NOMBRE	AISLADO DE:	REFERENCIA
Aliína	<i>Allium sativum</i>	Cavallito, (1944)
Protoanemonaína	<i>Anemona pulsatilla</i>	Seegal, (1945)
Ac. xilópico	<i>Xilopia aethiopica</i>	Boakyè-Yiadam, (1977)
Thalidezina	<i>Thalictrum podocarpum</i>	Wm, (1977)
Atylosol	<i>Atylosia trinervia</i>	Tripathi, (1978)
Ac.pisiférico	<i>Chamaecyparis pisiferia</i>	Fukui, (1978)
Ferruginol	<i>Chamaecyparis pisiferia</i>	Fukui, (1978)
Uvaretina	<i>Uvaria chamae</i>	Husfford, (1978)
Glabrol	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Mitscher, (1978)
Santolinol	<i>Artemisa herba-alba</i>	Yashphe, (1979)

NOMBRE	AISLADO DE:	REFERENCIA
Fenilpropanoide glucosido	<i>Plantago major</i>	Raun, (1988)
Aceite esencial	<i>Tanacetum cilicium</i>	Thomas, (1989)
Derivados de Floroglucinol	<i>Helichrysum decumbens</i>	Barberan, (1990)
Fenilpropanoide	<i>Piper sarmentosum</i>	Masuda, (1991)
Intermediol	<i>Jasonia candicans</i>	Hammerschmid, (1993)



## DESCRIPCION BOTANICA DE *Eucaliptus globulus*

Pertenece a la Familia de las **mirtáceas**, está constituida por 2750 especies de las regiones cálidas de ambos hemisferios, plantas arboreas y arbustivas, con abundantes glándulas lisígenas, a las que deben sus secreciones aromáticas, con las hojas sin estípulas, opuestas o alternas; las flores son actinomorfas y hermafroditas, heteroclamídeas, con los sépalos y pétalos en número de 4 - 5; tienen estambres numerosos, reunidos en grupos, raramente en número definido; 2, 5 o muchos carpelos concrecentes en el tálamo con un solo estilo y de uno a muchos rudimentos seminales; androceo con igual o doble número de estambres que de pétalos, o todavía con estambres más numerosos; el número de carpelos es igual al de pétalos, y casi siempre forman un ovario sincárpico e ínfero; placentación marginal. Los frutos son muy variados, y las semillas, en general, carecen de albumen. (BARLEY, 1977)

El género ***Eucaliptus***, está formado por 600 especies australianas y unas pocas malayas; una característica distintiva de los miembros de este género es que el botón floral tiene un opérculo formado por la fusión de los pétalos, sépalos o brácteas que cuando el botón se abre y cae al suelo, los estambres y otras partes internas quedan expuestas. Generalmente las flores son polinizadas por los insectos y ocasionalmente por aves, las hojas juveniles son

de color verde mar y brotan en forma horizontal, pero las hojas maduras están muy juntas y penden en forma vertical.

El fruto es seco y consiste en una cápsula encerrada o parcialmente encerrada por un cáliz tubular adherente, las semillas son numerosas, generalmente diminutas y angulares.

Las características del *Eucalyptus globulus* son; un árbol de gran talla que puede alcanzar los 100 m de altura , verde todo el año hojas lanceoladas, opuestas y sésiles, con nervadura central y generalmente de color verde oscuro, las flores son largas, de aproximadamente 4.5 cm. El *E. globulus* ha alcanzado una gran difusión en el planeta; algunas otras especies han sido introducidas más recientemente en otros países, principalmente con fines de repoblación forestal, por la madera que producen en tiempo relativamente breve, o por las propiedades curtientes de la corteza y finalmente por la resina balsámica que producen.

Así mismo, al eucalipto se le han atribuido virtudes terapéuticas como: Propiedades balsámicas, expectorantes, sudorífico, antiséptico, desinfectante, sedativo, anti-asmático, para controlar la diabetes y contra las infecciones estomacales. (QUER, 1992)

Composición: las hojas contienen, tanino, resina, ácidos grasos, etc.

El aceite esencial constituye el 1.2 - 3% en peso seco de la planta. La composición del aceite esencial del *E. delegatensis* se muestra en el siguiente cuadro:

## Cuadro 2

Composición (100%) del aceite esencial del *Eucaliptus delegatensis*. (WESTON, 1984)

COMPUESTO	A	B	C
3-Metilbutanal	1.2	---	---
$\alpha$ -Pinoeno	1.0	0.3	---
$\alpha$ -Tujeno	---	2.7	---
$\beta$ -Pinoeno	0.3	0.1	---
Sabineno	---	1.2	---
Myrceno	0.9	1.2	---
$\alpha$ -Felandreno	14.3	17.8	0.2
$\alpha$ -Terpinoeno	2.3	1.6	1.1
Limoneno	0.7	0.4	---
1,8-Cineol	0.1	1.7	1.0
$\beta$ -Felandreno	8.9	5.2	---
trans-Ocimeno	---	0.4	---
$\gamma$ -Terpinoeno	3.6	0.3	---
$\rho$ -Cimeno	4.4	3.8	0.5
Terpiloneno	1.9	1.5	---
Linalool	0.2	0.7	0.3
trans-p-Menthen-1-ol	1.4	13.8	11.2
1-Terpinoeno-4-ol	1.7	4.2	3.4
cis-p-Menthen-1-ol	1.5	10.1	10.6
$\beta$ -Cariofileno	0.9	---	---
cis-Piperitol	1.2	0.2	---
C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0.5	3.3	2.8
$\alpha$ -Terpineol	1.1	1.6	1.0
$\alpha$ -Terpinil acetato	0.3	---	---
Piperitona	1.4	0.1	0.2
trans-Piperitol	7.6	---	---
Cuminal	1.0	---	---
4-Fenil-2-Butanona	4.6	6.2	4.9
Metil cinamato	8.5	8.8	17.0
No identificado	1.8	---	---
No identificado	3.5	---	---
No identificado	1.2	1.4	---
C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O	1.3	0.6	0.4
C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	4.2	1.3	2.3
$\gamma$ -Eudesmol	0.3	---	---
$\alpha$ -Eudesmol	1.0	1.2	4.9
$\beta$ -Eudesmol	0.6	2.6	10.6
No identificado	0.7	1.0	2.0

A = Hoja embrionaria, extracto acuoso por destilación.

B = Hoja madura, extracto acuoso por destilación.

C = Hoja madura, extracto con diclorometano.

## JUSTIFICACION

Se sabe que gran cantidad de plantas presentan actividad farmacológica, y que nuestro pueblo las ha utilizado desde épocas precortesianas en forma de: jarabes, ungüentos, cataplasmas, lavativas, purgas y otras formas más.

De este modo, el uso de plantas con propiedades curativas reales o atribuídas, fue sin duda la técnica terapéutica más extendida entre los grupos indígenas, producto de milenios de observación empírica y de experiencia repetida. (SEPÚLVEDA 1988)

En la actualidad, dichas prácticas solo se encuentran en grupos reducidos y aislados, sin embargo, se ha comprobado la veracidad de éstas en el 40% mediante pruebas de investigación. (WILLIAM, 1978)

Aunado a esto, se cuenta con referencias bibliográficas de estudios descriptivos y aproximaciones etnobotánicas realizadas por diferentes autores los que describen cierta actividad antimicrobiana de algunas plantas de nuestro país.

La problemática que siempre hemos enfrentado sobre el conocimiento de nuestros recursos naturales, es la carencia de datos experimentales que corroboren dichas virtudes terapéuticas.

A continuación se presenta una lista de plantas cuyos datos experimentales sugieren actividad antimicrobiana reportada por diversos autores:

FAMILIA	ESPECIE	REFERENCIA
Amarantaceae	<i>Alternanthera repens</i>	Martínez, 1969
Moraceae	<i>Dorstenia contrayerba</i>	Martínez, 1969
Moraceae	<i>Ficus carica</i>	Cabrera, 1980
Myrtaceae	<i>Eucaliptus globulus</i>	Martínez, 1969
Julianaceae	<i>Juliana adstringens</i>	Martínez, 1969
Loasaceae	<i>Mentzelia hispida</i>	Hernández, 1942
Bignonaceae	<i>Permantiera edulis</i>	Martínez, 1969
Compositae	<i>Piqueria trinervia</i>	Cabrera, 1980

De la lista anterior, se optó por trabajar con el *E. globulus*, debido a que fue la planta que presentó resultados positivos con halos de inhibición bien definidos, en los ensayos preliminares de selección. Por otro lado la colecta de los ejemplares resultó fácil por su amplia distribución y por último se cuenta con estudios fitoquímicos y aproximaciones etnobotánicas que permiten un buen apoyo a nuestro proyecto.

De todo lo anterior se desprende la importancia de poder corroborar en forma experimental, la eficacia de esta planta en el tratamiento de las infecciones gastrointestinales producidas por algunas bacterias en específico. Así mismo contribuir con un mejor conocimiento de las propiedades terapéuticas, para su mejor aprovechamiento racional y científico.

## OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar el potencial antimicrobiano de la planta *Eucalyptus globulus*, la cual es utilizada en forma popular para el tratamiento de enfermedades del tracto digestivo.

2. Aislar el compuesto responsable de dicha actividad.

3. Determinar la naturaleza química a nivel de grupo funcional y la posible elucidación parcial o total de la estructura.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar un estudio bibliográfico de la planta *Eucalyptus globulus* tomando en cuenta aspectos etnobotánicos, ecológicos y quimiotaxonómicos.

2. Determinación de la zona de colecta de los ejemplares para el estudio.

3. Realización de Bioensayos para determinar la actividad *in vitro*

3.1 Preparación de extractos mediante reflujos a temperatura y presión constante.

3.2 Recuperación de sólidos mediante liofilización.

3.3 Realización del bioensayo cualitativo utilizando la metodología descrita por Kirby-Bauer (GARROD, 1985) frente a bacterias comúnmente presentes en infecciones gastro-intestinales como: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Enterobacter agglomerans* y *Vibrio cholerae*.

3.4 Realización del bioensayo cuantitativo utilizando la metodología descrita para la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Bactericida Media (CBM) y la Curva de Supervivencia (Curva Letal).

4. Aislamiento del(os) principio(s) activo(s) presente en los extractos que muestren actividad antimicrobiana.

4.1 En cada una de las fases de separación se evaluará el potencial antimicrobiano de las fracciones de acuerdo al modelo antes mencionado.

4.2 Separación de fracciones mediante fraccionamiento con disolventes y por técnicas cromatográficas.

4.3 Purificación del principio activo por cristalización o por cromatografía.

5. Elucidación de la estructura, mediante estudios espectroscópicos (bajo la asesoría de especialistas en el área).

## MATERIAL Y METODOS:

COLECTA: El Eucalipto figura como una de las plantas con mayor distribución en nuestro país empleandola como planta ornamental. Debido a que se trata de una especie introducida, no es posible determinar una zona representativa específica que corresponda al entorno natural de la misma; esto permitió la colecta del material en el sitio más próximo a la institución. Veinte Kg de hojas maduras fueron colectados frente al Tecnológico de Tlalnepantla, Comunidad Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo. de Mex.

