



11661  
1  
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN

ACTIVIDAD ANTI-VIBRIO *CHOLERA*E  
DE DOS PLANTAS UTILIZADAS EN LA  
MEDICINA TRADICIONAL PUREPECHA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS**  
(MICROBIOLOGIA)

P R E S E N T A  
**JOSE GUILLERMO AVILA ACEVEDO**

ASESOR: M. EN C. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES-CUAUTITLAN

COORDINACION GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CARTA DE VOTOS APROBATORIOS

Coordinación General de Estudios de Posgrado  
FES - Cuautitlán  
Presente.

Por medio de la presente nos permitimos comunicar a usted que revisamos la tesis titulada "ACTIVIDAD ANTI-VIBRIO CHOLERAE DE DOS PLANTAS UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL PUREPECHA"

que presenta el (la) alumno (a) JOSE GUILLERMO AVILA ACEVEDO

con Núm. de cuenta 7602133-0 N° Exp. 77819

para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGIA)

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el Examen de Grado correspondiente, otorgamos el voto aprobatorio.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli a 26 de junio de 1996

NOMBRE DE LOS SINODALES

PRESIDENTE: DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

VOCAL: M.C. IGNACIO PEÑALOZA CASTRO

SECRETARIO M.C. CLARA INES ALVAREZ MANRIQUE

1er. SUPL. M.C. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

2do. SUPL. M.C. STELLA MARIS REGINENSI RIVERA

*Abel Carrasco*  
*Ignacio Peñaloza Castro*  
*Clara Ines Alvarez Manrique*  
*Susana E. Mendoza Elvira*  
*Stella Maris Reginensi Rivera*



A mis escuelas, FES Cuautitlán y ENEP Iztacala, ambas de la gloriosa UNAM.

A mis mujeres, Lucy, Betsy y Belem:

por estos primeros ocho años de soñar juntos.

A mi amigo José Luis:

"Nadie jamás  
vió amigos más unidos que esos dos  
que a un tiempo descubrieron  
el fuego del licor, el brillo del dinero,  
el automóvil, el cine y la mujer"  
J.M.S.

A Ignacio Peñalosa, por todo el apoyo.

Excelente jefe, aunque mejor amigo.

Al Dr. Alfonso Romo, por su enseñanza.

"Prefiero el tiempo al oro,  
la vida al sueño,  
el perro al collar,  
las nueces al ruido,  
y al sabio por conocer  
que a los locos conocidos".  
J.M.S.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la ENEP Iztacala. El análisis químico se llevó a cabo en el Instituto de Química de la UNAM, con la asesoría del Dr. Alfonso Romo de Vivar.

Agradezco a José Luis Muñoz por su ayuda en las críticas del estilo y en la redacción final del escrito, así como a la Sra. Alma Padilla por su apoyo en el mecanografiado de este trabajo; a César M. Flores por su valiosa ayuda en la interpretación de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear.

Y a la Organización de Médicos Indígenas Purépecha (OMIP) de la bella región de Pátzcuaro, en especial a José Guadalupe Norberto por la enseñanza de la herbolaria.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
ANTECEDENTES.....	7
<i>VIBRIO CHOLERAE</i> .....	7
EL COLERA EN MEXICO.....	9
ANTIMICROBIANOS.....	11
RESISTENCIA BACTERIANA A LAS DROGAS ANTIMICROBIANAS.....	14
ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL.....	22
MECANISMOS DE ACCION DE COMPUESTOS BACTERICIDAS DE ORIGEN VEGETAL.....	28
LOS PUREPECHA.....	32
DESCRIPCION BOTANICA DE LAS PLANTAS ESTUDIADAS.....	37
OBJETIVO GENERAL.....	47
OBJETIVOS PARTICULARES.....	48
DIAGRAMA DE FLUJO.....	49
MATERIAL Y METODOS.....	50
I. ESTUDIO ETNOBOTANICO.....	50
II. COLECTA PRIMARIA.....	51
III. IDENTIFICACION.....	52
IV. BIOENSAYOS PRELIMINARES.....	52
V. EVALUACION CUANTITATIVA.....	53
VI. AISLAMIENTO Y ELUCIDACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.....	54

RESULTADOS.....	55
I. INVESTIGACION DE CAMPO.....	55
II. BIOENSAYOS PRELIMINARES.....	56
III. ACTIVIDAD ANTI- <i>VIBRIO CHOLERAE</i> DE LOS ACEITES ESENCIALES...	62
IV. AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS.....	66
V. ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA.....	71
VI. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PRINCIPIO ACTIVO AISLADO.....	82
VII. CUANTIFICACION DE LA CONCENTRACION DEL PRINCIPIO ACTIVO AISLADO DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	87
DISCUSION.....	89
CONCLUSIONES.....	93
APENDICE.....	94
I. CUANTIFICACION DE SOLIDOS SOLUBLES.....	94
II. METODO DE DIFUSION EN AGAR O DE KIRBY-BAUER.....	95
III. DETERMINACION DE CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) Y DE CONCENTRACION BACTERICIDA MEDIA (CBM).....	98
IV. CURVA LETAL.....	100
V. OBTENCION DE ACEITES ESENCIALES.....	101
BIBLIOGRAFIA.....	103



## RESUMEN

El uso de las plantas medicinales es una práctica arraigada dentro de la medicina tradicional de nuestro país. Los purépecha son un grupo étnico que utiliza remedios herbales para el tratamiento de diversas enfermedades. El presente trabajo de investigación, consistió en evaluar la actividad biológica, específicamente el efecto anti-*Vibrio cholerae* de las plantas que esta etnia utiliza para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales de probable origen infeccioso. Los resultados indicaron que las plantas *Lepechinia caulescens* y *Tanacetum parthenium* presentaron actividad antibacteriana. Este efecto biológico se localizó en los aceites esenciales producidos por ambos vegetales. Mediante técnicas cromatográficas y evaluación microbiológica se logró aislar un compuesto activo de cada aceite esencial. Los estudios espectroscópicos indicaron que el alcanfor (1, 7, 7-trimetil bicyclo- 2.2.1 -heptan-2-ona) es uno de los principios activos que cada planta biosintetiza como un componente de sus aceites volátiles y que presenta actividad bactericida sobre *Vibrio cholerae*.

## INTRODUCCION

La población mundial estimada en la década de los ochenta fue alrededor de 4,790 millones de personas, de éstas, el 75 % habita en países en vías de desarrollo. Las proyecciones demográficas indican que la población mundial será de aproximadamente 7,600 millones en el año 2,020 (Wijesekera, 1991).

El consumo de fármacos a nivel mundial (promedio anual) durante la década de los ochenta fue del orden de 88,200 millones de dólares, de los cuales, cerca del 80 % del consumo corresponde a los países desarrollados (Anon, 1986).

Varias estimaciones indican que alrededor del 70 al 80 % de la población de los países subdesarrollados dependen parcial o completamente de las plantas medicinales, lo cual se traduce a que más de la mitad de la población mundial las usa. Las causas que se atribuyen a la continua popularidad de los remedios herbales, particularmente en las regiones rurales de los países en desarrollo son las siguientes: 1. La eficacia real de estos remedios comparada con las drogas modernas, 2. La escasa práctica de la medicina moderna en zonas rurales, 3. La poca disponibilidad de fármacos de patente en estas zonas, 4. Razones socioculturales y tradicionales particularmente en las viejas culturas de Asia, el mundo árabe y latinoamérica (Anand & Nithyawand, 1984).

Después de varios siglos de uso empírico de preparaciones herbales, los primeros aislamientos de principios activos (alcaloides, como la morfina, la estriquina, la quinina, etc.) en el siglo XIX marcaron una nueva era en el uso de las plantas medicinales y con esto inició el estudio de la química de los vegetales. Este interés declinó debido al tremendo desarrollo de la química de síntesis y al de la fermentación microbiana. En este periodo fue poco estudiado el campo de los

metabolitos secundarios de plantas medicinales desde el punto de vista fitoquímico. Sin embargo, en la última década, ha crecido considerablemente el interés en el estudio de las drogas obtenidas de las plantas. Algunas consideraciones ecológicas y el incremento de la demanda de terapias no clásicas pueden ser algunas de las razones de este renovado interés. De igual manera, la eficacia de un número importante de preparaciones fitofarmacéuticas, como ginkgo, el ajo o la valeriana ha sido demostrada mediante los mismos estudios científicos aplicados a otras drogas. Grandes compañías farmacéuticas han demostrado un gran interés en las plantas superiores como una fuente de nuevas y prometedoras estructuras (Príncipe, 1989). Farnsworth (1985) hizo una recopilación del papel que han jugado las plantas en el mundo moderno como fuentes de drogas y en su estudio concluye que cerca del 25 % de los fármacos usados por el primer mundo contienen principios activos extraídos de las plantas superiores y esta situación se ha conservado durante los últimos 25 años.

Existen varias razones para continuar el estudio de las plantas medicinales. En primer lugar, solo una pequeña fracción de especies se ha estudiado adecuadamente, en segundo lugar, la tradición del uso de ellas en algunas regiones se está perdiendo y con ello también se olvida el conocimiento de la flora que pudiera ser útil como punto de partida para iniciar nuevas investigaciones. Por último, con la degradación del medio ambiente, muchas especies están desapareciendo sin haber sido estudiadas desde el punto de vista botánico y menos químico.

Las plantas medicinales son usadas básicamente en dos formas: (a). Como mezclas complejas que contienen un amplio número de constituyentes (las infusiones, aceites esenciales, tinturas, extractos, etc.) y (b). En forma químicamente pura, definidos como principios activos. Los compuestos puros son empleados cuando éstos exhiben fuerte actividad específica y/o tienen pequeño índice terapéutico, requiriendo de precisión y reproducibilidad cuando se dosifica. Por otra parte, el uso de mezclas complejas es apropiado para plantas que exhiben una suave o baja especificidad farmacológica o en su defecto cuando los componentes (principios activos) no se conocen. Estas preparaciones fitofarmacéuticas son muy populares en países

con una fuerte tradición herbolaria y con disposiciones legales que facilitan el registro de éstas (Hamburger & Hostettman, 1991).

En nuestro país existen diferentes etnias que habitan las zonas rurales. Todas ellas utilizan la herbolaria, así como otras prácticas para la curación de sus enfermedades; una de estas etnias es la purépecha que habita en el Estado de Michoacán. Los purépecha poseen conocimientos de medicina herbolaria que se remonta a la época precortesiana, aunque también mucho de este conocimiento lo adoptaron a partir de las enseñanzas de los misioneros franciscanos que habitaron dicho lugar. El presente trabajo trata de explicar la actividad antimicrobiana específicamente contra *Vibrio cholerae*, con base en un estudio químico microbiológico de algunas de las plantas que ellos utilizan contra infecciones gastrointestinales.

## ANTECEDENTES

### *Vibrio cholerae*

Durante 1854, Pacini descubrió a *Vibrio cholerae* como una bacteria Gram-negativa anaerobia facultativa, en forma de bastón, en ocasiones ligeramente encorvada y con un flagelo polar, a la que se llamó en algún tiempo "vibrio coma". Es oxidasa positivo y pertenece a la familia II Vibrionaceae, en la cual se incluyen los géneros: *Vibrio*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* y *Photobacterium* (Bauman & Shubert, 1984).

El género *Vibrio* comprende varias especies, entre las que se incluye *Vibrio cholerae*, agente causal del cólera; pertenece al grupo O1, que a su vez se divide en tres serotipos o serovares: Ogawa, Inaba e Hikojima. Estas se reagrupan en los biotipos Clásico y El Tor.

La especie tipo *Vibrio cholerae* O1, agente que desarrolla el cólera, es patógena por la producción de una enterotoxina sensible al calor, que provoca los síntomas clásicos de esta enfermedad (Holmgren, 1982).

Generalmente se denomina al cólera como cólera asiático o cólera clásico; sin embargo, en 1906 se aisló una cepa hemolítica para sangre de ovinos y caprinos de seis peregrinos estacionados en El Tor durante su peregrinación hacia La Meca. A partir de la última pandemia desde los años 60's, se ha seguido aislando este tipo de *Vibrio* y en la actualidad se acepta que *V. cholerae* se divide en los biotipos ya señalados, llamados Clásico y El Tor. Las pruebas que se usan para separarlos son hemólisis en sangre de borrego, aglutinación de

eritrocitos de pollo, sensibilidad a 50 unidades internacionales (UI) de polimixina en medio de Muller-Hinton y patrón de lisis a los fagos de Mukerjee (Barret & Blake, 1991).

En cuanto a la tipificación serológica, los antígenos flagelares "H" son homogéneos y comunes a todos los vibrios, y existen más de 70 variedades de antígenos somáticos. En la práctica solo se utiliza el antisuero somático para el grupo O1. Después de identificar O1, se subdivide en tres serotipos o serovares, que son: Inaba (antígenos A y C), Ogawa (antígenos A y B) e Hikojima (antígenos A, B y C), este último con pocos aislamientos (Giono, 1991).

Mukerjee y colaboradores desarrollaron dos esquemas de fagotipificación para los biotipos clásico y El Tor de *Vibrio cholerae*; esto permite identificar con un alto grado de precisión las cepas. Propusieron cinco fagotipos principales de *Vibrio cholerae* (biotipo clásico), con base en el patrón de sensibilidad dado por cuatro grupos de vibriófagos aislados en las heces de pacientes con cólera. Hasta 1974, se obtuvo un esquema de fagotipificación independiente para los vibrios no O1. Nicolle, Gallut y colaboradores establecieron que el patrón de fagotipificación del biotipo clásico difiere del correspondiente a El Tor, siendo diferentes estos dos del patrón dado por los vibrios no O1. El esquema de fagotipificación que se emplea actualmente fue propuesto por Basu y Mukerjee en 1968 y consta de cinco grupos de fagos, de los cuales se obtienen fagotipos para *Vibrio cholerae* El Tor. (Giono, 1991).

Las cepas de *Vibrio cholerae* O1 producen una toxina colérica cuya acción sobre la mucosa del intestino delgado es responsable de la diarrea característica de la enfermedad. La toxina colérica es una proteína oligomérica (84 kDa) compuesta de una subunidad A (21 kDa), una subunidad A<sub>2</sub> (7 kDa) y cinco subunidades B (10 kDa). Las subunidades B son responsables de la fijación de la toxina al receptor GM<sub>1</sub> en la membrana celular del epitelio del intestino delgado. La subunidad A<sub>1</sub> activa el complejo enzimático adenilato ciclasa, incrementando los niveles intracelulares del AMPc que provocan la hipersecreción de sales y agua, dando como consecuencia una diarrea isotónica con respecto al plasma; es decir, con concentraciones de Cl<sup>-</sup> y Na<sup>+</sup> ligeramente inferiores a las del plasma. La concentración de NaHCO<sub>3</sub> es

aproximadamente el doble de la del plasma y la concentración de K<sup>+</sup> es 3 a 5 veces mayor que la plasmática.

Todos los serotipos producen enterotoxinas similares y el cuadro clínico es semejante. Algunos vibrios producen toxinas citolíticas, hemolisinas o bien tienen capacidad invasiva como la descrita para *V. vulnificus*.

Aunque la susceptibilidad es variable, la aclorhidria gástrica aumenta el riesgo de la enfermedad. El cólera clínico generalmente está limitado a los grupos socioeconómicos más bajos. Aún en epidemias graves la tasa de ataque rara vez sobrepasa el 2%. La infección provoca una respuesta serológica significativa de anticuerpos aglutinantes, vibriocidas y antitóxicos y una mayor resistencia a la reinfección que es más duradera contra el serotipo homólogo. En las zonas endémicas, la mayoría de las personas adquieren anticuerpos al principio de la edad adulta. La inmunidad activa parcial a la enfermedad es inducida por vacunas anticólicas existentes pero la protección no dura más de 6 meses y no evita la infección asintomática (INDRE, 1991).

## EL COLERA EN MEXICO

A partir de 1883 se ha documentado la presencia de cólera en México. En esa época su diseminación en toda la República se asoció a los desplazamientos poblacionales provocados por las guerras. La cantidad de muertes provocadas por esta enfermedad llegó a tener mayor relevancia en algunas zonas del país que las provocadas por enfrentamientos armados.

Durante la epidemia de 1850, el cólera ocasionó aproximadamente 200,000 defunciones durante su paso por el territorio nacional. En 1855 reapareció y durante 17 años continuó su transmisión sin interrupción. Fue hasta 1883 cuando se registró el último caso (Bustamante, 1982).

El primer caso confirmado de cólera por *V. cholerae* 01 Inaba El Tor se detectó el 17 de junio de 1991 en un hombre de 68 años, residente del municipio de San Miguel Sultepec, Estado de México. Este evento desencadenó una serie de acciones de control y prevención que permitieron la detección de 27 casos adicionales en la zona, después de investigar cerca de 2,500 viviendas. Una semana después (26 de junio) se identificó la transmisión del cólera en el Valle de Tula, Hidalgo, en un niño de 5 años de edad, lo que inició la transmisión al interior del Estado y afectó a 13 localidades más. En el transcurso de un mes (26 de julio) se reportaron 50 casos en la entidad.

El tercer foco donde se presentó el cólera fue en la zona de la Huasteca con 138 casos. En forma paralela se fueron presentando brotes en Miahuatlán, Puebla y Ciudad Hidalgo, Chiapas, para llegar a un total de 253 casos comunicados en los primeros 43 días de transmisión de cólera en el país. Sólo 23 % de los enfermos fueron hospitalizados y los casos predominaron en el sexo masculino (58 %) y en los grupos de edad mayores de 15 años. A dos meses de reportado el primer caso se identificaron 402 en cinco entidades, de los cuales 20 % requirieron hospitalización y sólo 5 de ellos murieron. En el transcurso de 1991 se observó un incremento en el número de casos hasta el mes de octubre, a partir del cual se notó un descenso importante en la notificación hasta fines de diciembre (Sepúlveda, 1992).

La diseminación a otras entidades del país respondió a la diversidad de vías de comunicación entre las zonas afectadas. La transmisión del cólera avanzó durante 1991 a 17 Estados donde se detectaron 2,690 casos y se reportaron 34 defunciones. En 1992, la transmisión se



diseminó por 29 Estados, reportándose un total de 8,162 casos y 99 defunciones. Los Estados con mayor número de casos fueron Guerrero con 1,539, Campeche (1,282), Yucatán (846), Chiapas (449), Michoacán (390), Tabasco (346), en donde se concentraron 69 % de los casos reportados. Cabe señalar que sólo 22 % de los casos requirieron hospitalización. Sin embargo, en lo que respecta al interior de cada Estado, dicho porcentaje de hospitalización nos habla tanto de la gravedad de los cuadros como del nivel de respuesta por parte de los servicios de atención. Las medidas de control adoptadas permitieron que la letalidad por cólera fuera de 0.9 %.

El grupo de edad más afectado fue el de mayores de 25 años donde se agruparon 59 % de los casos y 70 % de las defunciones. En relación con la distribución por sexo, el padecimiento predominó en el masculino (56 %) (Sepúlveda, 1992).

## ANTIMICROBIANOS

El concepto de qué sustancias derivadas de un microorganismo vivo pueden matar a otro (antibiosis) es casi tan antiguo como la misma ciencia microbiológica. Más aún, la aplicación de la terapéutica antibiótica, sin saber que era tal, es mucho más antigua. Los chinos ya conocían desde hace más de 2,500 años las propiedades terapéuticas de la cáscara enmohecida de la soja aplicada a carbuncos, forúnculos e infecciones similares y usaban este material para tratamientos estándar de estos trastornos. Durante muchos siglos, la literatura médica ha ofrecido descripciones de efectos benéficos, medicamentos preparados con tierra y diversos vegetales, en su mayoría muy probablemente fuente de mohos y bacterias

formadoras de antibióticos, o de sustancias inherentes a la química de las plantas (Castiglioni, 1941). En 1619 aparece el primer registro del tratamiento de la malaria con un extracto de corteza de cinchona; en este caso, el paciente era la mujer del gobernador español de Perú. Otro descubrimiento realizado a partir de la flora sudamericana lo constituyó la eficacia de la raíz de la ipecacuana contra la disenteria amebiana. Hasta los primeros años de este siglo los extractos de esta raíz y en tiempos más recientes los alcaloides, quinina y emetina, derivados de ellos, proporcionaban la única quimioterapia curativa conocida.

Los primeros investigadores que reconocieron las potencialidades clínicas de los microorganismos como agentes terapéuticos fueron Pasteur y Jaubert, que registraron sus observaciones y conjeturas en 1877. Notaron que los bacilos de ántrax crecían rápidamente cuando se inoculaban en orina estéril, pero no se multiplicaban y morían pronto si una de las bacterias "comunes" del aire se introducía en la orina al mismo tiempo. El mismo tipo de experimento en animales produjo resultados similares. Dichos autores comentaron que la vida destruye a la vida entre las especies inferiores, más aún que en los animales y vegetales superiores, y llegaron a la sorprendente conclusión de que los bacilos de ántrax podían administrarse al animal en gran número sin enfermarlo, siempre que se dieran al mismo tiempo bacterias "ordinarias". Declararon que esta observación podía significar una gran promesa para la terapéutica (Moellering, 1990).

En 1881, Tyndall en su obra "Ensayos sobre la materia flotante del aire, en relación con la putrefacción y la infección", estableció que en algunos tubos que contenían una infusión nutritiva con bacterias y que habían sido contaminadas por *Penicillium glaucum* las bacterias perdían su "poder de translación" precipitando en el fondo del tubo. Tyndall interpretó este fenómeno como el impedimento del suministro de oxígeno a las bacterias por la película formada por el hongo. Emmerich en el año de 1878, accidentalmente descubre que un cobayo previamente inyectado con *Streptococcus pyogenes* no padece el cólera al ser inyectado con el cultivo visulento de *Vibrio cholerae*. Debido a esta observación se logra

evitar el ántrax en animales de laboratorio administrando *S. pyogenes* previo al inóculo de *Bacillus anthracis*.

En 1889, Bauchard comunicó que la *Pseudomonas aeruginosa* inhibía el desarrollo del ántrax en el conejo. A principios de este siglo, Bruhl descubre la acción lítica de algunos actinomicetos sobre diversos microorganismos. Poco después, Enumerich y Low establecen la acción protectora de cultivos filtrados concentrados y desprovistos de células, al observar que destruían al *Corynebacterium diphtheriae*, estafilococos, estreptococos, neumococos, gonococos, *Vibria cholerae* y *Shigella dysenteriae* in vivo. Las observaciones de todos los investigadores habían establecido el fenómeno de antibiosis, pero tomó forma real hasta 1928 cuando Sir Alexander Fleming observó la inhibición de crecimiento de bacterias por una colonia de *Penicillium notatum* que actuaba como contaminante dentro de sus cultivos. Fleming en sus publicaciones propuso el posible uso clínico de la sustancia producida en el cultivo de *P. notatum*.

Al estallar la Segunda Guerra Mundial se inicia un programa a gran escala para la producción y ensayo de la sustancia que ahora conocemos como penicilina; asimismo, la industria y las instituciones académicas se dedicaron al estudio de otros antibióticos. Este auge de la investigación dio como resultado el descubrimiento de la estreptomina, aureomicina y cloromicetina, entre otros (Brock, 1978).

En los inicios de la producción de antibióticos, se pensó que éstos no eran más que el resultado de una relación ecológica fundamental (antibiosis) entre organismos competitivos, es decir, un fenómeno opuesto a la simbiosis. Sin embargo, existen varias razones para descartar este punto de vista, puesto que: 1). Los microorganismos capaces de producir antibióticos constituyen tan sólo una mínima parte de la totalidad de la población microbiana que se encuentra en las muestras de suelo, por lo que la producción de estos compuestos no

parece constituir ventaja alguna, desde el punto de vista evolutivo; 2). Las cepas que se encuentran en la naturaleza producen sólo cantidades mínimas de antibióticos; para que la producción sea rentable es necesaria la selección de mutantes producidos por el hombre; 3). La mayoría de los antibióticos se producen sólo después de que se interrumpe el crecimiento, y no durante los procesos competitivos que se dan en la fase de mayor crecimiento (Atlas & Bartha, 1981).

## **RESISTENCIA BACTERIANA A LAS DROGAS ANTIMICROBIANAS**

### **1. RESISTENCIA INTRINSECA Y ADQUIRIDA**

La capacidad de las bacterias para resistir la acción de los agentes antimicrobianos es un problema importante en la microbiología médica. En términos prácticos, se dice que existe resistencia a algún agente antimicrobiano cuando la bacteria no es inhibida a las concentraciones de droga que se pueden administrar a un paciente. La resistencia bacteriana puede clasificarse en dos aspectos: la intrínseca y la adquirida. La resistencia intrínseca se refiere a la insensibilidad natural de la bacteria ante cierta droga y es una característica innata compartida por la mayoría o todos los miembros de una especie. En cuanto a la adquirida, ésta se presenta en ciertas cepas de algunas especies bacterianas que han desarrollado la habilidad para resistir una droga antimicrobiana, la cual normalmente es efectiva contra esa especie y/o especies (Guiney, 1986).

## 2. ASPECTOS GENETICOS DE LA RESISTENCIA MICROBIANA

Existen diferencias genéticas fundamentales entre los mecanismos de resistencia intrínseca y adquirida. La resistencia intrínseca es una propiedad genética estable codificada en el cromosoma. La resistencia adquirida implica un cambio en el DNA de la bacteria que se expresa como una nueva forma fenotípica. Hay dos formas en que la resistencia puede ser adquirida: 1). Por mutación del cromosoma bacteriano ó 2). Por adquisición de nuevas secuencias de DNA que codifiquen para la función de resistencia (Clewell, 1981).

### 2.1). Mutación

Como muchos organismos, las bacterias poseen una compleja maquinaria enzimática para replicar DNA adecuadamente, corregir errores y reparar daños en el cromosoma. Por esto, la frecuencia de mutación de un sólo gen es baja, normalmente alrededor de  $10^{-6}$  y  $10^{-9}$  por generación. Además, muchas mutaciones son silenciosas o deletéreas para la célula, y sólo los cambios en un locus génico específico repercuten en la resistencia para un antibiótico. Algunos antibióticos inhiben procesos bioquímicos esenciales en las células, las mutaciones que confieren resistencia están usualmente limitadas a aquellas que dan como resultado una proteína alterada que es menos susceptible al antibiótico pero que puede llevar a cabo su vital función celular. Esto se debe a que las mutaciones para la resistencia a antibióticos son eventos raros que solo ocurren con ciertos antibióticos, ejemplos de éstos son el ácido nalidixico, la rifampicina y la estreptomycin. En cada uno de estos casos, un simple cambio de un par de bases en el DNA resulta en una proteína alterada, con mucho menos afinidad por un antibiótico, pero con una actividad enzimática normal (Guiney, 1986).

## 2.2). Adquisición de nuevo DNA

El mayor número de casos de resistencia adquirida en bacterias de importancia médica es el resultado de la adquisición de nuevas secuencias de DNA que codifican la función de resistencia. La ventaja obvia de este mecanismo para la célula bacteriana radica en el hecho de que no se requieren cambios en componentes imprescindibles ya que, se adquiere la resistencia a partir de genes en estado preformado. Este mecanismo requiere transferencia genética entre diferentes células bacterianas. Los nuevos genes de resistencia pueden estar integrados en el cromosoma bacteriano y heredarse de manera estable de generación en generación, o también pueden permanecer en un estado extracromosómico en un plásmido bacteriano. Los plásmidos de resistencia a las drogas o plásmidos "R" tienen particular importancia, pues ellos pueden conferir resistencia a varios antibióticos diferentes y también pueden transferirse a otras bacterias.

Los plásmidos bacterianos son moléculas bicatenarias circulares de DNA que usualmente existen físicamente separadas del cromosoma bacteriano. Estas estructuras codifican para varias propiedades de importancia médica, que incluyen cualidades de virulencia, producción de toxinas y resistencia a los antibióticos (Elwell & Shipley, 1980).

Debido al gran uso de antibióticos a partir de los años cincuenta, los plásmidos de resistencia a las drogas se han difundido entre varias especies de bacterias. Del mismo modo que codifican para la resistencia a las drogas, estos plásmidos tienen información genética para su replicación, incompatibilidad y transferencia por conjugación.

### 2.2.1. Transferencia de genes de resistencia en bacterias.

Los genes de resistencia a drogas son transferidos de una célula a otra por alguno de los tres sistemas principales de intercambio genético en las bacterias: conjugación, transducción y transformación. La transferencia puede ser de genes del cromosoma o de plásmidos por algún mecanismo de los antes citados, pero sólo uno de estos mecanismos predomina en una especie bacteriana.

### 2.2.2. Conjugación

La transferencia de DNA entre bacterias por contacto célula-célula es conocido como conjugación. La mayoría de estos sistemas de transferencia son codificados por plásmidos. El proceso de conjugación ha sido extensamente estudiado en bacterias Gram negativas particularmente en *Escherichia coli* (Willets & Skurray, 1980). Las células que contienen el plásmido donante presentan apéndices filamentosos en su superficie llamados pili sexualis que se requieren para la transferencia. Una vez que los pili sexualis entran en contacto con la bacteria receptora se forma un puente sexual por donde se llevará a cabo la transferencia. Sólo una cadena del DNA del plásmido se transfiere a la célula receptora, el DNA monocatenario que en esta fase está presente en las dos células sirve como templado para la síntesis de la cadena complementaria, de esta manera ambas células ya tienen una copia del plásmido. Los plásmidos de múltiple resistencia a las drogas se pueden propagar rápidamente en una población bacteriana. La conjugación también se lleva a cabo en las bacterias Gram positivas, particularmente en estreptococos aunque también en estafilococos (Forbes & Shaberg, 1983).

Se ha descrito un sistema sexual en enterococos donde ciertas cepas receptoras libres de plásmidos producen "feromonas sexuales" que facilitan la adherencia de las células donadoras y receptoras y favorece el proceso de transferencia (Clewel, 1981).

### 2.2.3. Transducción

Ciertos bacteriófagos pueden transferir resistencia antibiótica por transducción, proceso en el cual algunos genes de resistencia de un plásmido o de un cromosoma son incorporados a las partículas del fago e introducidas en otra célula bacteriana durante la infección viral. Algunos fagos pueden realizar la transducción de un plásmido completo de resistencia a los fármacos, siempre y cuando el tamaño de la molécula de DNA no exceda el tamaño de la cápside del fago. La transducción es un mecanismo importante para la propagación de plásmidos conjugantes, particularmente en estafilococos (Novic & Morse, 1967). Es de hacer notar que el rango de hospederos está limitado para la infección por fagos ya que éstos sólo infectan una sola especie o algún género de bacterias, por lo tanto la transducción se lleva a cabo entre bacterias cercanamente relacionadas.

### 2.2.4. Transformación

Algunas bacterias pueden adquirir moléculas de DNA libre del entorno celular e incorporar estas secuencias de DNA a su cromosoma en el proceso llamado transformación. Las bacterias que sufren este proceso y que son importantes desde el punto de vista médico son: *Haemophilus*, *Neisseria* y *Streptococcus pneumoniae*. Las bacterias transformables sufren lisis espontáneas durante el crecimiento, y los genes de la resistencia a los antibióticos del cromosoma pueden ser tomados por miembros sensibles a las drogas de la población. De igual forma que la transducción, la transformación sólo ocurre entre bacterias cercanamente



relacionadas, debido a que el DNA extraño de otras especies no es consumido o es rápidamente degradado en la célula (Guiney, 1986).