OBTENCION DEL EXTRACTO: Se pesaron 50g de hojas que son las que se utilizan tradicionalmente en forma de infusión para el tratamiento de infecciones del sistema digestivo. (MARTÍNEZ, M. 1969) La extracción se efectuó en un dispositivo de reflujo con 250 ml de agua bidestilada durante 8 horas continuas a 100°C y 1 atm de presión. El extracto se concentró a sequedad, primero por evaporación y posteriormente en una estufa de vacío marca Lab-Line a 70°C con un vacío de -40 kPa, con el extracto seco se calculó el rendimiento en sólidos: 0.61g / 10 ml.

Para el bioensayo se utilizaron diferentes concentraciones del extracto acuoso: ( 150, 100, 50, 25 ) mg/ml en agua destilada y esterilizados por filtración en filtros Milipore estériles empleando una bomba de vacío. (VERPOORTE, 1981)



#### OBTENCION DE ACEITES ESENCIALES:

200 g de hojas frescas contenidas en 500 ml de agua didestilada se sometieron a 100°C en un destilador para arrastre de vapor durante 8 horas continuas. (DOMÍNGUEZ, 1973)

Se recuperaron 0.5 ml de aceites del embudo de separación, esto fue un rendimiento del 0.25%.

Para el ensayo se utilizaron concentraciones de: 50, 100 y 150 µl de los aceites esenciales con base a nuestros datos experimentales.

**BIOENSAYO:** Se realizó bajo la metodología descrita por Kirby-Bauer, que es el método oficial de la Food & Drug Administration, USA (GARROD, 1985 ) cuya secuencia se describe a continuación.

**Medio:** El agar que se empleó fue el de Mueller-Hinton, recomendado por promover el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos, así mismo la composición del agar no intervino en forma significativa en la difusión y atenuación de la actividad antimicrobiana del extracto problema. Se mantuvo un volumen uniforme del medio de 25 ml por caja.

**Inóculo:** En cada ensayo se depositaron aprox.  $3 \times 10^8$  microorganismos/ml con base al Patrón # 1 de Mc Farland ("estandar de turbidez" preparado con: 99.5 ml de ácido sulfúrico y 0.5 ml de solución que contenga 1.175% de cloruro de bario dihi-

dratado ). Con el asa de siembra estéril se tomaron las superficies convexas de 4 ó 5 colonias de apariencia semejante y que estuviesen en forma aislada. Se sumergió el asa en 3 ml de solución salina al 0.9% hasta que se logró una suspensión de bacterias uniforme. Se utilizó un hisopo de poliéster estéril sumergiéndolo en la suspensión y luego se enjuagó el excedente del líquido en las paredes del tubo y se cubrió uniformemente toda la superficie de la placa por el método rotativo (girando la placa al menos en tres direcciones en un ángulo de 60° para cada estría). (KONEMAN, 1983)

Depósito: Se usaron cilindros de acero inoxidable ( USP ), los cuales fueron colocados en forma vertical sobre el medio, procurando no perforarlo para evitar diferencias en la difusión del antimicrobiano. Con la ayuda de una micropipeta se colocó la cantidad requerida para el ensayo. Se colocaron tres antibioticocilindros por caja para evitar zonas de contacto entre los halos de inhibición.

Medición de diámetros: Todas las mediciones se hicieron con aproximación de 1 mm utilizandose una regla vernier, se cuidó de hacer la lectura en forma vertical a la placa para evitar errores por efecto de paralelismo.

Cultivo de bacterias: Las cepas de microorganismos fueron donadas por el Departamento de Bacteriología del Posgrado de Microbiología de la F.E.S. Cuautitlán. Los microorganismos

con los que se probó la actividad antimicrobiana fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Shigella boydii* ATCC 8700, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Enterobacter agglomerans* del cepario del Departamento de Microbiología de la **UNAM FES** Cuautitlán y *Vibrio cholerae* 01 (aislada de agua contaminada) donada por el proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria de Ciencias de la Salud y Educación de la **UNAM** Campus Iztacala los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, de la misma unidad bajo la supervisión directa del Director de Tesis.

Incubación: Se incubó la bacteria 4 horas antes de la realización del ensayo, en una estufa clínica a 37°C y después de que se depositaron las muestras problema se les reincubó durante 18 horas a 37°C, (VERPOORTE, 1981) se midieron los halos de inhibición al momento que termino el periodo de incubación con lo que se evitó alteraciones en los diámetros de inhibición por decaimiento del agar, deterioro del antimicrobiano o sobredesarrollo de las colonias bacterianas.

Resultados: El(los) extracto(s) que mostraron un halo de inhibición y que se consideró positivo, se medieron en base a la metodología ya descrita. En el ensayo se tomaron positivos todo halo de inhibición mayor de 3 mm, que tenia bordes bien definidos y que se repitió en forma homogénea en las diferentes concentraciones de un mismo extracto.

Los ensayos se realizaron por triplicado y las mediciones de dichos halos de inhibición aparecen en tablas y gráficos para su mejor apreciación.

#### ANALISIS CUANTITATIVO :

Para valorar el potencial antimicrobiano del extracto y poder así tener un mayor marco de referencia sobre su actividad se procedió a evaluar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se realizó con la técnica de dilución en caldo descrita por Kirby-Bauer con la modificación de medio de cultivo líquido (caldo) depositado en tubos de ensayo con tapón de rosca, en donde hubo un tubo control positivo (Ampicilina) y un tubo control negativo (caldo Mueller-Hinton estéril) y una serie de tubos con concentraciones ascendentes (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64  $\mu$ l etc) del antimicrobiano (extracto problema), donde se tomó como resultado a la concentración menor donde no se distinguió crecimiento bacteriano a simple vista, (es decir, no presentó turbidez). Sin embargo el subcultivo en un medio libre del antimicrobiano, mostró que el proceso de inhibición es reversible y que se desarrollaron las colonias sobrevivientes, por lo que se aceptó como la concentración con efectos bacteriostáticos, es decir la (CMI).

En contraste con la concentración del extracto en la cual no se logró recuperar sobrevivientes como consecuencia del efecto letal a tales dosis del antimicrobiano, con lo que se

obtuvo la Concentración Bactericida Media (CBM), esto es, la concentración mínima del antimicrobiano que fue capaz de matar al 99.9% de bacterias del inóculo inicial y se aceptó como un efecto bactericida, y se obtuvo con la siembra de las diluciones posteriores a la CMI el la cual no existió crecimiento bacteriano en un medio libre del antimicrobiano. (LENNETTE, 1987)

#### CURVA LETAL

La determinación de la velocidad microbicida o el establecimiento de una curva letal ha sido ampliamente aplicada a la evaluación y comparación de nuevas drogas y al estudio de diferencias y cambios en la susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos bacterianos clínicamente importantes.

Desarrollo: En este estudio la curva letal se realizó para evaluar a los aceites esenciales.

1. Se preparó y rotuló por lo menos un tubo con el problema para muestreo desde el tiempo 0 y después a intervalos de una hora.
2. Se preparó y rotuló un tubo sin antibiótico que sirvió como control del desarrollo.
3. Se preparó el inóculo, con aproximadamente  $3 \times 10^8$  bacterias/ml en tubos de ensayo con 10 ml de Caldo de Mueller-Hinton.

4. Se inoculó con ayuda de una micropipeta 0.1 ml de la suspensión de bacterias en los tubos que contienen las diluciones seriadas del antimicrobiano. La concentración final fue aproximadamente de  $3 \times 10^5$  bacterias/ml de caldo en cada tubo.

5. Se agitó de inmediato en un vortex durante 15 segundos el tubo del tiempo 0 y se colocó 0.1 ml en un tubo con agar fundido con lo que se preparó de una placa de dilución. Se incubó a 35°C durante 18 horas y se realizó el conteo de colonias.

6. Del mismo modo se preparó placas de dilución luego de cada hora de incubación del siguiente tubo.

7. Para el ensayo de 24 horas, se agitó el último tubo en el vortex a las 20 horas y se reincubó 4 horas adicionales.

8. A las 24 horas, se agitó nuevamente en el vortex y se preparó la placa de dilución.

9. El recuento de colonias se represento a modo de gráfica.

(LENNETTE, 1987)

#### SEPARACION Y AISLAMIENTO DEL PRINCIPIO ACTIVO:

Empleando cromatografía de placa fina Cromatofolios AL de Sílica gel 60 sin indicador fluorescente, Merck 5553, con las siguientes características:

Longitud del cromatofolio (8.56 cm); ancho del cromatofolio (3.0 cm); punto de aplicación (0.8 mm de la base); el solvente que se utilizó fue el reportado en la bibliografía para

la separación de aceites esenciales: Tolueno- Acetato de etilo 93:7 v/v; el frente del solvente a: 8.0 cm. (WAGNER, 1983)

Los aceites esenciales se fraccionaron en una cromatografía de adsorción empleando una columna con las siguientes características:

Longitud de columna: 1.5 m; diámetro de columna: 2.5 cm; como fase estacionaria: Sílica gel malla 70 - 230 y la fase móvil: Benceno-Eter etílico 8:2 v/v; a cada una de las alicuotas obtenidas se les realizó el ensayo de Kirby-Bauer para determinar la fracción activa.

#### PURIFICACION DEL PRINCIPIO ACTIVO:

Se realizó en una cromatografía de adsorción en columna con las siguientes condiciones:

Longitud de columna: 50 cm; diámetro de columna: 2.5 cm; la fase estacionaria: Sílica gel malla 70 - 230 y como fase móvil: Benceno - Eter etílico 8:2 v/v.

La fracción activa cristalizó en la mezcla de elución y su pureza se determinó mediante cromatografía en capa delgada.

Al compuesto puro se le determinó su Punto de fusión en un aparato para punto de fusión Fisher-Johns.

## ANALISIS QUIMICO:

La elucidación de la estructura se realizó mediante la utilización de los siguientes métodos de análisis:

\* Espectroscopia en Infrarrojo, en un Espectrofotómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier, marca Perkin-Elmer Mod. 1615 con pastillas de Bromuro de Potasio, que nos permitió conocer los principales grupos funcionales de la molécula.