### 2.2.5. Transposición

De igual forma que el intercambio genético entre bacterias, muchos genes de resistencia se pueden intercambiar entre diferentes plásmidos y el cromosoma mediante el proceso de transposición (Kleckner, 1981). Un transposón de resistencia a las drogas consiste en uno o más genes de resistencia a antibióticos flanqueado en ambos lados de secuencias directas o inversas de DNA redundante que contiene secuencias de inserción (SI). Los elementos SI regulan el proceso de transposición, en el que el transposón se duplica y las nuevas copias se insertan en un plásmido diferente o en el cromosoma. Este mecanismo hace posible que los genes de resistencia se difundan a plásmidos que tienen diferentes propiedades o al cromosoma si el plásmido de resistencia es inestable en una célula hospedera particular. Por ejemplo, la transposición de un gene de resistencia a partir de un plásmido no conjugante a uno conjugante provoca la fácil diseminación de la resistencia en la población bacteriana. Los transposones son comunes en las poblaciones bacterianas, encontrándose tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas y codifican la resistencia de los más importantes grupos de antibióticos.

### 3. MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE LA RESISTENCIA

Los mecanismos bioquímicos de la resistencia intrínseca y adquirida es similar y puede dividirse en cuatro categorías básicas: a). inactivación de drogas, b). cambio en la permeabilidad, c). alteración del blanco y d). desviación metabólica.

#### a). Inactivación de drogas

Los fármacos son inactivados por enzimas que modifican químicamente al antibiótico de tal manera que ya modificado no logra inhibir a la bacteria. La inactivación es un mecanismo importante de resistencia para tres grupos de antibióticos:  $\beta$ -lactamas, aminoglucósidos y cloramfenicol.

#### b). Cambio en la permeabilidad

El bloqueo de la permeabilidad reduce la cantidad de droga que pueda llegar al sitio blanco de la célula. Las porinas (proteínas de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas) pueden actuar como un tamiz molecular y excluir ciertos antibióticos del espacio periplásmico. La permeabilidad de la membrana externa para un antibiótico varía enormemente en las diferentes bacterias Gram-negativas. En enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*, la membrana externa forma una barrera importante para varios antibióticos (Zimmermann, 1980), mientras que en *Neisseria* la membrana externa es muy permeable. Así pues, las propiedades de la membrana externa son un determinante importante de la

resistencia intrínseca de las bacterias Gram-negativas. En contraste, las bacterias Gram-positivas al carecer de membrana externa, los antibióticos pueden tener libre acceso a la pared y a la membrana celular.

#### **c). Alteración del blanco**

Gran parte de la resistencia intrínseca de las bacterias se debe a la poca afinidad del antibiótico por su sitio blanco, usualmente es una proteína pero otras veces es el RNA o la estructura de la membrana (Zimmermann, 1980).

#### **d). Desviación metabólica**

La resistencia bacteriana a la trimetropina y sulfamidas, incluye cambios en el metabolismo del folato (que es la vía metabólica que inhiben estas drogas). La resistencia bacteriana a la trimetropina mediada por plásmidos se debe a la producción de una nueva dihidrofolato reductasa que es altamente resistente a la inhibición por trimetropina. Estos genes de resistencia se encuentran localizados en transposones y estos a su vez en el cromosoma o de manera aislada. La resistencia a las sulfamidas generalmente se debe a la adquisición de un plásmido que codifica una nueva dihidropteroato sintetasa que es insensible a la inhibición de éstas. Estos genes de resistencia contra sulfamidas también se encuentran de manera frecuente en transposones y están ampliamente distribuidos en las bacterias (Skold & Widh, 1974).

## ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL

Se han realizado numerosas investigaciones sobre este tema y el resultado ha sido la identificación de una gran cantidad de compuestos. No es el objetivo de este capítulo hacer una revisión exhaustiva de los agentes antimicrobianos que se han aislado de plantas, sino de proporcionar una panorámica de los principales grupos de metabolitos secundarios a los que se les atribuye esta actividad.

En el caso de plantas terrestres inferiores como las briofitas (musgos y hepáticas); las especies de hepáticas que han mostrado actividad son *Frullania*, *Marchantia*, *Plagiochilla*, *Porella* y *Radula*, cabe hacer notar que del extracto lipofílico de *Marchantia dominguenis* se aisló la marchantina A, que es un compuesto aromático (tetrafenílico) que inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas y negativas. Por otra parte, se ha reportado actividad antibacteriana en algunas especies de musgos como *Atrichum*, *Dicranum*, *Mnium*, *Polytrichum* y *Sphagnum* de los cuales se han aislado sustancias bactericidas de naturaleza polifenólica (Asakawa, 1990). Los líquenes, poseen actividad bacteriostática debido a la presencia del ácido úsnico y ácido vulpínico. En cuanto a las monocotiledóneas; la planta más estudiada respecto a este tema ha sido el ajo cuya acción bactericida se debe al aminoácido azufrado aliina (Trace, 1993). Las dicotiledóneas han sido el grupo más estudiado debido a que son las que generalmente se utilizan desde el punto de vista de la medicina tradicional, por lo cual es conveniente clasificar por grupo químico los más representativos que se han aislado recientemente. Algunos ejemplos de éstos se muestran en las siguientes tablas:

## TERPENOS

ORIGEN	ACTIVO CONTRA	TIPO DE COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Psorela juncea</i>	<i>S. aureus</i> , <i>M. smegmatis</i>	Isoprenil aromático	Schmitt, A. et al. (1991)
<i>Tanacetum argyrophyllum</i>	<i>S. aureus</i> , <i>S. magatemum</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i>	Isoprenil aromático	Gören, N. et al. (1990)
<i>Tanacetum densum</i>	<i>B. subtilis</i> , <i>K. pneumoniae</i>	Lactonas sesquiterpénicas	Gören, N. et al. (1992)
<i>Jasania condicans</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i>	Monoterpenos	Hammerschmidt, F.J. et al. (1993)
<i>Jasania montana</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>B. subtilis</i>	Monoterpenos	Hammerschmidt, F.J. et al. (1993)

## PTEROCARPANOS

ORIGEN	ACTIVO CONTRA	TIPO DE COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Erythrina milodhraedii</i>	<i>S. aureus, M. smegmatis</i>	Pterocarpanos	Mitscher, L.A. (1988).

## QUINONAS

ORIGEN	ACTIVO CONTRA	TIPO DE COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Karwinskia humboldtiana</i>	<i>S. aureus, M. smegmatis</i>	Dimetil benzocromonas	Mitscher, L. A. et al. (1985)

## LIGNANOS

ORIGEN	ACTIVO CONTRA	TIPO DE COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Helichrysum italicum</i>	<i>Bacillus sp.</i> <i>S. epidermidis</i>	Floroglucinol acetofenonas	Tomás-Barberán, F. et al. (1990)
<i>Piper sarmentosum</i>	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i>	Fenilpropanoides	Masuda T, et al. (1991)
<i>Magnolia virginiana</i>	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i>	Difenil éter	Nitao, J.K. et al. (1991)
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i>	Fenil benzodioxano	Tada, M. y Sakurai, K. (1991)
<i>Rhynchosia suaveolens</i>	<i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Difenilos	Khan, K.A. & Shoeb, A. (1984)
<i>Plantago major</i>	<i>E. coli</i>	Glucósido-fenil propanoico	Ravn, H. & Brimer, L. (1988)
<i>Myristica argentea</i>	<i>S. mutans</i>	Diarildimetil-butano	Nakatani, N. et al. (1988)

## FLAVONOIDES

ORIGEN	ACTIVO CONTRA	TIPO DE COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Psidium trinervia</i>	<i>B. cereus</i>	Flavonoides	Wang, Y. et al. (1989)
<i>Gossypium arboreum</i>	<i>P. maltophilia</i> <i>E. cloacae</i>	Flavonol-glucósidos	Waage, S.K. (1984)
<i>Flemingia stricta</i>	<i>S. aureus</i> <i>M. smegmatis</i>	Flavonona	Mitscher, L.A. et al. (1985)
<i>Argemone pilosa</i>	<i>S. aureus</i>	Catequina	Kasai, S. et al. (1992)



## TANINOS

ORIGEN	ACTIVO CONTRA	TIPO DE COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Nuphar variegatum</i>	<i>S. aureus</i> <i>P. vulgare</i>	Taninos hidrolizables	Nishizawa, K. et al. (1990)
<i>Machaerium floribundum</i>	<i>P. maltophilia</i>	Tanino condensado	Waage, S.K. (1984)

## GLUCOSIDOS

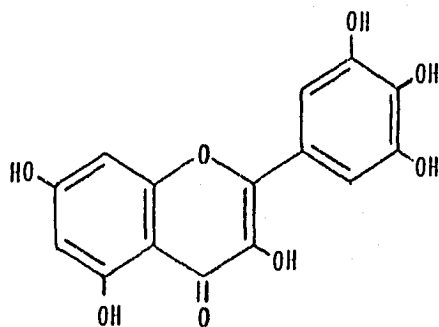
ORIGEN	ACTIVO CONTRA	TIPO DE COMPUESTO	REFERENCIA
<i>Ipomoea bahiensis</i>	<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. faecalis</i> .	Glucósido hidroxiácido	Beeber, L.W. et al. (1986)

## MECANISMOS DE ACCION DE COMPUESTOS BACTERICIDAS DE ORIGEN VEGETAL

Aunque se ha aislado un número importante de compuestos activos, sólo a muy pocos de ellos se les ha determinado su mecanismo de acción. Dentro de éstos, figuran los flavonoides, los taninos y los terpenos.

### I. Flavonoides

Se ha observado que existe muerte bacteriana cuando hay flavonas en el medio de cultivo. Estos compuestos inhiben la síntesis de DNA o RNA bacteriano por intercalación entre las bases de la doble hélice debido a que estos compuestos tienen una estructura planar similar a las bases púricas y pirimídicas, además de poder formar puentes de hidrógeno con ellas, en este caso las flavonas que han mostrado mayor inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos son aquellas que presentan tres grupos OH en el anillo B (por ejemplo, el colorante miricetina) (Mori et al., 1987).



Estructura de la miricetina

## II. Taninos

La acción inhibitoria de estos compuestos se debe a los siguientes efectos: astringencia, acción sobre membranas y competencia por metales.

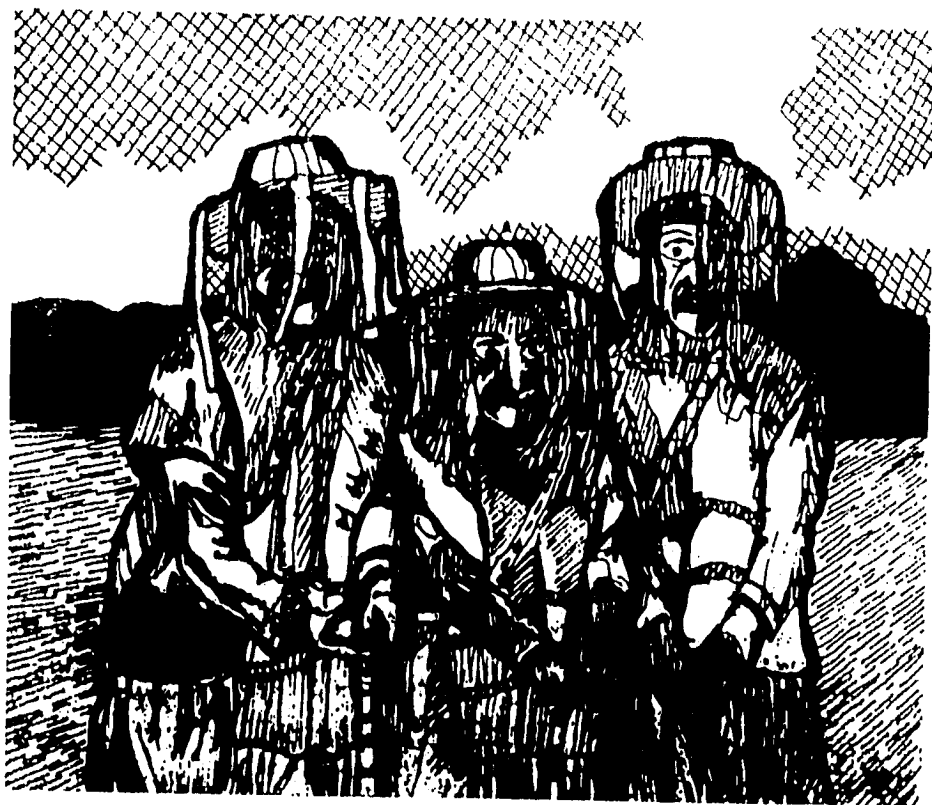
a). Astringencia. Este efecto se ha estudiado de manera exhaustiva en el caso de los taninos, puesto que esta propiedad que posee este tipo de compuestos ha sido utilizada por el hombre para curtir pieles. El carácter astringente de los taninos puede inducir la formación de complejos insolubles de enzimas y sustratos que las bacterias requieran para su crecimiento normal. Se ha observado que muchas enzimas microbianas han sido inhibidas en cultivos libres de células o bien en ensayos con enzimas purificadas cuando son mezcladas con taninos. Las enzimas en las cuales se ha visto este efecto son las peroxidasas y las glicosiltransferasas. Los taninos también pueden afectar directamente el metabolismo de los microorganismos como lo sugiere el cambio de morfología de *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* y *Cellulvibrio fuvus* que a bajas concentraciones de taninos forman filamentos o cadenas mientras que las células en condiciones normales crecen de manera individual (Scalbert, 1991).

b). Acción sobre membranas. Dentro de los efectos deletéreos de los taninos sobre los microorganismos está su acción sobre las membranas; Konishi, y cols. (1987) demostraron que el ácido tánico a concentración de 50 mg/l inhibe el transporte electrónico membranal de *Photobacterium*. La acción de los taninos en las bacterias puede ser similar a la observada en fenoles sintéticos (como el o-difenilfenol) y el difenilalcano, compuestos que han sido muy usados como desinfectantes.

c). Competencia por metales. Otro mecanismo de toxicidad de los taninos es su capacidad para formar complejos con los metales. Los sistemas biológicos incluyendo los microorganismos son altamente dependientes de los iones metálicos presentes en el medio ambiente. Por ejemplo, la infección en humanos por *Escherichia coli* se inhibe por la presencia de la lactoferrina. Muchos de estos compuestos presentan más de dos grupos o-difenol en su molécula. Los taninos pueden formar quelatos con varios iones metálicos, como los iones férricos o cúpricos. La naturaleza multicatecólica de los taninos permite la reticulación y con esto la formación de un precipitado metal-tanino que hace inaccesible, de esta forma, los iones metálicos para el consumo bacteriano (Scalbert, 1991)

### III. Terpenos

Dentro de este grupo, quizá los compuestos más estudiados sean las lactonas sesquiterpénicas y dentro de éstas las que poseen actividad antibacteriana son las que presentan grupos  $\alpha$ -metileno,  $\gamma$ -lactona y carbonilo  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados. Estos grupos representan sitios receptores reactivos para nucleófilos biológicos, en particular los grupos tiol y los grupos amino. En consecuencia, este tipo de lactonas sesquiterpénicas causan alquilación irreversible de grupos tiol y amino esenciales para algunas funciones enzimáticas. Los estudios de estructura-actividad han demostrado que las enzimas bacterianas como la fosfofructoquinasa, la DNA polimerasa y la timidilato sintetasa de *E. coli* son inhibidas por estas lactonas (Fischer, 1991).