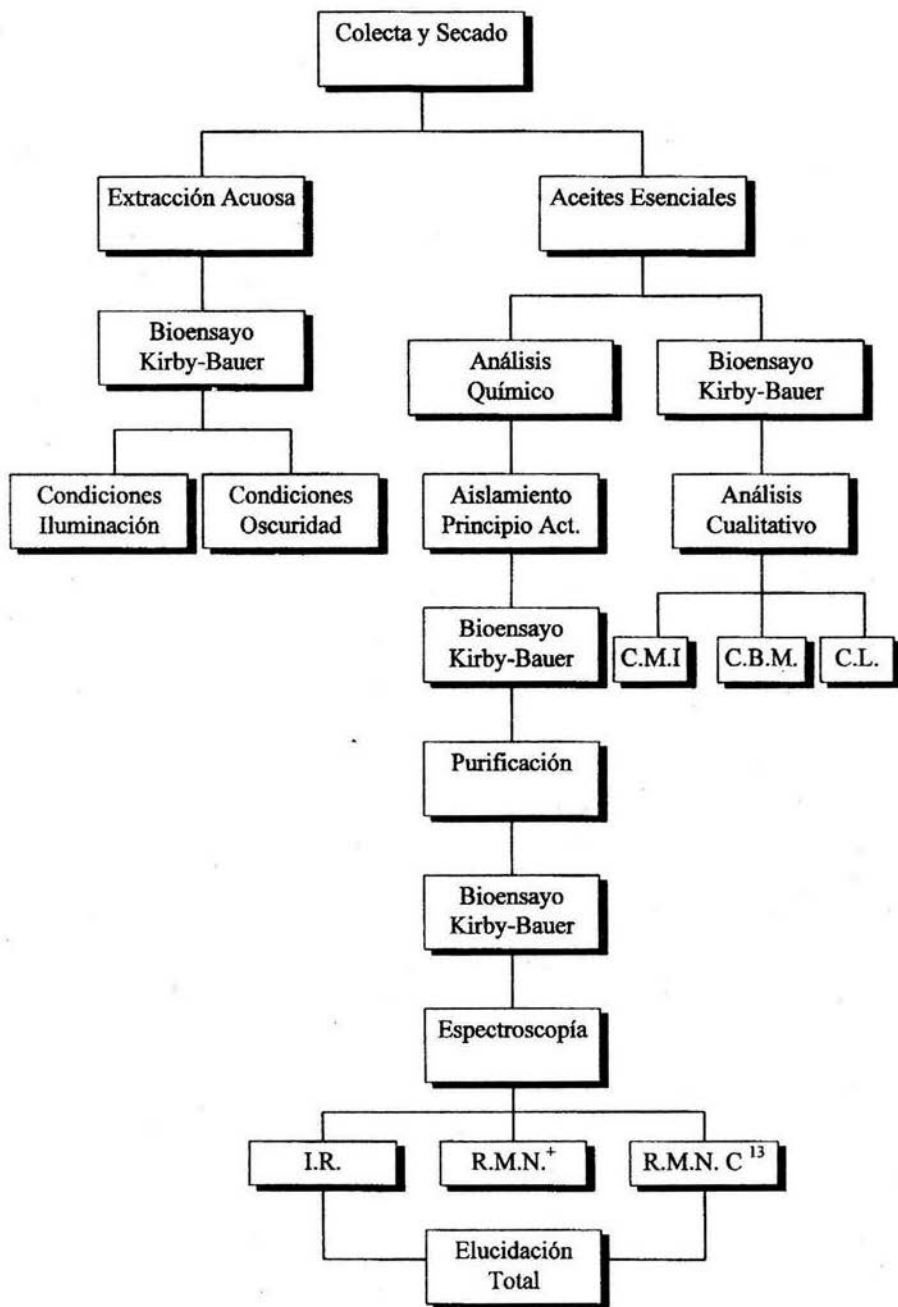
\* Resonancia Magnética Nuclear de Protones en un equipo Varian Geminis 200 A, que nos permitió conocer las diferentes señales de resonancia de cada protón ( $H^+$ ) para ubicarlos dentro de la conformación estructural de la molécula.

\* Resonancia Magnética Nuclear de  $C^{13}$  en un equipo Varian XR-300A, lo que nos permitió conocer el número de carbonos totales que constituyen a la molécula, su desplazamiento y su naturaleza química.

Todos los Análisis se realizaron bajo la supervisión del Dr. Alfonso Romo del Vivar, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.



DIAGRAMA DE FLUJO:



## RESULTADOS

BIOENSAYOS PRELIMINARES: Los resultados que se presentan en el Cuadro 1 muestran la actividad biológica del extracto acuoso frente a 4 enterobacterias y nos permite apreciar que a dos concentraciones se obtuvieron halos de inhibición cercanos al control positivo.

**Cuadro 1** Potencial antimicrobiano del extracto acuoso (licor madre) mediante la Técnica de Kirby-Bauer.

Extracto ( $\mu$ l/cil.)	Sólidos (mg)	Microorganismos problema*			
		<i>Ec</i>	<i>St</i>	<i>Sb</i>	<i>Ea</i>
50	3	--	--	--	--
100	6	8	9	7	9
150	9	10	12	15	17
Control(+)	0.5 mg/ml	17	18	16	12
Control(-)	1 ml	--	--	--	--

\* Halos de Inhibición en mm.

Clave: -- (no hubo halos de inhibición).

CONTROL POSITIVO ( + ) Ampicilina sal sódica (sigma A 0166).

CONTROL NEGATIVO ( - ) Agua destilada estéril.

### ORGANISMOS PROBLEMA

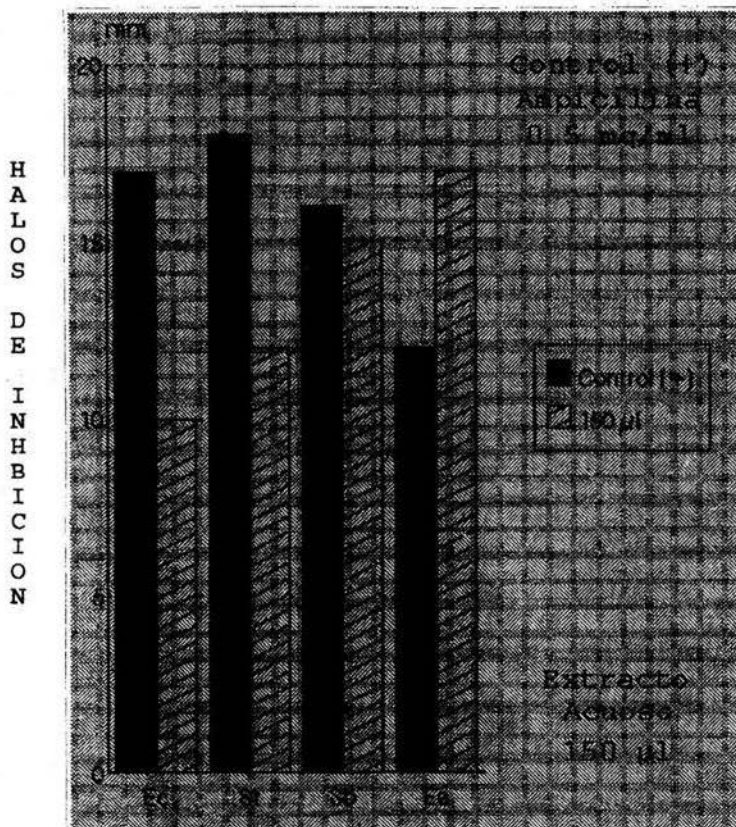
*Ec* = *Escherichia coli*

*St* = *Salmonella typhi*

*Sb* = *Shigella boydii*

*Ea* = *Enterobacter agglomerans*

**Figura 1** Potencial antimicrobiano de extracto acuoso. Nos muestra en forma gráfica los resultados positivos del testigo (Ampicilina) en comparación con los resultados positivos del extracto problema.



**ORGANISMOS PROBLEMA**

*Ec* = *Escherichia coli*

*St* = *Salmonella typhi*

*Sb* = *Shigella boydii*

*Ea* = *Enterobacter aglomerans*

En el siguiente cuadro se hace evidente que solo hubo halos de inhibición para el control positivo debido a que el extracto acuoso no presentó actividad biológica.

**Cuadro 2** Potencial antimicrobiano del extracto acuoso reposado (licor madre) después de 48 horas mediante la técnica de Kirby-Bauer.

Extracto ( $\mu$ l/cil.)	Sólidos (mg)	Microorganismos problema*			
		<i>Ec</i>	<i>St</i>	<i>Sb</i>	1
50	3	--	--	--	--
100	6	--	--	--	--
150	9	--	--	--	--
Control (+)	0.5 mg/ml	17	18	16	12
Control (-)	1 ml	--	--	--	--

\* Halos de Inhibición en mm.

CONTROL POSITIVO ( + ) Ampicilina sal sódica (sigma A 0166)

CONTROL NEGATIVO ( - ) Agua destilada estéril.

#### ORGANISMOS PROBLEMA

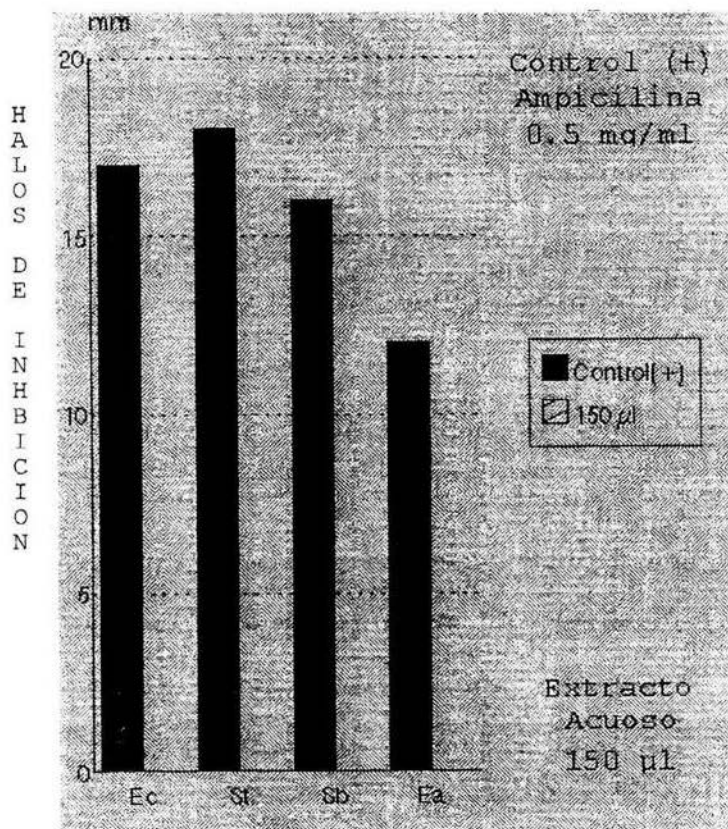
*Ec* = *Escherichia coli*

*St* = *Salmonella typhi*

*Sb* = *Shigella boydii*

*Ea* = *Enterobacter agglomerans*

En **Figura 2** Potencial antimicrobiano del extracto acuoso (licor madre) repetición a 48 horas mediante la Técnica de Kirby-Bauer. Se hace evidente solo un tipo de barras que corresponde al control positivo debido a que el extracto acuoso no presentó actividad biológica.



#### ORGANISMOS PROBLEMA

*Ec* = *Escherichia coli*

*St* = *Salmonella typhi*

*Sb* = *Shigella boydii*

*Ea* = *Enterobacter aglomerans*

Los resultados que se presentan en el Cuadro 3 muestran la actividad biológica del extracto acuoso frente a 4 enterobacterias en condiciones de oscuridad y nos permite apreciar que a dos concentraciones se obtuvieron halos de inhibición cercanos al control positivo.

**Cuadro 3** Potencial antimicrobiano del extracto acuoso en condiciones de oscuridad mediante la técnica de Kirby *et al.*

Extracto ( $\mu$ l/cil.)	Sólidos (mg)	Microorganismos problema*			
		<i>Ec</i>	<i>St</i>	<i>Sb</i>	<i>Ea</i>
50	3	--	--	--	--
100	6	9	9	8	9
150	9	10	11	14	13
Control (+)	0.5 mg/ml	17	17	16	15
Control (-)	1 ml	--	--	--	--

\* Halos de Inhibición en mm.

CONTROL POSITIVO ( + ) Ampicilina sal sódica (sigma A 0166)

CONTROL NEGATIVO ( - ) Agua destilada estéril.

#### ORGANISMOS PROBLEMA

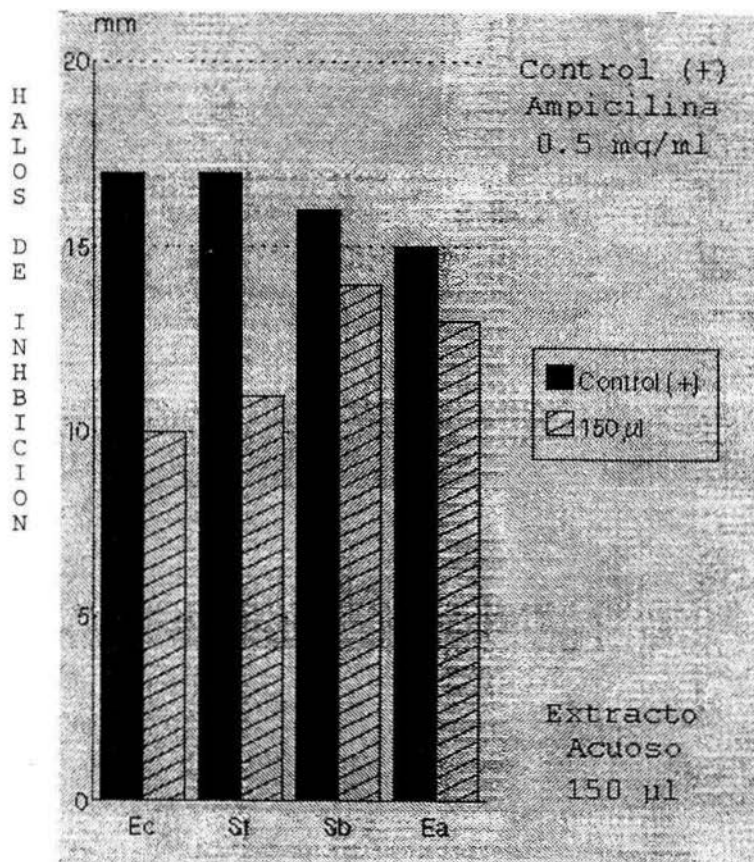
*Ec* = *Escherichia coli*

*St* = *Salmonella typhi*

*Sb* = *Shigella boydii*

*Ea* = *Enterobacter agglomerans*

Figura 3 Potencial antimicrobiano del extracto acuoso en condiciones de oscuridad, mediante la Técnica de Kirby-Bauer. Nos muestra en forma gráfica los resultados donde se muestra la concentración de mayor halos de inhibición para el extracto acuoso.



ORGANISMOS PROBLEMA

Ec = *Escherichia coli*

St = *Salmonella typhi*

Sb = *Shigella boydii*

Ea = *Enterobacter agglomerans*

En el cuadro 4 se hace evidente que solo hubo halos de inhibición para el control positivo debido a que el extracto acuoso no presentó actividad biológica despues de repetir el ensayo a 48 horas y en condiciones de oscuridad.

**Cuadro 4** Potencial antimicrobiano del extracto acuoso en condiciones de oscuridad y reposado 48 horas.

Extracto ( µl/cil.)	Sólidos (mg)	Microorganismos problem.			
		<i>Ec</i>	<i>St</i>	<i>Sb</i>	
50	3	--	--	--	--
100	6	--	--	--	--
150	9	--	--	--	--
Control (+)	0.5 mg/ml	16	17	17	14
Control (-)	1 ml	--	--	--	--

\* Halos de Inhibición en mm.

CONTROL POSITIVO ( + ) Ampicilina sal sódica (sigma A 0166)

CONTROL NEGATIVO ( - ) Agua destilada estéril.

#### ORGANISMOS PROBLEMA

*Ec* = *Escherichia coli*

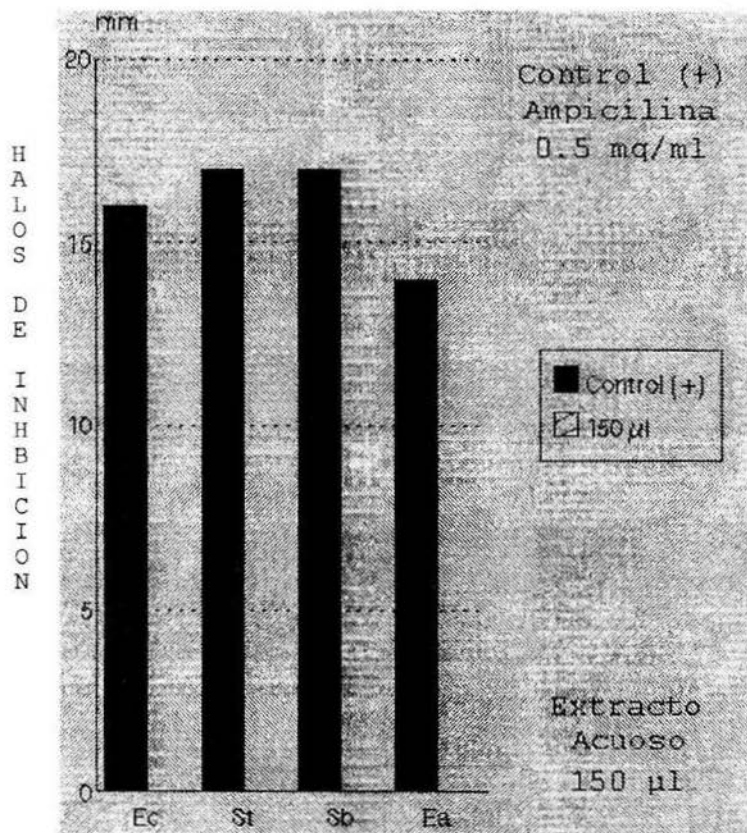
*St* = *Salmonella typhi*

*Sb* = *Shigella boydii*

*Ea* = *Enterobacter agglomerans*



En la **Figura 4** Potencial antimicrobiano del extracto acuoso en condiciones de oscuridad y reposado 48 horas, mediante la Técnica de Kirby-Bauer. Aquí se hace evidente solo un tipo de barras que corresponde al control positivo debido a que el extracto acuoso no presentó actividad biológica a ninguna de sus concentraciones.



ORGANISMOS PROBLEMA

Ec = *Escherichia coli*

St = *Salmonella typhi*

Sb = *Shigella boydii*

Ea = *Enterobacter agglomerans*

Para este momento, quedó demostrado que existía algún factor por el cual, no era posible el repetir los ensayos, sin embargo, con los resultados reportados en el Cuadro 1 y el Cuadro 3 se pudo observar que los halos de inhibición a la mayor concentración del extracto acuoso, eran muy similares a los que se obtuvieron con el control positivo:

**Cuadro 5** Potencial antimicrobiano promedio de los resultados del Cuadro 1 y el Cuadro 3.

Extracto ( $\mu$ l/cil.)	Sólidos (mg)	Microorganismos problema*			
		<i>Ec</i>	<i>St</i>	<i>Sb</i>	<i>Ea</i>
50	3	--	--	--	--
100	6	8.5	9	7.5	9
150	9	10	11.5	14.5	12.5
Control (+)	0.5 mg/ml	17	17.5	16	13.5
Control (-)	1 ml	--	--	--	--

\* Halos de Inhibición en mm.

CONTROL POSITIVO ( + ) Ampicilina sal sódica (sigma A 0166)

CONTROL NEGATIVO ( - ) Agua destilada estéril.

#### ORGANISMOS PROBLEMA

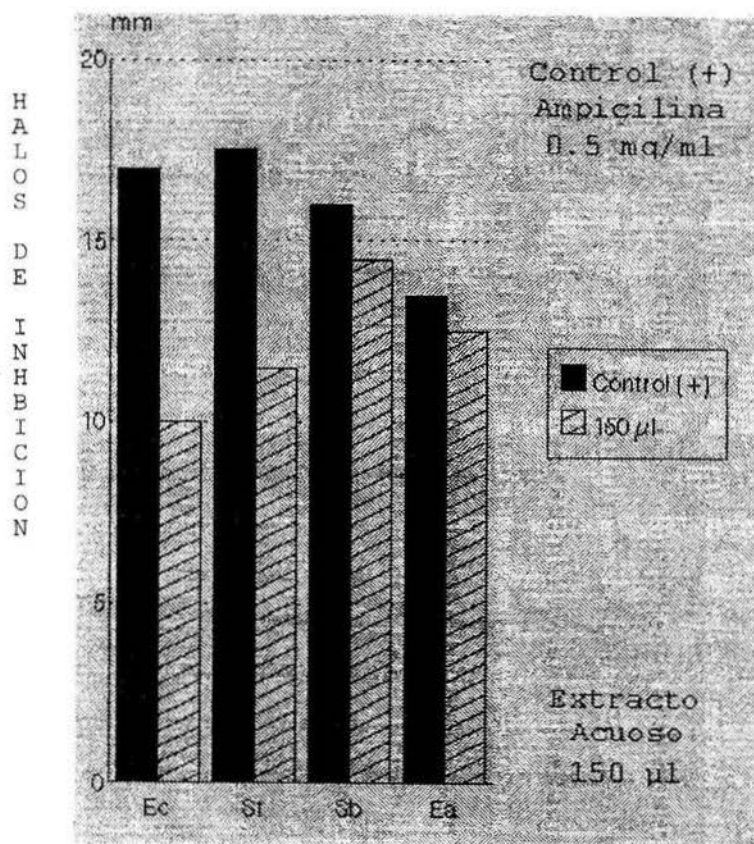
*Ec* = *Escherichia coli*

*St* = *Salmonella typhi*

*Sb* = *Shigella boydii*

*Ea* = *Enterobacter agglomerans*

Figura 5 Representación gráfica del potencial antimicrobiano promedio de los extractos acuosos que mostraron actividad, mediante la Técnica de Kirby-Bauer.



ORGANISMOS PROBLEMA

*Ec* = *Escherichia coli*

*St* = *Salmonella typhi*

*Sb* = *Shigella boydii*

*Ea* = *Enterobacter agglomerans*

En los resultados de los bioensayos que se muestran en las figuras 1 y 3, es evidente la actividad biológica, sin embargo, los resultados son negativos al momento de repetirlos por lo que se pensó en la posibilidad de que el compuesto responsable de la actividad antimicrobiana se tratara de un compuesto volátil. Por lo que se procedió a la obtención de los aceites esenciales para evaluar su actividad biológica.

**Cuadro 6** Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales mediante la técnica de Kirby-Bauer.

Conc. ( $\mu$ l/cilindro)	Microorganismos problema*				
	<i>Ec</i>	<i>St</i>	<i>Sb</i>	<i>Ea</i>	<i>Vc</i> **
25	15.3	8.5	13.4	17.6	25
50	40.2	25.3	36.2	42.5	55.4
100	NO HUBO CRECIMIENTO EN TODA LA CAJA				
Control (+)	19	18	16	16	20
Control (-)	--	--	--	--	--

\* Halos de Inhibición en mm.

CONTROL POSITIVO ( + ) Ampicilina sal sódica (sigma A 0166)

CONTROL NEGATIVO ( - ) Agua destilada estéril.