## LOS PUREPECHA

El término purépecha, plural de purembe, es el nombre con que se autodenomina este grupo, también conocido como tarasco. Los historiadores modernos señalan que el gentilicio tarasco tiene una connotación despectiva, aunque su significado no parece reflejar tal intención, se traduce literalmente como "suegro", "suegra" o "yerno", término que aplicaban los españoles a sus suegros indígenas, y éstos a sus yernos.

Según la clasificación lingüística de Swadesh y Arana, el purépecha pertenece al grupo mayatotonaco, tronco purépecha; especialistas en la materia anotan que esta lengua no parece presentar parentesco cercano con las de otros grupos indígenas de México, y probablemente se relacione con la lengua wintum del noroeste de Estados Unidos o el quechua de Sudamérica. También se designa a la lengua con los nombres porhé y purhé (Mellado, et al. 1994).

Se han detectado ligeras variaciones dialectales o peculiaridades en cuanto a la pronunciación y el uso de ciertas palabras entre los residentes de distintos pueblos, cuestión que no impide su entera comunicación.

Para el año de 1990, el censo general de población y vivienda registró, a nivel nacional, una población de 114,115 purépecha, de los cuales 19,280 ocupaban el rango etáreo de cero a cuatro años, y 94,835 el de cinco años y más. De esta última cifra, 87,088 se concentraban en el Estado de Michoacán, y el resto en diversos Estados del interior de la República,

destacando con población migrante de este grupo el Distrito Federal, el Estado de México y Baja California Norte.

El territorio tarasco o purépecha se localiza en la región que lleva el nombre de meseta Purépecha-Uruapan, perteneciente al sistema volcánico transversal, ubicado en el centro-norte del Estado de Michoacán, de donde surgen pequeñas corrientes fluviales que se unen al río Balsas o al río Lenaa, lugar mejor conocido como "La cañada de los once pueblos". Abarca los municipios Coeneo, Charapan, Cherán, Erongaricuaro, Nahuatzén, Paracho, Parangaricutiro, Pátzcuaro, Quiroga, Los Reyes, Tingambato, Tzintzuntzan, Uruapan, Zacapu y Ziracuaretiro; además de los municipios de Chilchota, Jacona, Tangamandapio, Tangancicuaro, Tingüindín y Zamora, que se localizan dentro del Distrito de Riego de Ciénegas de Chapala-Zamora (Mellado, et al. 1994).

El rango altitudinal que presenta el territorio purépecha va desde los 1,300 metros sobre el nivel del mar (msnm) hasta alturas poco mayores a los 3,000 msnm; el clima predominante es el típico de las zonas montañosas del país, es decir, templado subhúmedo con una temporada lluviosa en la época caliente del año; la precipitación media anual oscila alrededor de los 1,600 mm y la temperatura media anual es cercana a los 20°C. La zona se encuentra dominada por bosques mixtos donde las principales especies son pinos y encinos, además de otros componentes arbóreos de importancia, como el oyamel, cedro, junípero, aile y liquidámbar. La fauna silvestre, terrestre y acuática de la región constituye todavía un elemento importante en la dieta purépecha., además de formar parte relevante del acervo de remedios tradicionales. Son especies favoritas para la caza, el venado, coyote, zorro, tejón, tlacuache, mapache y pequeños mamíferos como el conejo, armadillo y zorrillo. Entre las aves se encuentran la codorniz, torcaza, huilota, gallina de monte, chachalaca y pato silvestre. En lo que respecta a la fauna acuática, particularmente de la laguna de Pátzcuaro, la diversidad y abundancia de especies comestibles ha ido en decremento debido al alto grado

de contaminación por la descarga del drenaje de las poblaciones que habitan en los islotes, sin embargo, aún es posible pescar charal, pez blanco, carpa y tilapia (Mellado, et al. 1994)

La principal actividad productiva de la región es la agricultura, siendo los cultivos más comunes el maíz, trigo, frijol, papa, haba, lenteja y cebada, además de árboles frutales como durazno, aguacate, tejocote, limón, naranjo, guayabo, chirimoya, chabacano, manzana, perón, capulín, membrillo, zapote blanco y granada roja, entre otros. La ganadería también juega un papel fundamental en su economía, aunque en época de secas los pastizales son insuficientes, lo que representa un grave problema para los ganaderos. Por otra parte, hay que destacar el papel de la silvicultura en la región, puesto que además de contar con la mayor extensión de bosques maderables de la entidad, se han establecido diversos tipos de industrias relacionadas con la explotación y procesamiento de los productos del bosque, como son aserraderos, fábricas y talleres de muebles, carpinterías y resineras. Asimismo, sobresale la industria artesanal, considerada como una de las más importantes y variadas del país. Elaboran diversos trabajos en madera, instrumentos musicales, artículos de herrería, alfarería, tejido de sombreros, rebozos y sarapes de lana, y artículos de laca y cobre, productos que venden en algunos centros comerciales como Pátzcuaro, Quiroga, Paracho y Uruapan.

No obstante, es necesario señalar que la mayor parte de las localidades purépecha son consideradas como zonas rurales expulsoras de población y algunas con un alto grado de marginación. La tierra cultivable resulta insuficiente dada la gran cantidad de población, por lo que muchos integrantes del grupo se ven obligados a migrar hacia otras regiones del país y a los Estados Unidos en busca de empleo.

La comunicación vía terrestre está conformada por una red de caminos de brecha y caminos rurales conectados al sistema carretero estatal y federal, a través de los cuales es posible



trasladarse a la capital del Estado y otras ciudades importantes de la entidad como Apatzingán, Zamora, Sahuayo, Ciudad Hidalgo y Zitácuaro. Sin embargo, aún existen numerosos asentamientos que están al margen de una buena comunicación y, en consecuencia, se encuentran relegados en el desarrollo socio-económico del Estado. Por otra parte, vale la pena destacar que en últimas fechas, las cabeceras de Uruapan y Pátzcuaro han pasado de pueblos pesqueros y agrícolas, a ser centros comerciales y turísticos, e incluso figuran como ciudades importantes de Michoacán.

La vivienda generalmente consta de tres unidades principales: el dormitorio, la troje y la cocina. Los materiales de construcción más comunes son adobe, madera, tabicón y tabique. La presencia de los servicios básicos en la región varía de un municipio a otro; en general, todas las cabeceras municipales cuentan con electricidad, agua entubada, drenaje, alumbrado público, mercados, transporte urbano, telecomunicaciones, escuelas, etcétera; sin embargo, en las rancherías y poblados más alejados a los centros urbanizados, la ausencia de servicios es notoria y sólo algunos gozan de electricidad y agua entubada.

Los servicios institucionales de salud están representados por clínicas del ISSSTE, IMSS y SSA. Las dos primeras dan atención a la población derechohabiente, en tanto que la Secretaría de Salud y las clínicas del IMSS-Solidaridad, atienden a la fracción no asegurada a través de cerca de 300 unidades médicas rurales.

Es importante destacar la participación de los terapeutas tradicionales, particularmente en aquellos lugares donde los servicios de salud pública aún son deficientes. Actualmente existen dos agrupaciones de médicos purépecha. La Organización de Médicos Indígenas de la Cañada de los Once Pueblos Itsitsipikua Uitsakuecheri (OMICOP), fundada en 1990 y cuya sede se encuentra en Cherán; cuenta con más de 40 terapeutas tradicionales provenientes de la Cañada de los Once Pueblos y parte de la meseta purépecha. Y la Organización de

Médicos Indígenas Purépecha Tsinajpiticha (OMIP), creada en 1989 y con sede actual en Pátzcuaro, que agremia a más de 50 médicos de trece comunidades de los municipios de Cherán, Uruapan, Pátzcuaro, Tzintzuntzan y Erongaricuaro (Mellado, et al. 1994).

La importancia de los terapeutas purépecha se encuentra atestiguada desde los tiempos precortesianos. Habitantes de diversos entornos ecológicos, los médicos purépecha son profundos conocedores de una vasta flora medicinal con características definidas, tanto en la región lacustre como en la amplia meseta tarasca. En orden cuantitativo descendente, los grupos de especialistas registrados en la OMIP fueron los siguientes: curanderos (tsinajpiri, sluhijki, eshperi), parteras (pikurpiri), sobadores (parhijpiri), brujos (sikuame), hueseros (sesi atsintani unincha, kuturantani uni), hierberas (mamar jarati huitzakua mitiasti, mamar jas huitzakua, jamantspini) y especialistas que se dedican exclusivamente al tratamiento de la caída de la mollera (ukata, traducido por los informantes como "mollera") (Sepúlveda, 1988).

En cuanto al uso de plantas, los purépecha usan alrededor de 70 plantas para las enfermedades más comunes, pero para trastornos gastrointestinales las que utilizan regularmente son las siguientes: *Artemisia absinthium* (Prodigiosa), *Calendula officinalis* (Virreina), *Lepechinia caulescens* (Manrubio blanco) y *Tanacetum parthenium* (Acetilla ó Santa María).

## DESCRIPCION BOTANICA DE LAS PLANTAS ESTUDIADAS

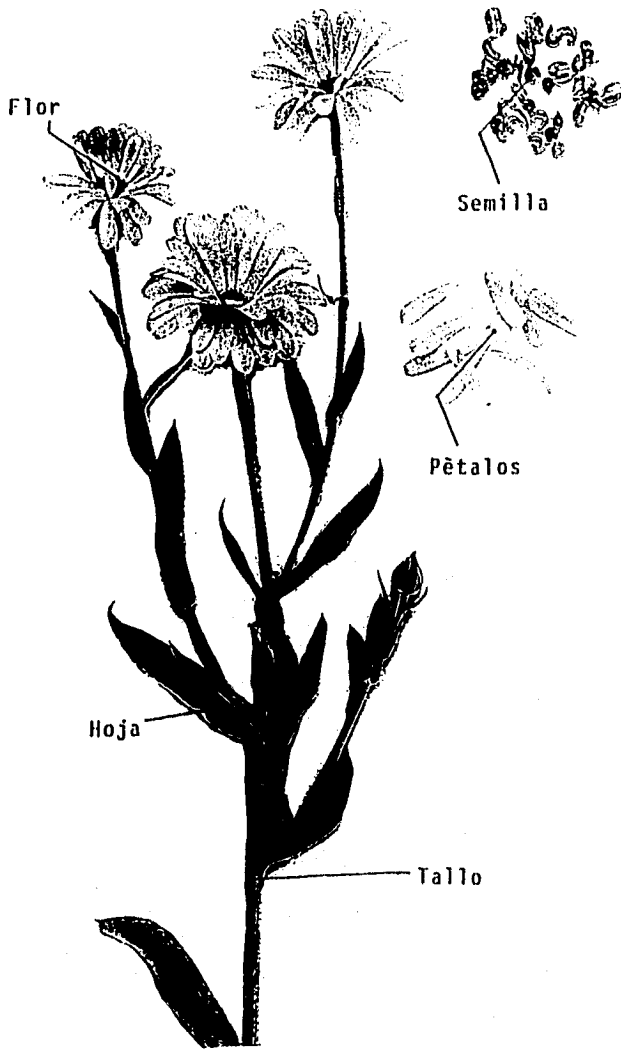
*Artemisia absinthium*. Planta herbácea anual o perenne, hasta de 1.2 m de alto, muy aromática al estrujarse, cubierta de pubescencia lanosa blanquecina; tallos simples o con ramas erectas; hojas hasta de 2 cm de largo, pinnada o bipinnada divididas en 3 a 11 segmentos linear-filiformes, revolutos; cabezuelas erectas y subsésiles, agrupadas en panículas angostas, densas y foliosas; involucre campanulado, sus brácteas  $\pm 15$ , las exteriores lineares, las intermedias ovadas, las interiores más largas, oblongas, de  $\pm 2$  mm de largo; receptáculo hemisférico, pubescente; flores periféricas  $\pm 50$ , sus corolas oblicuas, de  $\pm 0.8$  mm de largo; flores centrales de 6 a 12, fértiles, sus corolas de  $\pm 1$  mm de largo, rubulosas; oblongos, algo comprimidos, de 0.4 a 0.8 mm de largo, cafés, glabros. Nombre común: "Estafiate". Localización: Pachuca y Real del Monte a Teotihuacán y Tepeapulco. Alt. 2250-2500 m. Maleza ruderal y arvense; también en la vegetación secundaria. Coahuila y Zacatecas al Estado de México, Hidalgo y Veracruz (Nash & Williams, 1976).

*Calendula officinalis* L. Planta anual o perenne, hasta de 50 (70) cm de alto; tallos erectos o semi-rastreros, más o menos ramificados, glanduloso-pubescentes, hojas sésiles, oblanceoladas a oblongas o espatuladas, hasta de 14(17) cm de largo y 4(6) cm de ancho, obtusas o apiculadas en el ápice, subenteras a esparcidamente dentadas en el margen, más o menos amplexicaulas en la base, glanduloso-pubescentes; cabezuelas solitarias agrupadas por varias en los extremos de las ramas, sobre pedúnculos hasta de 10 cm de largo; involucre de  $\pm 25$  brácteas linear-oblongas a linear-lanceoladas acuminadas en el ápice, de  $\pm 10$  mm de largo, con márgenes escariosos angostos, glanduloso-pubescentes y además a menudo con

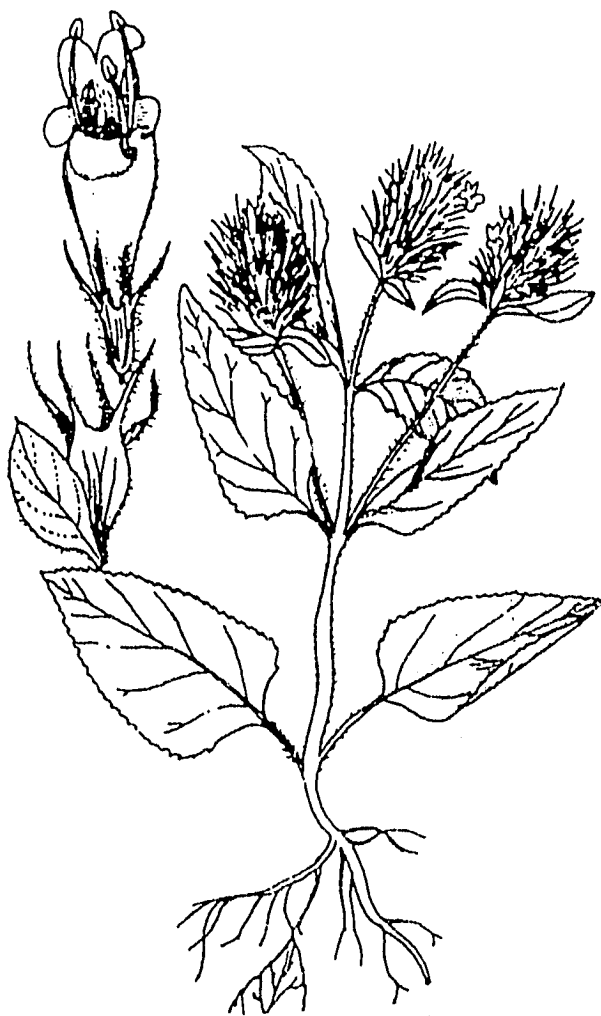
pelos no glandulosos más largos; flores liguladas 25 a 50 o mucho más en algunas plantas cultivadas, sus lánimas amarillas o anaranjadas, de 1.6 a 3 cm de largo, angostamente oblongas; flores de disco  $\pm$  60, sus corolas del mismo color o más oscuras que las de las flores liguladas, de  $\pm$  4 mm de largo, infundibuliformes; achenios exteriores (no siempre presentes) lineares, provistos de pico, hasta de 15 mm de largo, los intermedios anchamente alados (hasta de 7 mm de ancho), los interiores lineares, pero sin pico, todos pubescentes, encorvados y tuberculados en el dorso. Nombre común: "Mercadela". Localización: Ciudad de México, Xochimilco. Alt. 2250 m. Planta frecuentemente cultivada para ornato y a veces escapada. Originaria del Antiguo Mundo (Rzedowski & Rzedowski, 1985).