#### ORGANISMOS PROBLEMA

*Ec* = *Escherichia coli*

*St* = *Salmonella typhi*

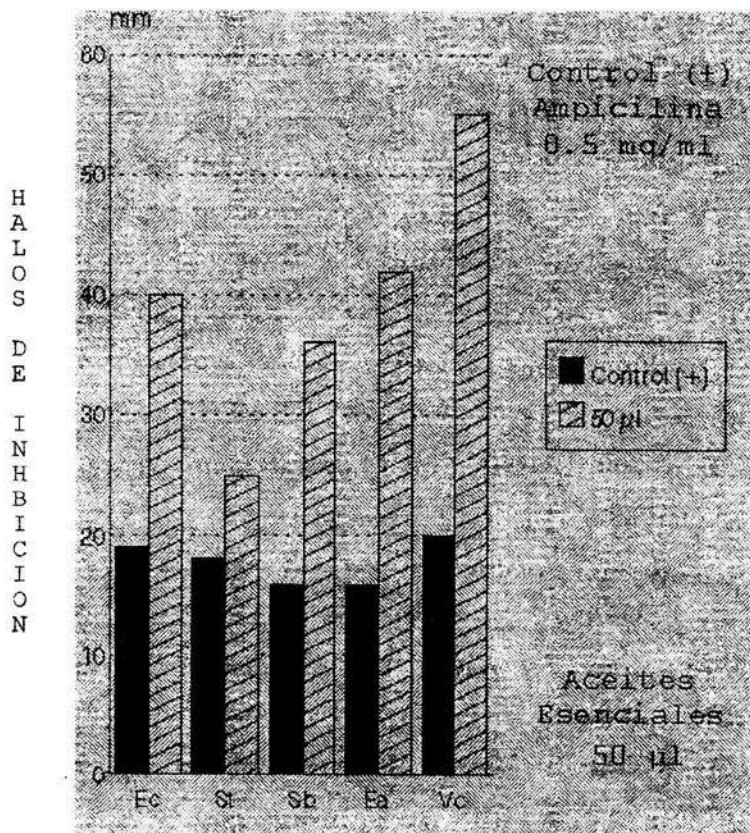
*Sb* = *Shigella boydii*

*Ea* = *Enterobacter agglomerans*

\*\* *Vc* = *Vibrio cholerae*

\*\* *Vc* = *Vibrio cholerae* 01 donada por el proyecto CyMA de un aislamiento de agua contaminada.

La **Figura 6** Potencial antimicrobiano de los Aceites Esenciales, mediante la Técnica de Kirby-Bauer. Nos muestra que a una menor concentración de aceites esenciales, se obtuvieron halos de inhibición muy superiores a los del control positivo.



ORGANISMOS PROBLEMA

- Ec = *Escherichia coli*
- St = *Salmonella typhi*
- Sb = *Shigella boydii*
- Ea = *Enterobacter agglomerans*
- Vc = *Vibrio cholerae*

Los resultados anteriores muestran en forma cualitativa el potencial antimicrobiano de los aceites esenciales y a la vez no dejan duda de que el principio activo se trata de un compuesto volátil.

Para medir en forma cuantitativa el potencial antimicrobiano de los aceites y para poder definir si se trata de un efecto bacteriostático o bactericida, se evaluó la Concentración Mínima Inhibitoria ( CMI ), la Concentración Bactericida Media ( CBM ) y la Curva Letal.

#### ANALISIS CUANTITATIVO:

**Cuadro 7** Concentración Mínima Inhibitoria ( C.M.I.) de los aceites esenciales, mostrando los resultados de 4 repeticiones.

Concentración ( $\mu$ l/2ml)	Organismos problema				
	<i>Ec</i>	<i>St</i>	<i>Sb</i>	<i>Ea</i>	<i>Vc</i>
C.M.I. 1	16	16	02	16	08
C.M.I. 2	16	16	04	16	08
C.M.I. 3	08	32	02	64	08
C.M.I. 4	16	32	08	32	16
<b>PROMEDIO =</b>	<b>14</b>	<b>24</b>	<b>4</b>	<b>32</b>	<b>10</b>

#### ORGANISMOS PROBLEMA

*Ec* = *Escherichia coli*  
*St* = *Salmonella typhi*  
*Sb* = *Shigella boydii*  
*Ea* = *Enterobacter agglomerans*  
*Vc* = *Vibrio cholerae*

#### PROMEDIO

Concentración en la que se obtuvo la C.M.I.

**Cuadro 8** Concentración Bactericida Media ( C.B.M.) de los aceites esenciales, donde se muestran los resultados de 4 repeticiones.

Concentración ( $\mu$ l/2ml)	Organismos problema				
	<i>Ec</i>	<i>St</i>	<i>Sb</i>	<i>Ea</i>	<i>Vc</i>
C.B.M. 1	32	32	04	64	08
C.B.M. 2	32	16	08	16	08
C.B.M. 3	08	32	16	64	16
C.B.M. 4	32	64	08	64	08
<b>PROMEDIO =</b>	<b>26</b>	<b>36</b>	<b>09</b>	<b>52</b>	<b>10</b>

**ORGANISMOS PROBLEMA**

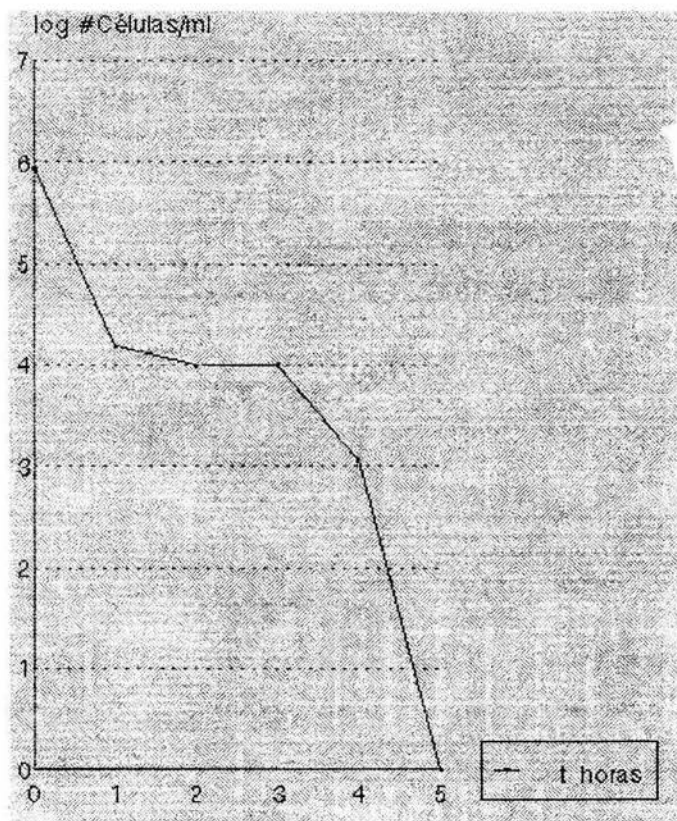
*Ec* = *Escherichia coli*  
*St* = *Salmonella typhi*  
*Sb* = *Shigella boydii*  
*Ea* = *Enterobacter agglomerans*  
*Vc* = *Vibrio cholerae*

**PROMEDIO**

Concentración en la que se obtuvo la C.B.M.

Como se puede observar, para todos los microorganismos los aceites esenciales presentan un efecto bactericida a concentraciones muy pequeñas, lo que nos sugiere que es altamente tóxico para las células bacterianas por lo que la siguiente fase del proyecto es conocer la relación entre la dosis y el impacto sobre la población, es decir la Curva Letal, donde los resultados aparecen en la siguiente gráfica.

Figura 7 Curva Letal de los aceites esenciales del eucalipto vs *Escherichia coli*



Tiempo (horas)	# Células/ml	log # Células/ml
0	870,000	5.9395
1	15,000	4.1706
2	10,000	4.0
3	10,000	4.0
4	1,150	3.0661
5	0	0.0



#### SEPARACION DEL PRINCIPIO ACTIVO:

Mediante la utilización de la técnica de cromatografía en placa fina se fraccionó a los aceites esenciales en 8 manchas se obtuvieron el Rf para cada una de ellas.

Separación del principio activo de los aceites esenciales.

Banda	Rf
# 1	0.04
# 2	0.25
# 3	0.31
# 4	0.36
# 5	0.40
# 6	0.44
# 7	0.56
# 8	0.81

#### AISLAMIENTO DEL PRINCIPIO ACTIVO:

Los aceites esenciales se fraccionaron por medio de una cromatografía en columna, de la que se obtuvieron 9 fracciones. A cada una de las fracciones se les evaluó el potencial antimicrobiano bajo la Técnica de Kirby-Bauer.

Con la finalidad de monitorear la fracción activa responsable de la actividad antimicrobiana se realizó el siguiente ensayo:

**Cuadro 9** Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las 9 fracciones, mediante la Técnica de Kirby-Bauer:

# Fracción 50 $\mu$ l	Microorganismos problema*				
	Ec	St	Sb	Ea	V
1	--	--	--	--	-
2	--	--	--	--	--
3	--	--	--	--	--
4	--	--	--	--	--
5	--	--	--	--	--
6	--	--	--	--	--
7	--	--	--	--	--
8	8	10	7	6	7
9	20	19	19	17	30
Control (+)	19	18	16	16	20
Control (-)	--	--	--	--	--

\* Halos de Inhibición en mm.

CONTROL POSITIVO ( + ) Ampicilina sal sódica (sigma A 0166)

CONTROL NEGATIVO ( - ) Agua destilada estéril.

ORGANISMOS PROBLEMA

Et = *Escherichia coli*

St = *Salmonella typhi*

Sb = *Shigella boydii*

Ea = *Enterobacter agglomerans*

Vc = *Vibrio cholerae*

Como la Fracción 9 fue la que mostró los halos de inhibición de mayor diámetro, la consideramos la fracción activa, sin embargo la F 8 aunque también muestra halos de inhibición de menor tamaño, se lo atribuimos a la presencia de pequeñas concentraciones de la F 9. Por lo que se procedió a evaluar la C.M.I. y la C.B.M. de la F 9 y los resultados aparecen en el siguiente cuadro.

**Cuadro 10** Concentración Mínima Inhibitoria (C.M.I.) y Concentración Bactericida Media (C.B.M.) de la Fracción 9.

Concentración ( $\mu$ l )	Microorganismos problema				
	<i>Ec</i>	<i>St</i>	<i>Sb</i>	<i>Ea</i>	<i>Vc</i>
0	++	++	++	++	++
2	++	++	--	++	--
4	++	++	--	--	--
8	++	++	--	--	--
16	--	--	--	--	--
32	--	--	--	--	--
64	--	--	--	--	--
128	--	--	--	--	--
<b>C.M.I. =</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>2</b>
<b>C.B.M. =</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>2</b>

Cl. ++ (presencia de turbidez = crecimiento bacteriano).  
 -- (no hubo crecimiento bacteriano).

#### ORGANISMOS PROBLEMA

*Ec* = *Escherichia coli*  
*St* = *Salmonella typhi*  
*Sb* = *Shigella boydii*  
*Ea* = *Enterobacter agglomerans*  
*Vc* = *Vibrio cholerae*

## ANALISIS QUIMICO:

La purificación de la fracción 9, se logró al someter por segunda ocasión la fracción 9 a una cromatografía utilizando una columna de absorción bajo las condiciones citadas con anterioridad.

De esta cromatografía se obtuvieron tres fracciones ( 9A; 9B; 9C )de las cuales dos son líquidas y una cristalina, a las tres fracciones se les evaluó el potencial antimicrobiano donde la frac. 9C fue la activa.

**Cuadro 11** Actividad Antimicrobiana de las Fracciones 9A 9B y 9C mediante la técnica de Kirby-Bauer.

Fracción	Cantidad	Microorganismos problema*			
		<i>Ec</i>	<i>St</i>	<i>Sb</i>	<i>Ea</i>
F 9C	30 $\mu$ l	20	18	35	35
F 9B	30 $\mu$ l	--	--	--	--
F 9A	30 $\mu$ g	--	--	--	--
Control (+)	30 mg/ml	17	20	23	22
Control (-)	1 ml	--	--	--	--

\*Halos de Inhibición en mm.

CONTROL POSITIVO ( + ) Ampicilina sal sódica (sigma A 0166)

CONTROL NEGATIVO ( - ) Agua destilada estéril.

### ORGANISMOS PROBLEMA

*Ec* = *Escherichia coli*

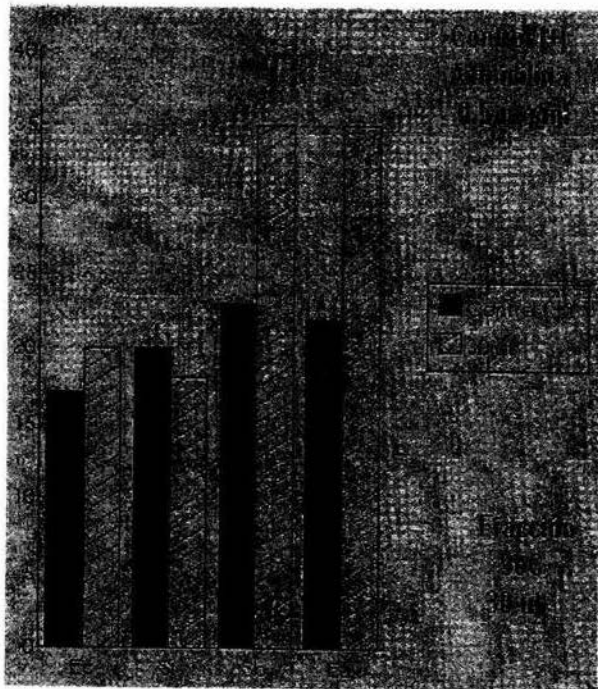
*St* = *Salmonella typhi*

*Sb* = *Shigella boydii*

*Ea* = *Enterobacter agglomerans*

La **Figura 8** Potencial antimicrobiano de la Fracción 9 C mediante la Técnica de Kirby-Bauer. Nos muestra la actividad antimicrobiana de la fracción 9C, en la que se aprecia que superan los halos de inhibición del control positivo al menos para 2 microorganismos.

H  
A  
L  
O  
S  
  
D  
E  
  
I  
N  
H  
B  
I  
C  
I  
O  
N



ORGANISMOS PROBLEMA

*Ec* = *Escherichia coli*

*St* = *Salmonella typhi*

*Sb* = *Shigella boydii*

*Ea* = *Enterobacter agglomerans*

Una vez que determinamos mediante los ensayos de Kirby-Bauer la fracción 9 C como la responsable de la actividad antimicrobiana, se realizó una cromatografía comparativa entre los aceites esenciales y el principio activo (Frac. 9 C) utilizando el mismo sistema reportado en la bibliografía (WAGNER, 1984) a fin de conocer el Rf del principio activo para poder establecer su naturaleza química.

Cromatografía	Sistema	Frac
Placa fina	Tolueno-Acetato de etilo	9 C

De donde se obtuvo para la Fracción 9 C un Rf = 0.31 que coincide con la zona de los Alcoholes Sesquiterpénicos, reportados en la bibliografía anteriormente citada. Con un Punto de Fusión de 87°C.

La elucidación total del compuesto se determinó con base en los resultados de los siguientes análisis:

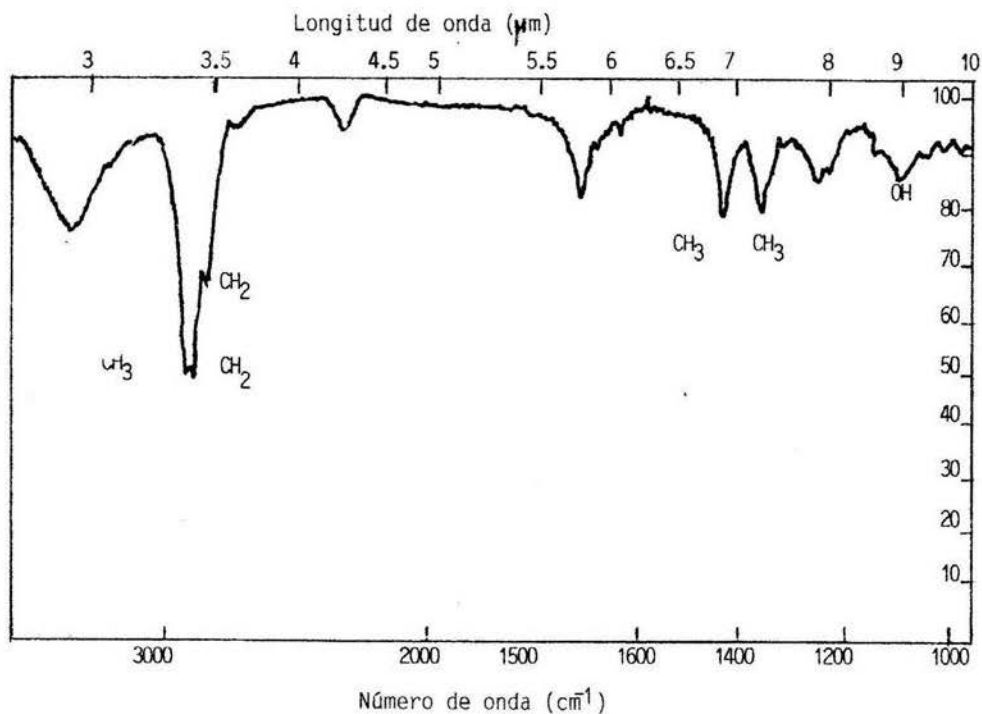
- Espectroscopía de Infrarrojo.
- Resonancia Magnética Nuclear de Protones.
- Resonancia Magnética Nuclear de C<sup>13</sup>.

Donde los espectros se muestran a partir de la siguiente página.

## Análisis de Espectroscopía de Infrarrojo.

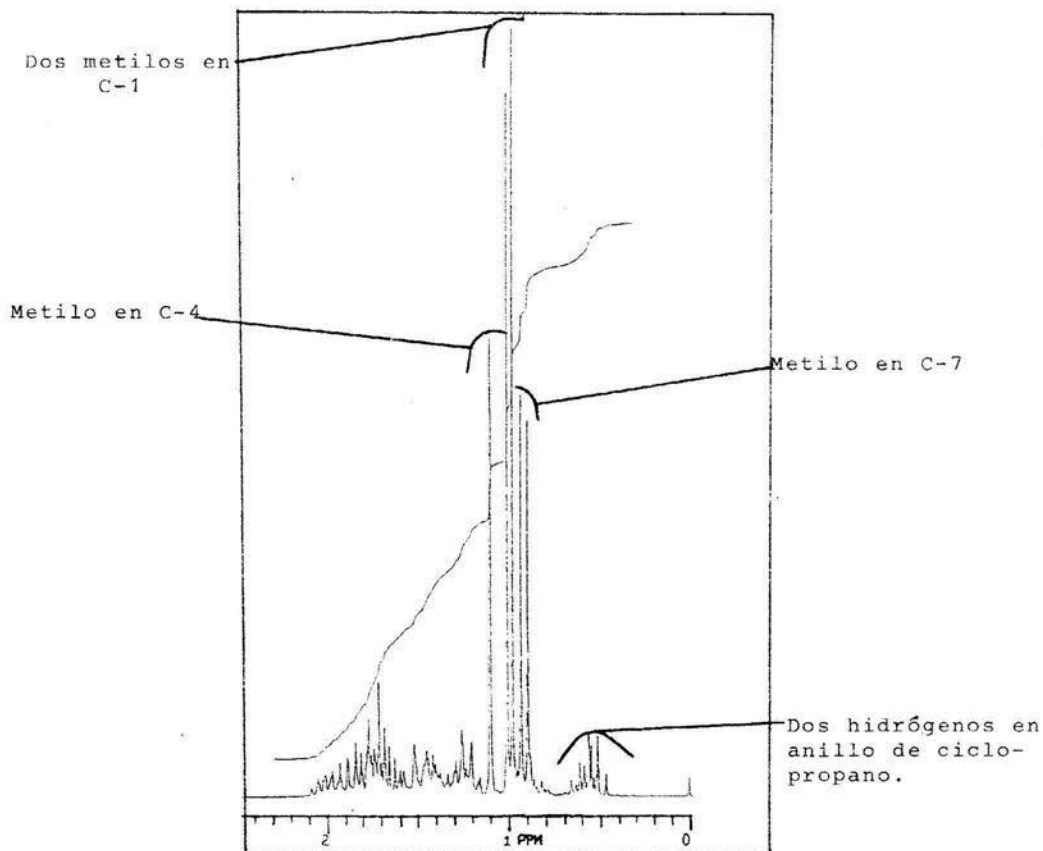
Que nos muestra los principales grupos funcionales de la molécula.

Banda $\text{cm}^{-1}$	Forma	Grupo Funcional
2963; 2922	Doble	$\text{CH}_3$ y $\text{CH}_2$
3630	Banda Ancha	OH
2871	Singular	$\text{CH}_2$
1110	Banda Ancha	OH Junto a un enlace alifático.



# Resonancia Magnética Nuclear de Protones.

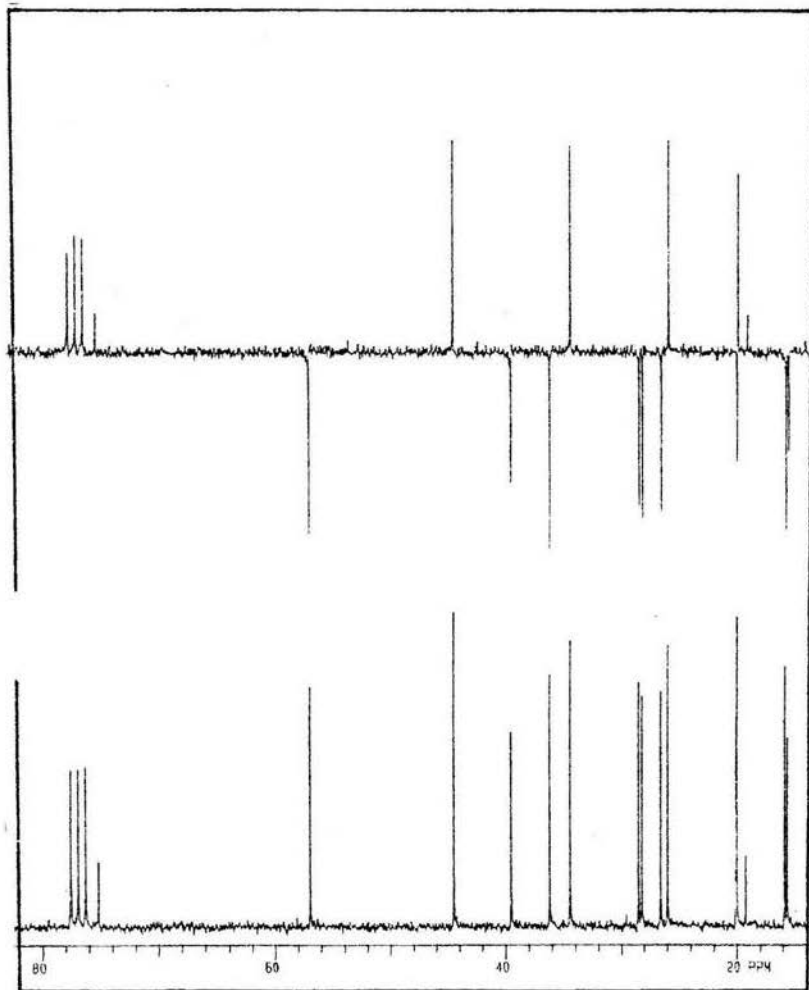
Que nos permite conocer las diferentes señales de resonancia de cada protón ( H' ) para ubicar a cada uno de ellos en la conformación espacial de la molécula.