*Lepechinia caulescens* (Ort.) Epl. (*L. spicata* Willd). Planta herbácea, perenne, a menudo en colonias extensas, tallo ascendente, hasta de 80 cm de alto, simple o poco ramificado, levemente pubescente; hojas con peciolo hasta de 1 a 3 cm de largo, las superiores sésiles, limbo ovado a ovado-lanceolado, de 2.5 a 15 cm de largo por 1.5 a 7 cm de ancho, ápice agudo o acuminado, margen crenado, base cuneada a truncada, escasamente pubescente, inflorescencia en espiga terminal, apretada, brácteas anchamente ovadas, acuminadas, cálizacampanado de 6 a 8 mm de largo, hasta de 12 mm en fruto, dientes linear-lanceolados, pilosos, con puntitos resinosos, cristalinos; corola blanca, de 7 a 9 mm de largo, estambres insertos en el tubo de la corola, inclusos; mericarpios ovoides, de más o menos 2 mm de largo, lisos, de color negro. Localización: ampliamente distribuida en las partes montañosas más húmedas del Valle. Alt. 2250-3300 m. En bosque de coníferas o mixtos, en claros cercanos a los bosques y a veces a la orilla de arroyos o cerca de cultivos. Sinaloa y Durango a Veracruz y Oaxaca, Guatemala. Nombre común: "Manrubio". Esta planta se utiliza para el tratamiento de malestares estomacales (García Zúñiga A. 1985).





*Calendula officinalis*



*Lepechinia caulescens*

*Marrubium vulgare* L. Planta herbácea perenne; tallo blanco lanoso, con pelos simples y estrellados, erectos ascendentes, hasta de 1 m de alto, pero por lo general mucho más corto; hojas con peciolo lanosos, de 0.5 a 3.5 cm de largo, subsésiles las de la parte superior, limbo anchamente ovado u orbicular, de 1.5 a 5 cm de largo por 1 a 5 cm de ancho, ápice obtuso o redondeado, borde crenado, pubescencia lanosa, principalmente en el envés; inflorescencia en densos verticilastros axilares, subglobosos, de más o menos 1.5 cm de diámetro, con muchas flores, bracteolas más cortas que el cáliz, con el ápice recurvado; cáliz tubular, 10-dentado, de 3 a 7 mm de largo, dientes terminados en espinas gancludas; corola blanca, de 5 a 8 mm de largo, tubo incluso en el cáliz; filamentos subalados, anteras divergentes; estilo de 3 a 6 mm de largo; mericarpios ovoides, pardos de más o menos 2.5 mm de largo, finamente granuloso. Nombre común: "Manrubio", "marrubio". Localización: Se distribuye por todo el Valle de México, cerca de poblados y orillas de caminos. Alt. 2250-2900 m. Maleza ruderal, escapada de cultivo. Nativa de Eurasia, ahora de vasta repartición. En algunos lugares es utilizada como medicinal (García Zúñiga, A. 1985).

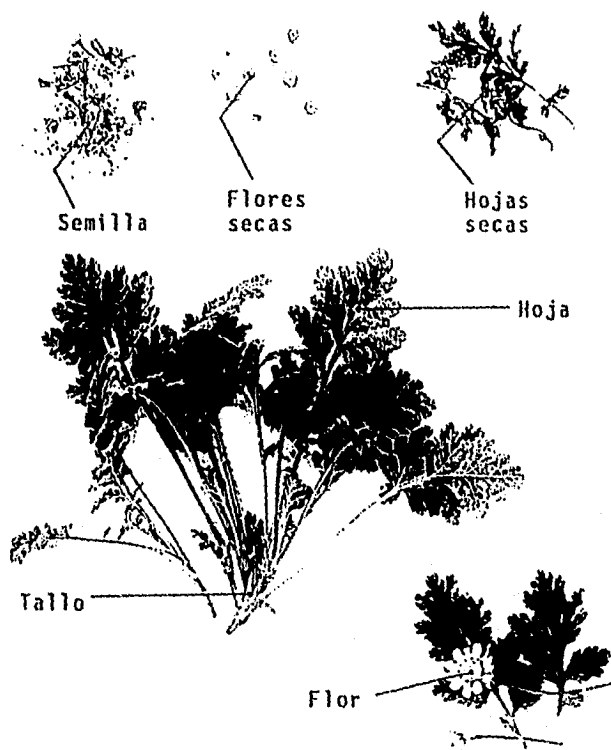
*Tanacetum parthenium* (L.) Sch. Bip. Planta herbácea perenne, muy aromática al estrujarse, hasta de 80 cm de alto, pubécula en sus tallos más jóvenes, hojas e involúcras; tallos más o menos ramificados, erectos; hojas bipinnatífidas, de contorno elíptico, hasta de 8 cm de largo, pecioladas; cabezuelas por lo general numerosas en panículas corimbiformes, sobre pedúnculos hasta de 8 cm de largo; involúcro subhemisférico, sus brácteas más o menos 50, las exteriores lineares, las interiores oblongas, hasta de 4 mm de largo; receptáculo convexo o hemisférico; flores liguladas 10 a 21 (o más en algunas formas cultivadas), sus corolas blancas, las láminas oblongas, de 2.5 a 8 mm de largo, flores de disco más o menos 250, sus corolas amarillas, tubulosas de más o menos 1.5 mm de largo; aquenios cilíndricos, de más o menos 1.5 mm de largo, provistos de 5 a 10 costillas, glabros, vilano en forma de corona diminuta. Nombre común: "Santa María", "hierba de Santa María". Alt. 2250-2550 m. Especie nativa de Europa, frecuentemente cultivada como medicinal y ornamental; a veces escapada acá y allá. (García Zúñiga, A. 1985).





*Marrubium vulgare*

A: Aspecto de la planta. B: Flor. C: Vista superior de la flor. C: Cáliz. E: Corola y estambres. F: Corte de una flor. G: Gineceo.



*Tanacetum parthenium*

*Lepidium virginicum* L. (*L. intermedium* Gray, *L. medium* Greene). Hierba anual o bienal, generalmente erecta, pero a veces tendiendo a ser rastrera, de 15 a 70 cm de alto; algo pubescente; con un solo tallo saliendo desde la base o el tallo ramificado desde abajo; hojas basales (generalmente ausentes en ejemplares con fruto) de 5 a 15 cm de largo por 1 a 5 cm de ancho, pinnatífidas, hojas caulinas más pequeñas, a veces pinnatífidas o lobadas, más comúnmente aserradas y en ocasiones enteras; flores sobre pedicelos 1 o 3 veces más largos que el fruto; sépalos de 1 mm de largo; pétalos generalmente del tamaño de los sépalos o más grandes que éstos, rara vez ausentes o más cortos que los sépalos; estambres 2 (a veces 4 ó 6); silicuas de 3 a 4 mm de largo, ovales a casi orbiculares, glabras marginadas, con una escotadura apical y en cuya base está el estigma sésil. Nombre común: "lentejilla". Localización: Especie de amplia distribución desde Norte a Sudamérica, es sumamente variable en sus características morfológicas, por lo que se distinguen algunas variedades. Las plantas del Valle de México corresponden a: *L. virginicum* var. *pubescens* (Greene) C.L. Hitch (Según Villegas). Es una maleza muy frecuente tanto a la orilla de las banquetas y terrenos baldíos, como en caminos y terrenos de cultivo. Alt. 2250-3000 m. Esta variedad se menciona de Estados Unidos hasta Centroamérica. (Rzedowski, G.C. 1979).



*Lepidium virginicum*

## OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial anti-*Vibrio cholerae* de las plantas que usan los purépecha para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales de probable origen infeccioso, así como aislar y elucidar la estructura del o los compuestos activos de las plantas que muestren dicha actividad biológica.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1.- Determinar mediante una encuesta qué plantas usan los miembros de la Organización de Médicos Indígenas Purépecha (OMIP) para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales de probable origen infeccioso.

2.- Realizar la clasificación botánica y la clasificación del conocimiento popular de las plantas seleccionadas para el estudio.

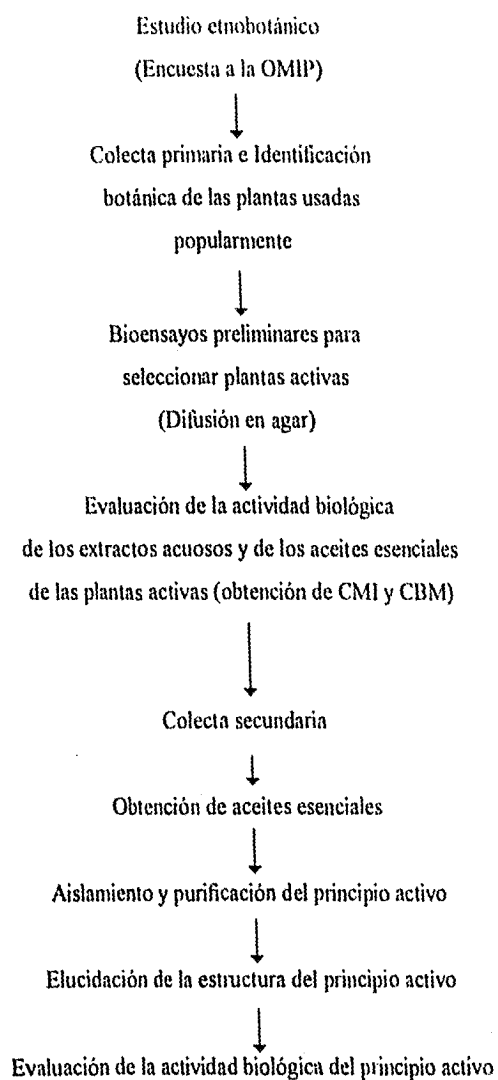
3.- Seleccionar aquellas plantas que posean actividad anti-*Vibrio cholerae*.

4.- Aislar y purificar el o los principios activos de las plantas que presenten actividad biológica.

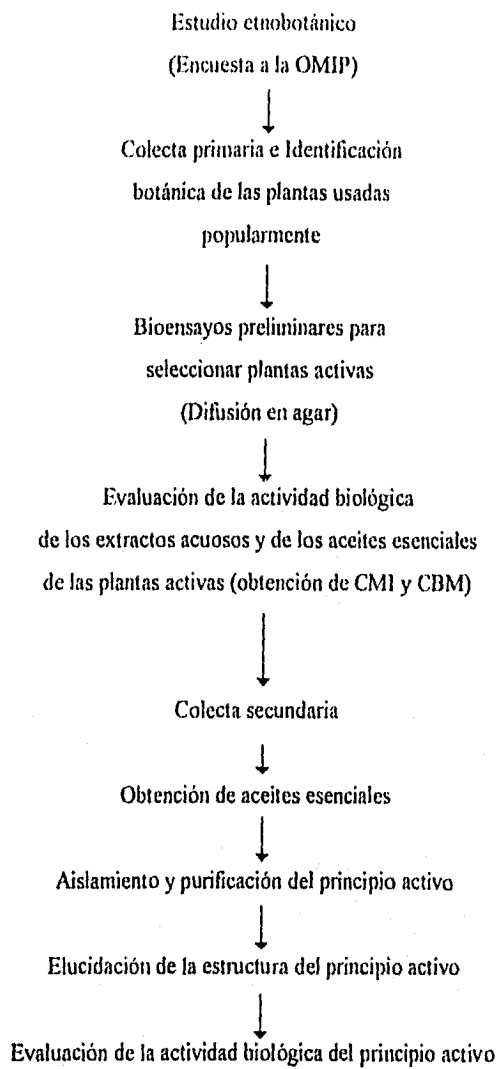
5.- Realizar análisis espectroscópicos que permitan la elucidación de las estructura química del o los principios activos.

6.- Evaluar la actividad anti-*Vibrio cholerae* del o los principios activos.

## DIAGRAMA DE FLUJO



## DIAGRAMA DE FLUJO





## MATERIAL Y METODOS

### I. ESTUDIO ETNOBOTANICO

Este estudio se llevó a cabo mediante encuesta a los curanderos-hierberos de la Organización de Médicos Indígenas Purépecha, haciendo notar que las plantas que ellos utilizan las tienen sembradas en su jardín botánico. La encuesta consistió en las siguientes preguntas:

1. Plantas que utilizan para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales de probable origen infeccioso. En este punto la pregunta fue dirigida en relación al cuadro clínico más común de este tipo de enfermedades, esto es, diarreas con fiebre, dolor abdominal con fiebre, vómito, heces con sangre, etc.

2. Nombre común de la planta.

3. Parte de la planta que utilizan.

4. Forma de preparación de la planta (cocimiento, infusión, macerado, tintura, jugo, mezcla con otras plantas, etc.)

5. Dosis

6. Epoca de colecta

7. Hora de colecta

## **II. COLECTA PRIMARIA**

La colecta se llevó a cabo de manera manual en el mes de mayo de 1991, se colectaron ejemplares completos (aproximadamente medio kilo de cada uno de ellos) lo cual se realizó en el Jardín Botánico del Palacio de Huitziméngari en la Ciudad de Pátzcuaro, Michoacán. Muestras de cada uno de los ejemplares se prensaron para su posterior identificación en el Herbario IZTA de la ENEP Iztacala, UNAM.

### III. IDENTIFICACION

La identificación de cada especie se realizó utilizando claves taxonómicas y fue llevada a cabo por la especialista Edith López Villafranco, miembro del personal del Herbario IZTA. Los ejemplares identificados se depositaron en dicho Herbario y se les asignó su número de colección.

### IV. BIOENSAYOS PRELIMINARES

**1). PREPARADOS HERBALES.** Se prepararon de acuerdo a la forma de uso común. Las plantas que utilizan los Purépecha para enfermedades gastrointestinales las preparan ya sea en forma de cocimiento o en forma de infusión:

a). Cocimiento. Aproximadamente 50 g de la parte de la planta que se utiliza se somete a ebullición en agua durante 20 minutos, la solución se filtra, se deja enfriar y se separa en dos porciones. Con una de ellas se realizaron los bioensayos y con la otra se calcularon sólidos solubles.

b). Infusión. Se calienta a ebullición agua (1 litro) y una vez que se alcanza dicho estado, se le agregan 50 g de la parte de la planta a ensayar, retirando inmediatamente de la fuente de calor el recipiente de extracción y tapándolo. La solución se dejó enfriar, se filtró y una parte de ella se utilizó para los bioensayos, y a la otra se le calcularon los sólidos solubles.

2). **CUANTIFICACION DE SOLIDOS SOLUBLES.** Se realizó de acuerdo al método propuesto por González-Peñalosa (González y Peñalosa, 1981), (ver apéndice p. 94).

3). **MICROORGANISMOS UTILIZADOS.** *Vibrio cholerae* CDC V12, *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislada de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico (éstas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba, biotipo El tor), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Shigella boydii* ATCC 8700.

4). **EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.** El método que se utilizó para evaluar la actividad antibacteriana en los ensayos preliminares y en la separación del principio activo fue el de difusión en agar (Kirby-Bauer). En los bioensayos preliminares se utilizaron los preparados herbales antes descritos. El método general se expone en el apéndice (pág. 95), cada bioensayo se realizó por triplicado.

## V. EVALUACION CUANTITATIVA

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida media (CBM) se usó el método de dilución en caldo (ver apéndice p. 98), cada bioensayo se realizó por triplicado.

La curva de sobrevivencia y el efecto sobre el crecimiento de las bacterias expuestas a los productos naturales aislados se hicieron de acuerdo a los métodos descritos por Kubo, I. (1993). (ver apéndice p. 100).