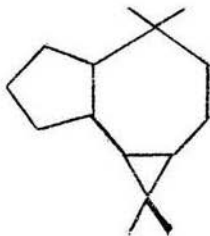


## Resonancia Magnética Nuclear de $C^{13}$

Nos indica las señales de resonancia de cada Carbono que forma parte de la estructura de la molécula.

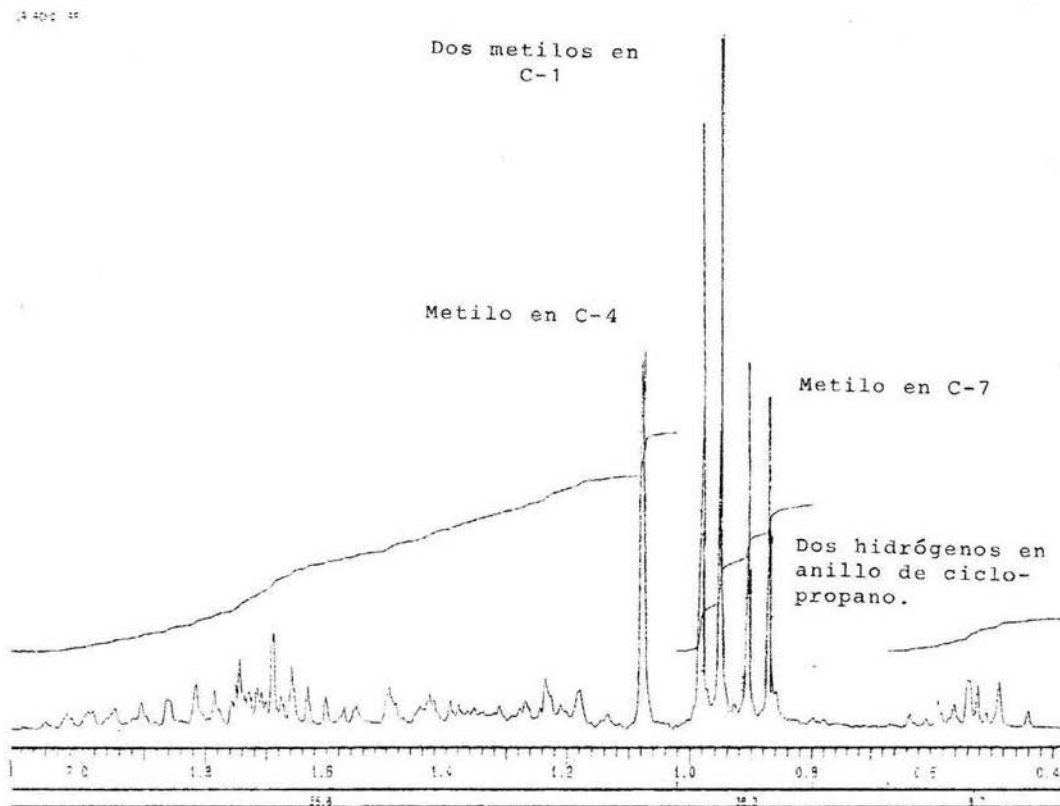


Del análisis anterior se determinó la elucidación total de la estructura de la Fracción 9 C, que corresponde al **GLOBULOL** un alcohol sesquiterpénico, con fórmula condensada  $C_{15}H_{26}O$ , un peso molecular de 222.37 y un punto de fusión a 87°C.

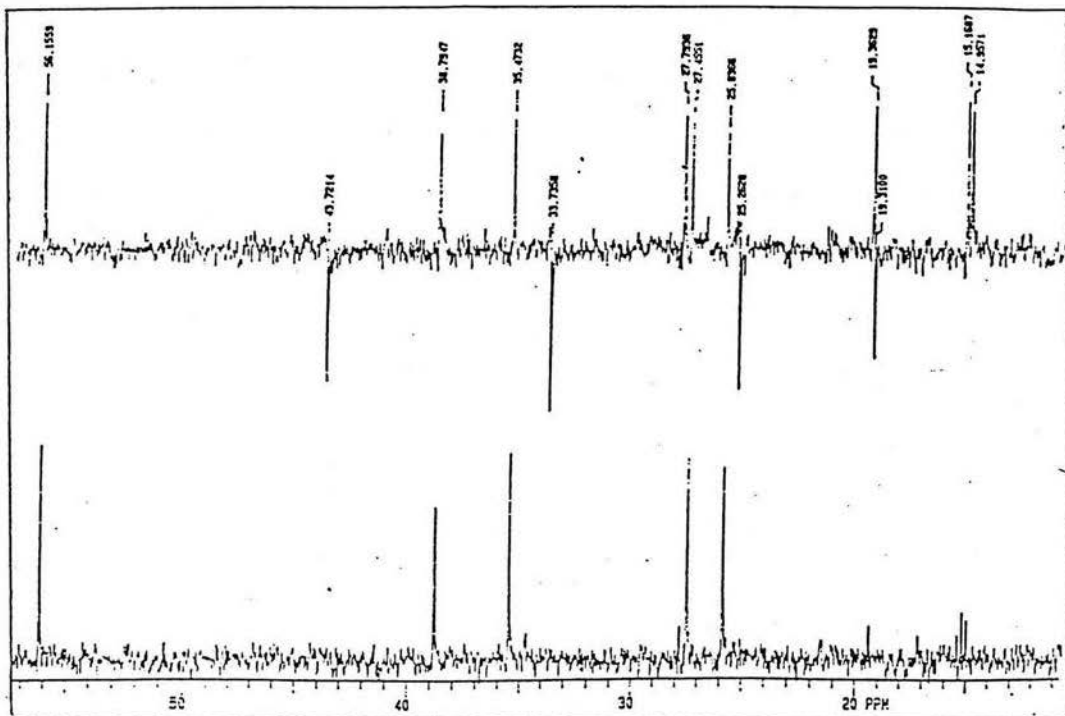


Ademas se procedio a comparar los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protónes y  $C^{13}$  del Globulol obtenido con los espectros del Globulol comercial Marca Fluka, A.G. CH-9470 Buchs. 49070  $C_{15}H_{26}O$  PM 222.37

Resonancia Magnética Nuclear de Protones del Globulol (Fluka)  
Que nos permite conocer las diferentes señales de resonancia  
de cada protón (  $H^+$  ) para ubicar a cada uno de ellos en la  
conformación espacial de la molécula.



Resonancia Magnética Nuclear de  $C^{13}$  del Globulol (Fluka). Nos indica las señales de resonancia de cada Carbono que forma parte de la estructura de la molécula.



En los espectros anteriores se pudo observar que existe coincidencia entre ambos espectros, lo que nos permite afirmar que el compuesto responsable de la actividad antimicrobiana es el Globulol.

## ANALISIS DE RESULTADOS

Con base en desarrollo experimental realizado durante cada fase del proyecto en el cual se observaron las mayores normas en el cuidado de cada una de las fases experimentales, para poder así llegar al siguientes análisis.

En el momento que se realizaron los ensayos de selección escogimos el eucalipto por la presencia de hal de inhibición bien definidos y constantes , esto nos condujo al estudio más completo de la planta en la que encontramos una amplia referencia en el uso de las infusiones de las hojas para el tratamiento de enfermedades de las vias respiratorias, pero no se encontró reportes o datos definitivos y concluyentes en trabajos experimentales o de compuestos identificados para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales de origen infeccioso en especial fiebre tifoidea y cólera.

### ANALISIS MICROBIOLÓGICO:

De esta primera aproximación, se confirma en los ensayos preliminares de selección, la actividad antimicrobiana del extracto acuoso a tres diferentes concentraciones, en forma semicuantitativa por el método de Kirby-Bauer: Cuadro 1, en el cual se puede apreciar que a la concentración más alta de

150 mg/ml se obtuvieron halos de inhibición muy parecidos al control positivo para *S. boydii* y *E. agglomerans* con lo que podemos observar en este momento dos situaciones muy particulares: 1) Se comprueba en forma cualitativa la actividad antimicrobiana del extracto acuoso (Licor madre) y 2) Los halos de inhibición para el control positivo son muy homogéneos para las 4 bacterias, pero en el caso del extracto acuoso se puede apreciar una mayor zona de inhibición para *Shigella boydii* y *Enterobacter agglomerans* con lo que podemos sugerir que el extracto no presenta a este nivel la misma capacidad de inhibición, que el control positivo.

Sin embargo, se tiene la certeza de la actividad antimicrobiana de *Eucalyptus globulus* con base en que se probó el extracto acuoso total con los que se obtuvieron resultados positivos.

En los resultados del Cuadro 2 en que se repitió el bioensayo con el extracto acuoso reposado 48 horas, se pudo observar que no hubo halos de inhibición en ninguna de las 4 bacterias y se planteó en ese momento dos hipótesis alternativas:

hipótesis 1) Se trata de un compuesto fotosensible, o

hipótesis 2) Se trata de un compuesto volátil.

Se procedió a corroborar la primer hipótesis y con los resultados del Cuadro 3 en que se evaluó el Extracto Acuoso en condiciones de oscuridad, se confirman los primeros resultados con halos de inhibición parecidos a los del

control positivo, solo restó repetir los bioensayos con el extracto reposado 48 horas, para poder confirmar completamente la primera de nuestras hipótesis.

En los Resultados del Cuadro 4 se da por descartada la primer hipótesis ya que no se obtuvieron halos de inhibición en ninguno de los microorganismos, con lo que se comprobó parcialmente que no se trata de un compuesto con sensibilidad a la luz, puesto que se cuidó con especial atención cada una de las fases del desarrollo experimental para no cometer ningún error de procedimiento, por lo que se evaluó la segunda hipótesis alternativa y definir si se trata o no de un compuesto volátil.

En los resultados del Cuadro 6 se evaluó la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales a tres diferentes concentraciones y se puede observar que hay actividad antimicrobiana a todas las concentraciones: Con 25  $\mu\text{l}$  se tienen halos de inhibición un poco inferiores a los del control positivo (0.5 mg/ml de Ampicilina sal sódica), con 50  $\mu\text{l}$  se tienen halos de inhibición muy superiores a los del control positivo y con 100  $\mu\text{l}$  se logró inhibir completamente el desarrollo de todas las bacterias.

En el caso del control positivo se aprecia gran homogeneidad en cuanto al diámetro del halo de inhibición nuevamente para las 5 bacterias; y para los aceites esenciales existe gran diferencia en los diámetros de los halos de inhibición en la concentración de 50  $\mu\text{l}$  para las 5



bacterias, y apoyándonos en estos resultados podemos afirmar que hay diferente sensibilidad entre los microorganismos frente a los aceites esenciales. Donde *Vibrio cholerae* fue la más sensible con un diámetro en el halo de inhibición de 57 mm, por su parte *Salmonella typhi* fue la menos sensible con un halo de inhibición de solo 25 mm, y con una sensibilidad intermedia entre estos dos microorganismos se encuentran *Escherichia coli*, *Shigela boydii* y *Enterobacter agglomerans* con un halo de inhibición entre los 40 mm.