## VI. AISLAMIENTO Y ELUCIDACION DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS.

1.- Colecta Secundaria. Se colectaron aproximadamente 50 Kg. (peso húmedo) de *L. caulescens* en la carretera Pátzcuaro-Erongaricuaru y 10 Kg de *T. parthenium* en el Jardín botánico del Palacio de Huitziméngari en Pátzcuaro el día 10 de agosto de 1991, el material lo más fresco posible fue utilizado para la extracción de los aceites esenciales.

2.- Extracción. Los aceites esenciales se obtuvieron de acuerdo a la técnica de "arrastré de vapor" (Ver apéndice, pág. 101).

3.- Aislamiento. Para separar los compuestos activos, se usaron técnicas cromatográficas de placa fina y de columna. Las características de ellas se describen en el apéndice (p. 102).

4.- Elucidación de las estructuras. La determinación de las estructuras se llevó a cabo mediante los estudios espectroscópicos siguientes: Espectro de absorción en la región del ultravioleta y visible (200-800 nm), espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear. el equipo y las condiciones de análisis se explican en el apéndice (p. 102).

## RESULTADOS

### I. INVESTIGACION DE CAMPO

Las plantas usadas, los datos etnobotánicos así como la parte de la planta usada, modo de preparación, dosificación y época de colecta fueron proporcionados por miembros de la Organización de Médicos Indígenas Purépecha. La información obtenida se resume en los siguientes cuadros:

**Cuadro I**  
**Datos Generales de las Plantas Estudiadas**

Nombre Científico	Número de Registro (Herbario Izta)	Nombre común	Familia
<i>Artemisa absinthium</i> L.	40,027	Prodigiosa	Compositae
<i>Calendula officinalis</i> L.	40,028	Virreina	Compositae
<i>Lepechinia caulescens</i> (Ort) Epl.	40,029	Manrubio	Labiatae
<i>Lepidium virginicum</i> L.	40,026	Lentejilla	Cruciferae
<i>Manrubium vulgare</i> L.	40,030	Manrubio blanco	Labiatae
<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip.	40,031	Aceitilla	Compositae

**Cuadro II**  
**Datos Etnobotánicos Generales de las Plantas Estudiadas**

Nombre Científico	Parte usada de la planta	Forma de preparación	Epoca de colecta
<i>Artemisa absinthium</i> L.	Toda la parte aérea	Cocimiento	Marzo-mayo
<i>Calendula officinalis</i> L.	Flores	Cocimiento	Mayo-junio
<i>Lepechinia caulescens</i> (Ort) Epl.	Hojas-inflorescencia	Infusión	Julio-noviembre
<i>Lepidium virginicum</i> L.	Raíz	Cocimiento	Marzo-octubre
<i>Manrubium vulgare</i> L.	Hojas	Infusión	Todo el año
<i>Tanacetum parthenium</i> (L.) Sch. Bip.	Tallos-hojas	Infusión	Mayo-septiembre

## II. BIOENSAYOS PRELIMINARES

Para estos bioensayos se prepararon las plantas de acuerdo a la forma de uso (infusión o cocimiento) y la evaluación de la sensibilidad se llevó de acuerdo al método de difusión en agar; los resultados se muestran en la tabla I:

Tabla I  
Actividad Antimicrobiana de Plantas usadas por los Purépecha

Planta	Rendimiento (%de sólidos)	Concentración (µl/cilindro)	Microorganismos problema *				
			E. c.	S. t.	S. b.	E. a.	V. ch.
<i>Artemisa absinthium</i>	6.61	200	-	-	-	-	-
<i>Calendula officinalis</i>	5.79	200	-	-	-	-	-
<i>Lepechinia cnnulescens</i>	3.72	200	16±0.5	21±0.5	14±0.5	11±0.5	16±0.5
<i>Lepidium virginicum</i>	4.93	200	-	-	-	-	-
<i>Manrubiu m vulgare</i>	8.77	200	-	-	-	-	-
<i>Tanacetum parthenium</i>	5.32	200	14±0.5	15±0.5	13±0.5	12±0.5	13±0.5
Control positivo (C')	-	-	17±0.5	16±0.5	18±0.5	16±0.5	20±0.5
Control negativo (C)	-	-	-	-	-	-	-

\* Halos de inhibición en mm.

Simbología: E.c.: *Escherichia coli*, S.t.: *Salmonella typhi*, S.b.: *Shigella boydii*, E.a.: *Enterobacter agglomerans*, V.ch.: *Vibrio cholerae* CDC V12.

Nota: Las concentraciones de 12.5, 25, 50 y 100 µl/cilindro no presentaron halos de inhibición. Se utilizó como control positivo discos de kanamicina de 30 µg. El control negativo consistió en agua destilada estéril.



A las 24 horas se repitió el bioensayo, pero en esta ocasión no se obtuvieron halos de inhibición, por lo que se dedujo que probablemente las dos plantas que presentaron actividad en este primer bioensayo tenían compuestos activos fotosensibles o que la actividad biológica se debía a compuestos volátiles (tomando en cuenta que las plantas activas se preparan en forma de infusión). Para averiguar a cuál de estas 2 opciones correspondía la actividad de las dos plantas activas se procedió a preparar infusiones de *L. caulescens* y de *T. parthenium* en ausencia de luz y dejándolas reposar 24 horas; en todos los casos no se obtuvo evidencia de actividad antimicrobiana, por lo que procedimos a separar los aceites esenciales de los dos vegetales activos mediante la técnica de arrastre de vapor, obteniéndose un rendimiento de aceite de 0.052 % para *T. parthenium* y de 0.039 % para *L. caulescens*. Se evaluó la actividad de los aceites esenciales, haciendo notar que en esta fase de la investigación se contó con dos cepas más de *V. cholerae* que fueron *V. cholerae* 01, aislado de agua y *V. cholerae* aislada de un caso clínico; estas cepas fueron donadas por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica (INDRE). En estos casos se realizaron 3 bioensayos (con intervalo de 24 horas entre cada uno de ellos), en las tablas II y III se muestran los resultados.

Tabla II  
 Actividad Antimicrobiana de los Aceites Esenciales de *L. caulescens*

Dosificación	Microorganismos problema *							
	μl/cilindro	E.e.	S.a.	S.b.	E.a.	V.ch.(t)	V.ch.(a)	V.ch.(c)
12.5	-	-	-	-	-	11.5±3.5	12.5±2.1	13.0±1.4
25	10.3±1.5	-	12.0±1.0	10.0±1.0	18.5±0.7	17.5±4.9	16.0±2.8	
50	12.6±1.5	-	16.6±1.5	11.6±0.6	25.0±0.5	21.0±5.6	19.0±2.8	
C'	19.5±1.0	19.5±3.0	17.2±1.3	19.5±2.4	18.2±4.5	17.1±3.2	16.6±2.2	
C	-	-	-	-	-	-	-	

\* Halos de inhibición en mm (media de 3 bioensayos).

Simbología: Igual que la anterior con la adición de V. ch.(a): *Vibrio cholerae* aislada de agua, V. ch.(c): *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico. C' Kanamicina 30 μg, C' Aceite de olivo estéril.

Tabla III

Actividad Antimicrobiana de los Aceites Esenciales de *T. parthenium*

Dosificación µl/cilindro	Microorganismos problema *						
	E.c.	S.t.	S.b.	E.a.	V.ch.(t)	V.ch.(a)	V.ch.(e)
12.5	12.3±2.3	12.0±0.5	16.0±5.6	10.6±0.5	35.6±2.1	17.6±8.7	11.5±1.0
25	14.3±2.5	12.6±2.5	17.5±3.5	12.0±1.0	35.0±0.5	20.6±7.5	13.0±2.8
50	19.0±5.6	15.6±1.5	20.0±0.5	13.3±2.3	35.0±0.5	25.6±4.9	17.0±1.4
C'	19.5±1.0	19.5±3.0	17.2±1.2	19.5±2.4	18.2±4.5	17.1±3.8	16.6±2.2
C	-	-	-	-	-	-	-

\* Halos de inhibición en mm.

Simbología: Igual que la anterior.

Una vez que se comprobó que la actividad antimicrobiana se encuentra en los aceites esenciales, se procedió a determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Media (CBM) de dichos aceites mediante el método de dilución en caldo; cada bioensayo se hizo por triplicado, los resultados aparecen en la Tabla IV.

**Tabla IV**  
**Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida Media**  
**de los Aceites Esenciales de *L. caulescens* y *T. parthenium***

Bacteria	<i>L. caulescens</i>		<i>T. parthenium</i>	
	CMI (µl/ml)	CBM (µl/ml)	CMI (µl/ml)	CBM (µl/ml)
<i>Escherichia coli</i>	10.6±4.6	16.0±0.5	5.3±2.3	8.0±0.5
<i>Shigella boydii</i>	21.3±9.2	26.6±9.2	16.0±0.5	18.6±12.2
<i>Salmonella typhi</i>	53.3±18.5	170.6±73.9	8.0±0.5	10.6±4.6
<i>Enterobacter agglomerans</i>	13.3±4.6	16.0±0.5	5.3±2.3	6.6±4.6
<i>Vibrio cholerae</i> (t)	4.0±0.5	6.0±2.8	2.0±0.5	2.6±1.2
<i>Vibrio cholerae</i> (a)	3.0±1.4	4.0±0.5	2.0±0.5	4.0±0.5
<i>Vibrio cholerae</i> (c)	4.0±1.0	4.0±0.5	3.3±1.2	8.0±0.5

De acuerdo a los resultados de estos bioensayos preliminares, se concluyó que la actividad antimicrobiana se encontraba en los aceites esenciales y que la especie más sensible a éstos era *V. cholerae*, por lo que se consideró trabajar solamente con ésta en las siguientes etapas de la investigación debido a: 1). El bajo rendimiento que se obtenía en la extracción de los aceites y 2). La necesidad de obtener una cantidad adecuada de ellos para la fase de separación y aislamiento de los principios activos..

### III. ACTIVIDAD ANTI-*Vibrio cholerae* DE LOS ACEITES ESENCIALES

Una vez establecidos los parámetros de CMI y CBM de los aceites esenciales contra *V. cholerae*, se procedió a determinar el efecto de los mismos sobre el número de sobrevivientes, este bioensayo se llevó a cabo mediante la técnica de dilución (Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonia) por muestreo a diferentes tiempos de la exposición a los aceites. Cabe hacer notar que en este caso se tuvo que trabajar con una población inicial del orden de  $5-8 \times 10^8$  UFC/ml puesto que el inóculo inicial recomendado por Jones et al. que es de  $10^{6-7}$  UFC/ml, no permitía hacer conteo alguno del número de sobrevivientes ya que a la hora de desafiar esta población bacteriana contra los aceites a una dosis igual a la Concentración Mínima Inhibitoria no había una sola UFC. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla V  
 Efecto sobre el número de sobrevivientes de *V. cholerae* (t)  
 expuesta a los Aceites Esenciales de *L. caulescens* y *T. parthenium*

Tiempo (horas)	<i>L. caulescens</i>		<i>T. parthenium</i>	
	No. sobrevivientes (UFC/ml)	Log. No. sobrevivientes	No. sobrevivientes (UFC/ml)	Log. No. sobrevivientes
0	$5.56 \times 10^8$	8.745	$8.50 \times 10^8$	8.93
1	$1.80 \times 10^8$	8.250	$4.60 \times 10^8$	8.66
2	$5.00 \times 10^6$	6.690	$2.55 \times 10^6$	6.40
3	$5.00 \times 10^5$	5.690	$1.50 \times 10^5$	4.17
4	$1.60 \times 10^4$	4.200	$4.50 \times 10^3$	3.65
5	0	0	0	0

Cepa bioensayada: *V. cholerae* (t) CDC V12

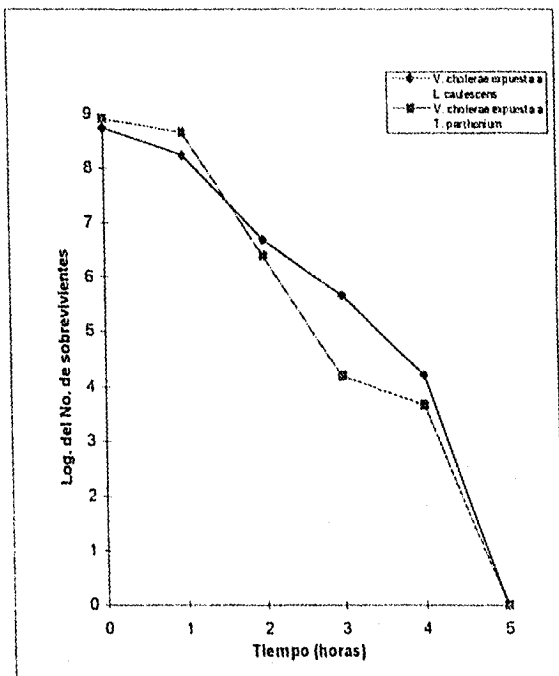
Dosis: 4  $\mu$ l/ml de aceite esencial de *L. caulescens*

2  $\mu$ l/ml de aceite esencial de *T. parthenium*.

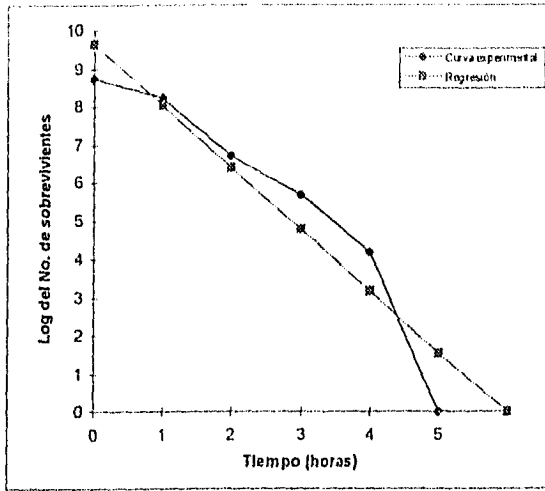
Las curvas de supervivencia correspondientes a la tabla anterior se muestran en la Gráfica 1.

A cada una de las curvas se les hizo análisis de regresión por mínimos cuadrados para determinar si cada curva se ajustaba a una recta, los resultados se muestran en las Gráficas 2 y 3.

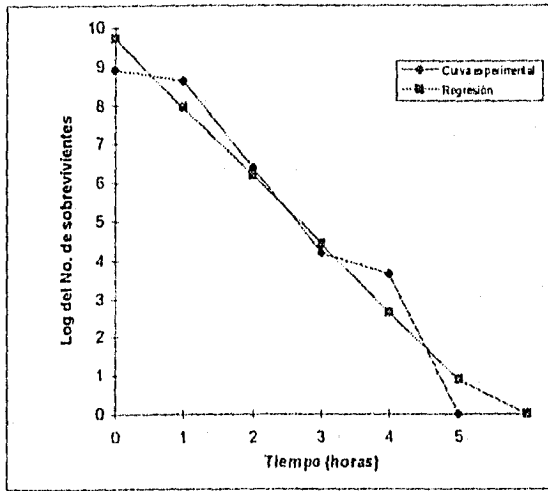
GRAFICA 1  
CURVAS DE SUPERVIVENCIA DE *V. cholerae* EXPUESTA A LOS ACEITES ESENCIALES  
DE *L. caulescens* Y *T. parthenium*.



GRAFICA 2  
 CURVA DE SUPERVIVENCIA DE *V. cholerae* (t) SOMETIDA A UNA  
 DOSIS DE 4  $\mu$ l/ml DE ACEITE ESENCIAL DE *L. caulescens*.



GRAFICA 3  
 CURVA DE SUPERVIVENCIA DE *V. cholerae* (t) SOMETIDA A UNA  
 DOSIS DE 2  $\mu$ l/ml DE ACEITE ESENCIAL DE *T. parthenium*.





#### IV. AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS

Concluida la evaluación de la actividad biológica de los aceites esenciales de las 2 plantas, se procedió a separar los componentes activos, para lo cual primeramente se tuvo que seleccionar la fase móvil y la fase estacionaria más adecuadas para fraccionar mediante cromatografía en placa fina (CPF) dichos componentes. Estos parámetros fueron utilizados posteriormente en la elaboración de la cromatografía en columna para separar las sustancias de cada aceite y así poder evaluar su actividad biológica. La fase estacionaria recomendada para la separación de terpenos por CCF, es la sílica gel y las fases móviles se obtuvieron por pruebas de ensayo y error de una serie de mezclas propuestas por Wagner et al. (1990) para la separación de terpenos. Las fases móviles fueron hexanos-éter etílico 8.7: 1.3 v/v para *L. caulescens*, y hexanos-acetato de etilo 9: 1 v/v para *T. parthenium*. En la separación de los aceites de ambas plantas se obtuvieron 9 fracciones.

La siguiente tabla muestra el valor de los Rf obtenidos para cada fracción:

Tabla VI

Separación por Cromatografía de Placa Fina de las Plantas con Actividad Biológica

<i>L. caulescens</i>		<i>T. parthenium</i>	
Fracción	Rf	Fracción	Rf
1	0.20	1	0.39
2	0.30	2	0.48
3	0.34	3	0.52
4	0.38	4	0.57
5	0.42	5	0.61
6	0.48	6	0.64
7	0.52	7	0.69
8	0.65	8	0.92
9	0.78	9	0.97

Al realizar la cromatografía en columna de los aceites esenciales de *T. parthenium* se obtuvieron 8 fracciones y 10 fracciones en *L. caulescens*; en los dos casos se obtuvieron fracciones líquidas y sólidas (a temperatura ambiente). Cada fracción se bioensayó contra las tres cepas de *V. cholerae*. En cuanto a las fracciones líquidas, éstas se bioensayaron a una dosificación de 30 µl/cilindro y las sólidas se ensayaron a una concentración de 800 µg/cilindro; en este caso, se utilizó como vehículo y como control negativo el metanol al 20 %. Los ensayos de las fracciones de los dos aceites esenciales se llevaron a cabo de acuerdo al método de difusión en agar. Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

Tabla VII  
Evaluación de la Actividad Antibacteriana de las Fracciones del Aceite Esencial  
de *L. caulescens*

Fracción	Microorganismos problema (halo de inhibición en mm)			
	<i>V. ch.</i> 01	<i>V. ch.</i> cc	<i>V. ch.</i> El Tor	<i>V. ch.</i> N° 01
1*	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	12.0±0.5	13.0±0.5	11.0±0.5	22.0±0.5
5	-	-	-	-
6*	22.0±0.5	16.0±0.5	25.0±0.5	25.0±0.5
7*	17.0±1.0	15.0±0.5	-	12.0±0.5
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	24.0±0.5	16.0±0.5	22.0±0.5	12.0±0.5
C*	15.5±0.5	15.5±0.5	16.0±0.5	15.5±0.5
C'	-	-	-	-

Clave: C' Kanamicina 30 µg, C' MeOH, Fracción líquida (a temperatura ambiente), \* Fracción sólida (cristales a temperatura ambiente).

Tabla VIII  
Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las Fracciones del Aceite Esencial  
de *T. parthenium*

Fracción	Microorganismos problema (halo de inhibición en mm)		
	<i>V. ch.</i> 01	<i>V. ch.</i> cc	<i>V. ch.</i> El Tor
1	-	-	-
2*	13.0±0.5	-	11.0±0.5
3*	20.0±0.5	15.0±0.5	15.0±0.5
4*	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	-	-	-
8*	-	-	-
C'	22.0±1.0	20.0±1.0	25.0±1.0
C''	-	-	-

Clave: Igual que la anterior.

De acuerdo a los resultados obtenidos, las fracciones 4 y 6 de *L. caulescens* presentaron actividad antibacteriana. Se decidió trabajar sólo con la fracción 6 debido al bajo rendimiento obtenido en la fracción 4 (3 mg) y con ello a la imposibilidad de realizar el estudio químico correspondiente además de que dicha fracción presentaba impurezas. En cuanto a los aceites de *T. parthenium* la fracción activa fue la F3. La F6 de *L. caulescens* y la F3 de *T. parthenium* fueron sometidas a examen de pureza mediante cromatografía en capa fina, en ambos casos se encontraron 2 manchas, por lo que se separaron los componentes mediante cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice, de malla 70-230 y como fase móvil benceno-cloroformo 1: 1 v/v para la F6 de *L. caulescens* y benceno para la F3 de *T. parthenium*. En los 2 casos se separaron

los componentes evaluándose su actividad antibacteriana, de acuerdo a la técnica de difusión en agar; los resultados se observan en la tabla IX.

Tabla IX  
Actividad Antibacteriana de las Fracciones Puras

Fracción	Microorganismos problema		
	<i>V.ch.(t)</i>	<i>V.ch.(a)</i>	<i>V.ch.(c)</i>
F <sub>6</sub> (a)	14.5±0.5	19.5±0.5	15.5±0.5
F <sub>6</sub> (B)	-	-	-
F <sub>3</sub> (a)	14.5±0.5	19.5±0.5	15.5±0.5
F <sub>3</sub> (b)	-	-	-
C	-	-	-
C'	22.0±0.5	19.8±1.3	18.5±0.5

Clave: F<sub>6</sub> (a) y F<sub>6</sub> (B): Fracciones de *L. caulescens*; F<sub>3</sub> (a) y F<sub>3</sub> (b): Fracciones de *T. parthenium*; C' MeOH y CHCl<sub>3</sub>, C' Kanamicina 30 µg, (a) cristales, (b) líquido.

Como se puede observar en estos resultados, los cristales de ambas fracciones presentan la actividad anti-*Vibrio cholerae*, debido a ello se procedió a determinar pureza y en su caso, elucidar la estructura.

## V. ELUCIDACION DE LA ESTRUCTURA

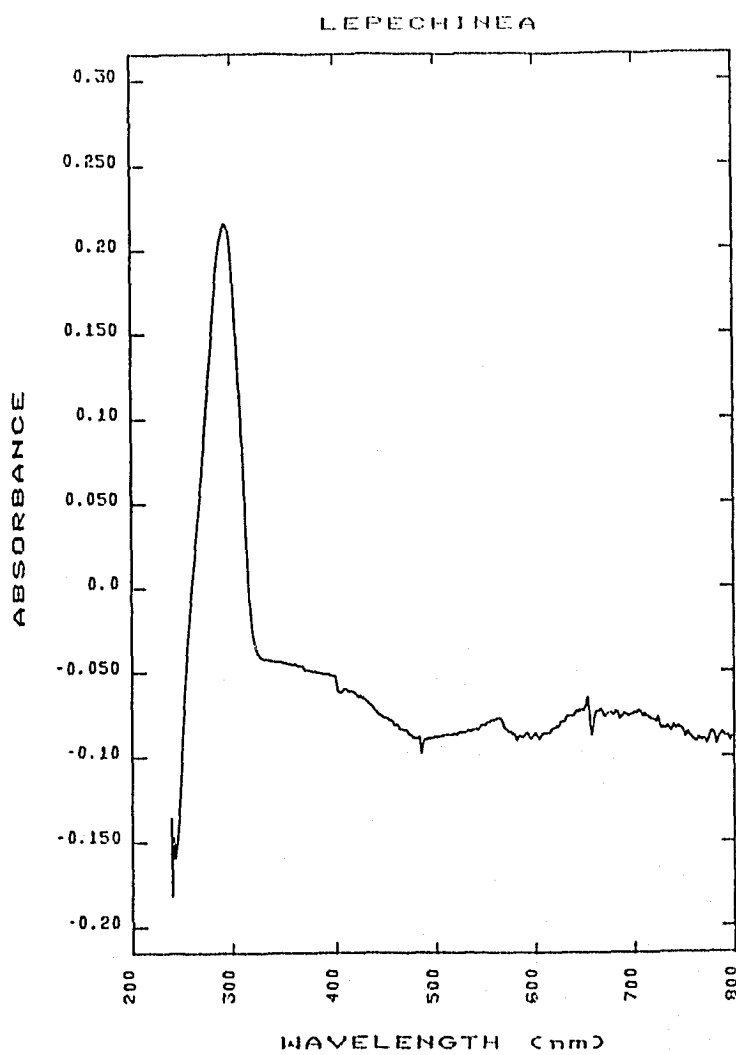
En primer lugar se determinó la pureza de los compuestos aislados por cromatografía en capa fina, usando diversas fases móviles. En ningún caso se distinguieron compuestos con impurezas puesto que se revelaron como manchas únicas. Los dos compuestos aislados presentaron igual Rf. por lo que se pensó que se trataba de la misma sustancia. Una vez comprobada su pureza, se determinaron los siguientes parámetros: Punto de fusión, espectro de absorción en el ultravioleta-visible.

Los resultados fueron:

Punto de fusión del compuesto aislado de *L. caulescens* = 176°C

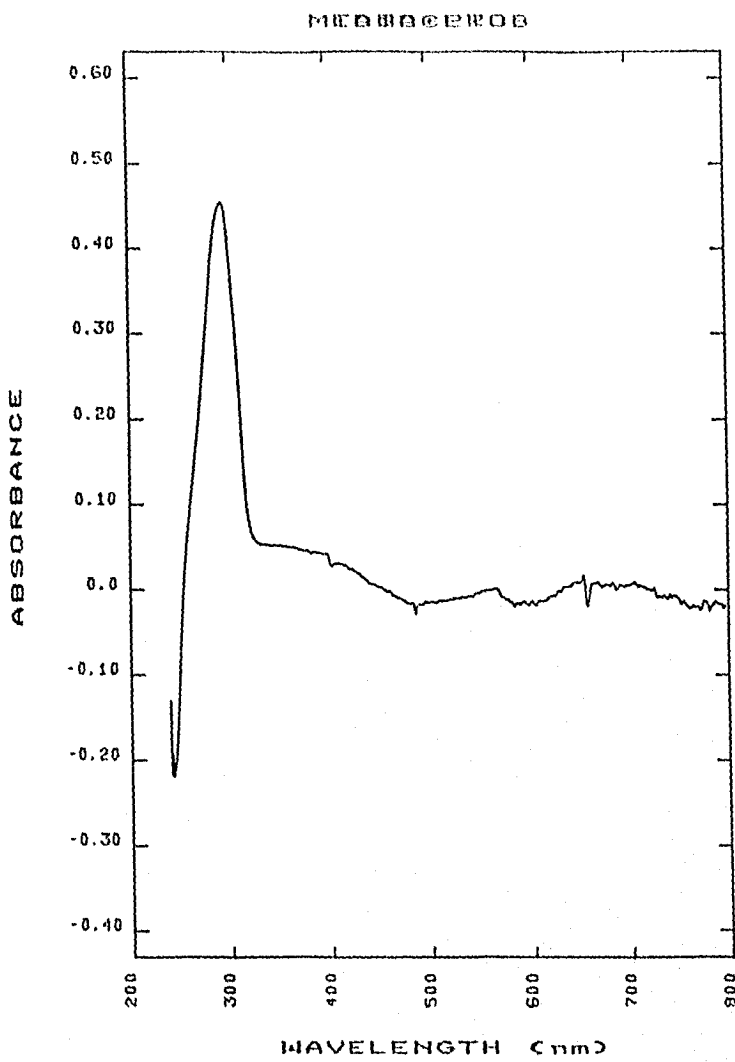
Punto de fusión del compuesto aislado de *T. parthenium* = 176°C

Los espectros ultravioleta-visible del principio activo aislado de ambas plantas mostraron un máximo de absorción a 295 nm, como se observa en las figuras 1 y 2:



L 295= 0.2303

FIGURA 1: ESPECTRO DE ABSORCION DE UV-vis  
DE *LEPECHINIA CAULESCENS*.



L 295# 0.2252

FIGURA 2: ESPECTRO DE ABSORCION DE UV-Vis  
DE *TANACETUM PARTHENIUM*.



Estos resultados parecían indicar que se trataba del mismo compuesto; esto se comprobó al determinar los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Protones y de  $^{13}\text{C}$  que se le realizaron al compuesto aislado a partir de la *Lepechina caulescens* y el espectro de masas obtenido a partir del compuesto de *Tanacetum parthenium*. En ambos casos, la interpretación de los espectros se hizo por comparación con espectros conocidos y con la ayuda del Dr. Alfonso Romo de Vivar, investigador del Instituto de Química de la UNAM y especialista en la elucidación de estructuras de compuestos de origen natural.

El espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$ , permitió asignar las posiciones de los protones del compuesto aislado de *L. caulescens*, las señales químicas que se observaron son:

- 1.- Dos protones en campos bajos correspondientes a metileno vecino a un carbono carbonílico y cuya señal se presenta entre 20 y a 2.10 partes por millón (ppm).
- 2.- Cuatro protones correspondientes a dos metilenos en 1.30-2.00 ppm.
- 3.- Un protón correspondiente a un CH influenciado por carbonilo entre 2.3 y 2.4 ppm.
- 4.- Tres protones de metilo a 0.80  
Tres protones de metilo a 0.88  
Tres protones de metilo a 0.9256

El espectro se observa en la Figura 3.

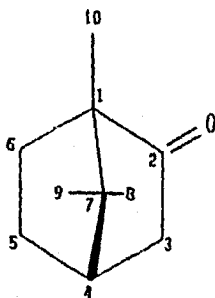
Para comprobar estos datos se determinó la resonancia magnética nuclear de protones DEPT (que se presenta en la Fig. 4) la cual mostró los siguientes resultados, 3 grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ), 3 grupos

metileno ( $\text{CH}_2$ ), un carbono terciario ( $\text{CH}$ ). De acuerdo a estos resultados, se demostró que el compuesto es cíclico con un grupo carbonilo, probablemente derivado del Borano.

La estructura del ciclo se determinó mediante Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13; en dicho espectro se encontraron las siguientes señales químicas (Figura 5).

1. Un carbono carbonílico a 219.7 ppm.
2. Carbón cuaternario influenciado por el grupo carbonílico a 57.6 ppm.
3. Dos carbonos en la región de 43.2 y 43.0 que corresponden a un carbono terciario y a un metileno respectivamente y que se encuentran influenciados por el grupo carbonilo.
4. Dos carbonos metilénicos en 29.8 y 27.0 ppm.
5. Un carbono cuaternario a 46.7 ppm.
6. Tres carbonos metílicos: dos en la región de 19 vecinos de un carbono cuaternario descrito en el punto anterior, y un carbono metílico vecino a carbono cuaternario descrito en el punto 2.