De estos resultados se comprueba en forma positiva la segunda hipótesis alternativa y no deja duda alguna de que el principio activo se encuentra en los aceites esenciales. Por otro lado, ahora es importante conocer en forma cuantitativa la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales por varias razones: A) Determinar si se trata de un efecto bacteriostático o un efecto bactericida, B) Conocer la relación entre las dosis de los aceites esenciales y la producción de inactivación de las células bacterianas.

Los resultados del Cuadro 7, se muestran los valores de la cantidad mínima del aceite esencial que se debe emplear para inhibir el crecimiento de la población bacteriana ensayada, bajo condiciones de laboratorio, donde ahora se puede observar que la bacteria con mayor sensibilidad es *Shigela boydii* seguida de *Vibrio cholerae* y la que mostró mayor resistencia fue *Enterobacter agglomerans*.

Con los resultados del Cuadro 8 se observa un efecto bactericida muy alto para *Shigella boydii* y *Vibrio cholerae*,

es decir se necesita de muy poca cantidad del aceite esencial (5  $\mu\text{l/ml}$ ) para lograr matar completamente a toda la población bacteriana. En el caso de las colonias bacterianas que mostraron mayor resistencia con respecto a las demás fue *Enterobacter agglomerans* ya que se requirió de mayor cantidad (26  $\mu\text{l/ml}$ ) para lograr el efecto bactericida.

Como ya se sabe que el efecto de los aceites esenciales es letal para los microorganismos, es conveniente conocer ahora la relación entre la dosis del antimicrobiano y la población bacteriana: Curva letal, donde los resultados que aparecen en la Figura 7 nos permite apreciar que en un máximo de 5 horas la población bacteriana de *Escherichia coli* ha sido eliminada completamente, así mismo, esta relación permite afirmar que se trata de una curva de impacto múltiple debido a que se puede trazar en ella más de una pendiente, por lo que existe diferencia de velocidad en el decaimiento poblacional bacteriano. En este momento la diferencia se puede explicar en base a la siguiente hipótesis:

Se conoce que la familia de las **enterobacteriáceas** es un grupo con gran plasticidad génica, lo que se traduce en una gran heterogeneidad en la susceptibilidad a los antimicrobianos y lo que se puede reflejar en la curva es que en Tiempo 1, se eliminaron a las bacterias más sensibles al antimicrobiano y del Tiempo 2 al 5 se eliminaron las colonias bacterianas más resistentes, debido a que existe diferente susceptibilidad a nivel de diferentes grupos químicos que actúan como blanco en donde se fija el antimicrobiano para

producir la muerte celular y como la acción se produce al azar, los que presenten un blanco de mayor tamaño son los que se inactivan primero, dando una mayor inclinación a la curva y después los que presentan un blanco de menor tamaño donde la inclinación es menor, y permite ver que el aceite es altamente tóxico para las bacterias ya que tiene efecto en más de un sitio de acción, aunque en este momento no se puede generalizar con todos los fundamentos el hecho de que sea una curva de impacto múltiple para todos los microorganismos, porque solo se evaluó en *Escherichia coli* debido a que se trata de la bacteria más representativa del grupo. Por otro lado, en base al C.M.B. que se obtuvo para todos los microorganismos problema, se puede afirmar que el compuesto responsable tiene un efecto bactericida, debido a que el efecto que causa sobre las células es irreversible (DAVIS, 1984), ya que al momento de resembrar las colonias que estuvieron en contacto con los aceites esenciales, no se demostró crecimiento.

#### ANÁLISIS QUÍMICO:

Utilizando las técnicas de rutina en el aislamiento y separación del principio activo, como fueron la cromatografía de placa fina con la que se encontró una mezcla no polar de solventes orgánicos como son benceno y eter etílico y que son básicos en la separación de grupos hidrofóbicos como lo son los aceites y grasas. De esta separación resultaron 8

fracciones, a las que se les determinó el Rf a cada una de ellas y se rastreó el principio activo evaluando el potencial antimicrobiano en cada etapa de la purificación. Hasta lograr la pureza total del principio activo en la Fracción 9 C, la que cristalizó al evaporarse los solventes y con estos cristales se realizó el análisis en un Espectrofotómetro Infrarrojo donde se encontró una banda ancha a  $3630\text{ cm}^{-1}$  que corresponde al grupo funcional Alcohol, hay además un doble pico a  $2963\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a un grupo  $\text{CH}_3$ .

Por último a  $2922\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a un  $\text{CH}_2$ . Por otro lado tenemos que el Rf de la Fracción 9C coincide con la banda Número 3 de la cromatografía de los aceites esenciales que corresponde a la zona de los alcoholes terpénicos, con los resultados de la RMN  $\text{H}^+$  que nos permite observar que se trata de un compuesto cíclico y del análisis de RMN  $\text{C}^{13}$  se define una estructura con 15 carbonos, con base en lo anterior se determinó que el principio responsable de la actividad antimicrobiana es el **globulol**.

## CONCLUSIONES:

1. Con los resultados anteriores se puede afirmar que los aceites esenciales de las hojas del eucalipto tienen efectos bactericidas.
2. Se comprueba experimentalmente la efectividad en el uso de esta planta para el tratamiento de las enfermedades infecciosas del sistema digestivo.
3. La bacteria más susceptible frente a los aceites esenciales fue *Vibrio cholerae*.
4. Los datos de la Curva Letal indican que el aceite tiene toxicidad a varios niveles dentro de la célula bacteriana, lo que se define como un efecto de impacto múltiple para *Escherichia coli*.
5. El principio activo responsable de la actividad antimicrobiana es el Globulol.
6. De esta evaluación queda abierta la posibilidad de realizar estudios farmacológicos y químicos que permitan conocer el alcance del Globulol en la terapéutica moderna y se puedan aprovechar al máximo las propiedades bactericidas del mismo contra enfermedades que siguen causando grandes problemas en nuestro país como lo es el cólera.

## BIBLIOGRAFIA

- Barberan F.T. & San Martín, E.I. (1990) "*Helichrysum decumbens* Derivados de Floroglucinol y Acetofenona" *Phytochem.* Vol. 30 N° 10
- Barley, H. (1977) "Manual of cultivated Plants III" Edit. Mc Millan Publising U.S.A.
- Boakye-Yiadom, K., et al (1977). "Antimicrobial properties of some West African medicinal plants IV. Antimicrobial activity of xylopic acid and other constituents of the fruit of *Xylopic acid* (*Annonaceae*)". *Lloydia* 40 (6): 543-4.
- Cabrera, L.G. (1980). "Plantas Curativas de México" Edit. Cicerón, México D.F.
- Caballito, R. & Bailey, J. (1944). "An antibacterial principle of garlic *Allium sativum*" *J. Am. Chem. Soc.* 66:1950
- Davis, B.D. & Dulbecco, R. (1984) "Tratado de Microbiología" Edit. Salvat, 3ª ed Barcelona España.
- Divo, A. (1990) "Microbiología Médica" Edit. Interamericana, Mc Graw Hill 4ª ed México.
- Domínguez, X.A., Martínez, A. (1978). "Métodos de Investigación Fitoquímica" Edit. Limusa. México D.F.
- Fukui, M. & Koshimizu, K. (1978) "Antimicrobial activity of *Chamaecyparis pisifera*" *Agr. Biol. Chem. Tokio*; 42:1419
- Garrod, L.P. & Lambert, H.P. (1985) "Antibiótico y Quimioterapia" Edit. Salvat, 5ª ed Barcelona España.
- Hammerschmidt, F.J. & Clark, A.M. (1993) "*Jasonia candicans* Intermediol comprises" *Planta Med.* 59

- Hernández, F. (1942) "Historia de las plantas de la Nueva España" Vol. 1 Anales del Inst. de Biol. UNAM México, D.F.
- Husfford, C.D. & Lasswell, W.L. (1978) "Antimicrobial activity of Uvaretina" J. Nat. Products 40:384
- INEGI, (1992) "Estadísticas Demográficas, Cuaderno de la Población 3 " México D.F.
- Koneman, W.K. & Allen, S.D. (1985) "Diagnóstico Microbiológico" Edit. Médica Panamericana. México, D.F.
- Kumate, Jesús. (1981) "Antibiótico y Quimioterapia" Edit. Francisco Méndez Hernández. México D.F.
- Lennette, E.H. (1987) " Manual de Microbiología Clínica" Edit. Médica Panamericana, 4ª ed Buenos Aires Argentina.
- Lordaine, A. & Smith, A. (1980) "Fundamentos de Microbiología" Edit. EUNSA 8ª ed Barcelona, España.
- Martínez, M. (1969) "Las Plantas Medicinales de México" Edit. Botas, 5ª ed México, D.F.
- Me , T. & Inazumi, A. (1991) "*Piper sarmentosum* phenylpro- id" Phytochem. Vol. 30 N° 10
- Mitscher, L.A. et al (1978) "Structure of Glabrol an antimicrobial of *Glycyrrhiza glabra*" Heterocycles 9:1953
- Quer, R.F. (1992) "Plantas Medicinales, Dioscorides Renovado" Edit. Labor S.A. Barcelona España.
- Raun, H. & Brimer, L. (1988) "*Plantago major* phenil propanoid glycoside" Phytochem. Vol. 27 N° 11

Seegal, H. & Holden, B. (1945) "An antibacterial principle of *Anemona pulsatilla*" Science 101:413

Sepúlveda, M.T. (1988) "La medicina entre los Purépechas Prehispánicos" Edit. Inst. de Invest. Ant. UNAM México, D.F.

Stanier, R.Y. & Adelberg, E.A. (1985) "Microbiología" Edit. Reverté 4ª ed Barcelona, España.

Thomas, O.O. (1989) "*Tanacetum cilicium* aceite esencial" Fitoterapia Vol. LX N° 2

Trease, G.E. & Evans, W. (1987) "Tratado de Farmacología" Edit. Interamericana México, D.F.

Tripathi, V.D. & Agarwal, S. (1978) "Structure of Atylosol a new antibacterial of *Atylosa trinervia*" Phytochem. 17:2001

Verpoorte, R. et al (1981) "Medicinal Plants of Suriname I Antimicrobial activity of some medicinal plants" J. Ethnopharm. 5 pp 221-26.

Wagner, H. & Blatt, S. (1984) "Plant Drug Analysis" Edit. Springer-Verlag, Germany.

Waskman, S.A. & Lechevalier, H.H. (1962) "Antibiotics of Actinomycetes" in "The actinomycetes" Vol. III

Weston, R.J. (1984) "Composition of essential oil from leaves of *Eucalyptus delegatensis*" Phytochem. Vol. 23 N° 9

William, A.R. & Thomson, M.D. (1978) "Healing Plants, A modern herbal" Edit. Mc Graw Hill España.

Wn, N. & Beel, J.L. (1977) "Structure of Thalidozine, antimicrobial of *Thalictrum podocarpum*" J. Nat. Products. 40:384



Yashphe, J. et al (1979) "Antimicrobial activity of Santolinol a new terpene of *Artemisia herba-alba*" J. Pharm. Sci. 68:924