De acuerdo a los datos anteriores, el compuesto corresponde al alcanfor cuya estructura es la siguiente (enumerando los carbonos obtenidos por  $\text{RMN}^{13}\text{C}$ )



ca. 20 mg sample of sample

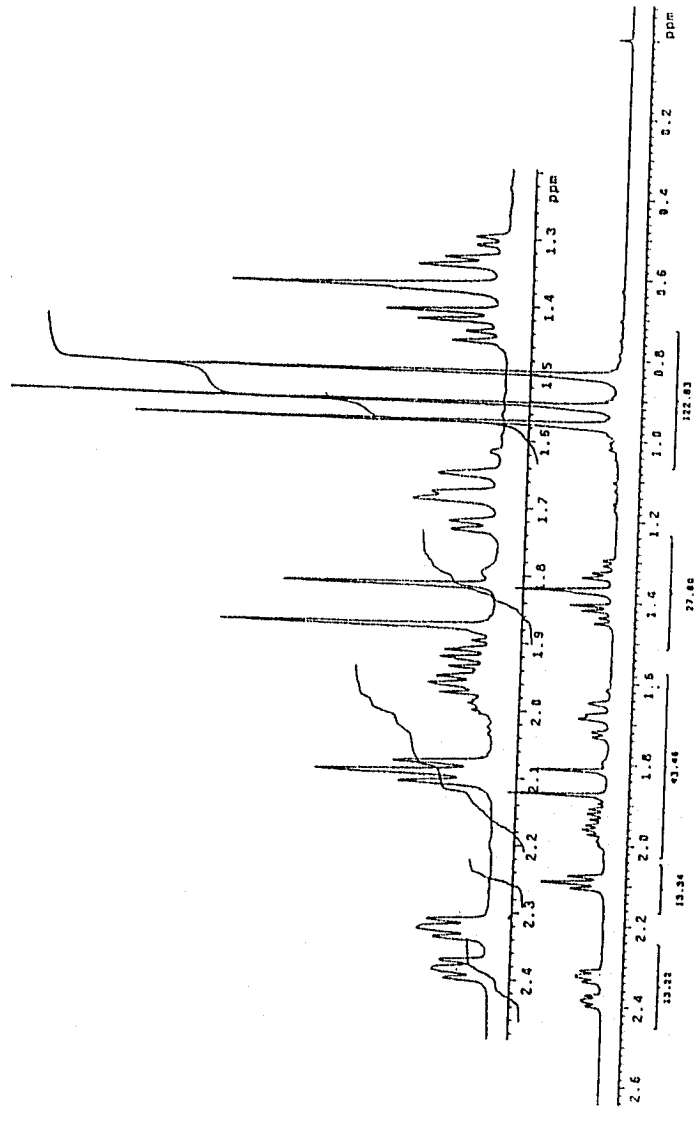


FIGURA 3: ESPECTRO DE RMN1H DE *L. CAULESCENS*.

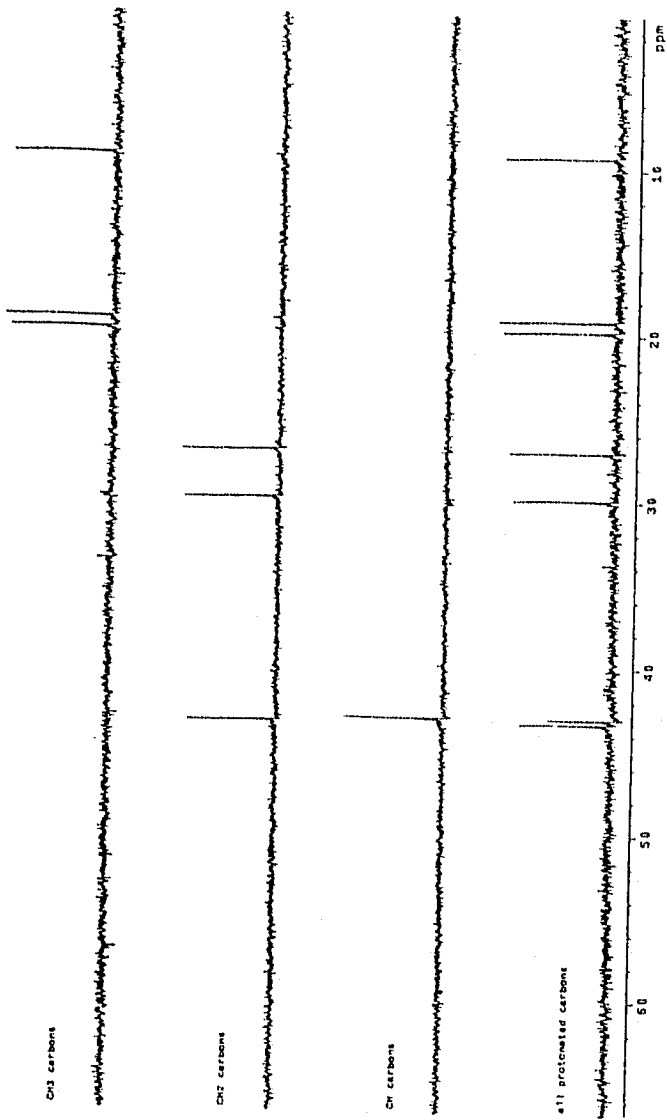
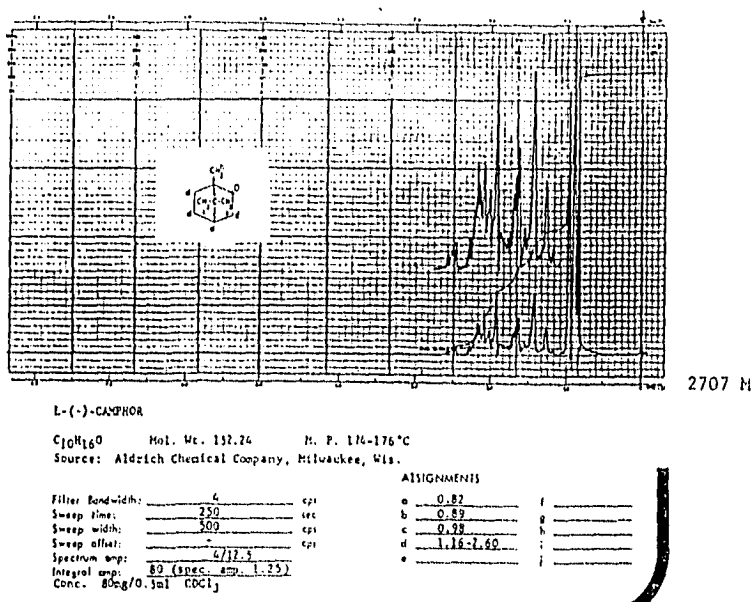


FIGURA 4: ESPECTRO DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE PROTONES DEPT



Los datos obtenidos concuerdan con los reportados en el Manual Sadtler (Sadtler 1978 y por Charlwood, B. (1991) para  $\text{RMN}^1\text{H}$ , cuyos espectros se muestran en las figuras 6 y 7:

FIGURA 6: RMN DE L--ALCANFOR



Respecto al compuesto aislado de *T. parthenium*, la elucidación de la estructura se realizó mediante análisis de espectrometría de masas por comparación con la biblioteca contenida en la memoria del equipo utilizado. Las masas de los iones del compuesto son iguales a las obtenidas de la fragmentación del Biciclo [2.2.1] heptan-2-ona, 1,7,7-trimetil (nombre químico del alcanfor, cuyo ión molecular (peso molecular) es de 152 y los fragmentos  $m/z$  principales se encuentran en 41, 95, 81, 39, 55, 69, 83, 67, 108, 109, 53 y 68. El espectro de masas del alcanfor aislado de *T. parthenium* y el espectro de referencia obtenido de la memoria del equipo se demuestran en la Figura 8.

27185 M

D-CAMPHOR

$C_{10}H_{16}O$

Mol. Wt. 152.24

PRISM NO.

-

M.P. 178°C

SOLVENT

$CDCl_3$

Source of Sample:  
Tokyo Kasei Kogyo Company Ltd.,  
Tokyo, Japan

REFERENCE

TMS

SWEEP OFFSET

-

NMR ©1978 Sadtler Research Laboratories, Inc. subsidiary of BUCK Engineering, Inc.

ASSIGNMENTS

a	0.84	l	_____	k	_____	D	_____
b	0.92	g	_____	i	_____	Q	_____
c	0.97	h	_____	m	_____	i	_____
d	1.20-2.60	t	_____	n	_____	S	_____
e	7.29 $CHCl_3$	j	_____	u	_____	t	_____

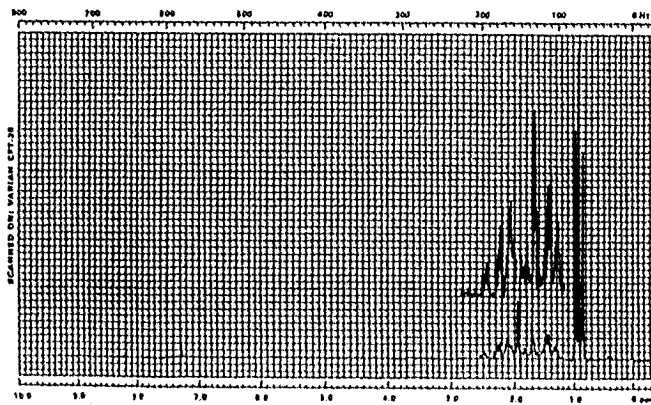
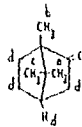


FIGURA 7: RMN DE D-ALCANFOR

Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,2,7-trimethyl- (9CI)

FRN: 3065 LSN: 496 (RES: 6755.) HW: 152 C10H16O

CAS: 0000076232 EPR: 0000004029 OURL INDX: 600

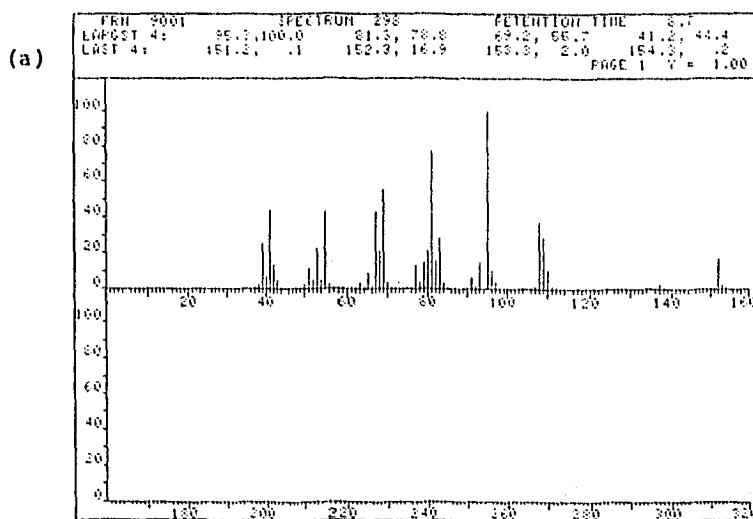
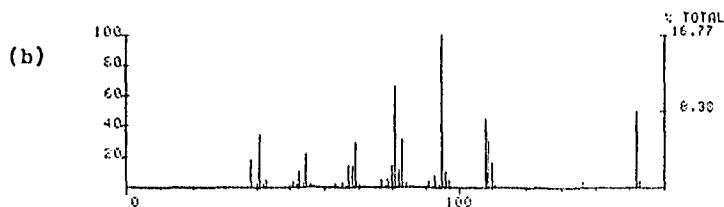


FIGURA 8: ESPECTRO DE MASAS DEL ALCANFOR (a), COMPARADO CON EL OBTENIDO EN LA MEMORIA DEL EQUIPO (b).



De acuerdo a los resultados obtenidos por RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C y por espectrometría de masas, el compuesto activo aislado tanto de *L. caulescens* como de *T. parthenium* es el alcanfor cuyo nombre químico es 1, 7, 7-Trimetil Bicyclo (2.2.1) heptan-2-ona. Cabe hacer notar que tanto el punto de fusión, así como el espectro ultravioleta visible, coinciden con los reportados por la literatura para este compuesto. La siguiente tabla obtenida de Clarke's isolation and identification of Drugs, muestran las principales características químicas del alcanfor (Moffat, 1986).

### Características del Alcanfor

<b>Punto de fusión</b>	174 - 181 °C
<b>Espectro de ultravioleta</b>	Máximo de absorción: 295 nm (en MeOH)
<b>Espectro de masas</b>	Picos principales a m/z : 95, 81, 41, 69, 55, 83, 67, 137.
<b>Espectro infrarrojo</b>	Señales a 1730, 1047, 1025, 1277, 1095 y 775 cm <sup>-1</sup>
<b>Solubilidad</b>	1.0 g en 700-800 g de H <sub>2</sub> O, 1.0 g en 1.0 g de etanol, 1.0 g en 0.25 g de CHCl <sub>3</sub> , 1.0 g en 1.0 g de éter.

### VI. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PRINCIPIO ACTIVO AISLADO

La evaluación de la actividad anti-*Vibrio cholerae* del alcanfor se llevó a cabo determinando los siguientes parámetros:

- Obtención de la concentración mínima inhibitoria y bactericida media (por el método de dilución en caldo).

- b). Evaluación del efecto del principio activo sobre el crecimiento de *V. cholerae* (obtención de las curvas de crecimiento de *V. cholerae* expuesto a diferentes concentraciones del alcanfor).
- c). Obtención de la curva de supervivencia (por el método de diluciones). Los resultados obtenidos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y la concentración bactericida media se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla X**  
**Concentraciones Mínima Inhibitoria y Bactericida Media del Alcanfor**

Bacteria	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	CBM ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>V. cholerae</i> (t)	400 $\pm$ 10	800 $\pm$ 10
<i>V. cholerae</i> (a)	400 $\pm$ 10	800 $\pm$ 10
<i>V. cholerae</i> (c)	800 $\pm$ 10	1600 $\pm$ 10

En cuanto al efecto del alcanfor sobre el crecimiento de *V. cholerae* y la curva de supervivencia del mismo expuesto al alcanfor, los experimentos se llevaron a cabo utilizando un inóculo de  $1.09 \times 10^7$  UFC/ml usando concentraciones de alcanfor correspondientes a la MIC y  $1/2$  de MIC; los resultados se observan en las siguientes tablas y gráficas.

Tabla XI  
Efecto sobre el crecimiento de *V. cholerae* expuesto al alcanfor

Tiempo (hs)	Turbidez medida a 660 nm			
	C	$\frac{1}{2}$ MIC	MIC	CBM
0	0	0	0	0
4	0.040	0.040	0.010	0.010
8	0.190	0.070	0.025	0.010
12	0.240	0.092	0.035	0.010
16	0.230	0.130	0.035	0.010
20	0.195	0.145	0.040	0.015
24	0.190	0.150	0.050	0.020
28	0.190	0.150	0.059	0.020
32	0.190	0.140	0.052	0.020
36	0.160	0.140	0.100	0.020

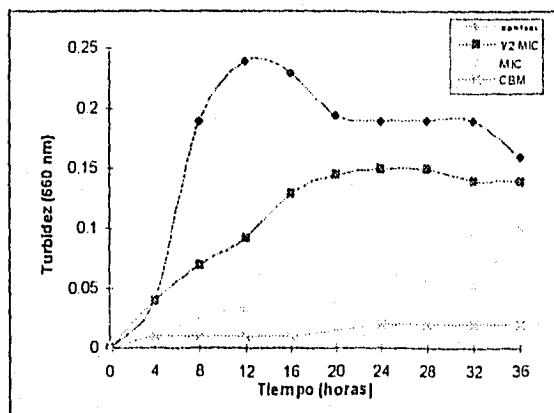
Tabla XII  
Efecto sobre el número de sobrevivientes de *Vibrio cholerae*  
expuesto al alcanfor

Tiempo (horas)	Número de sobrevivientes			
	C	$\frac{1}{2}$ MIC	MIC	CBM
0	$1.09 \times 10^7$	$1.09 \times 10^7$	$1.09 \times 10^7$	$1.09 \times 10^7$
6	$6.00 \times 10^7$	$6.00 \times 10^7$	$9.80 \times 10^6$	0
12	$7.30 \times 10^8$	$1.70 \times 10^8$	$1.40 \times 10^6$	0
18	$1.44 \times 10^9$	$6.30 \times 10^8$	$4.20 \times 10^6$	0
24	$1.68 \times 10^9$	$3.00 \times 10^8$	$6.00 \times 10^5$	0
30	$2.00 \times 10^9$	$3.70 \times 10^8$	$3.40 \times 10^6$	0
36	$2.10 \times 10^9$	$3.30 \times 10^9$	$2.10 \times 10^6$	0

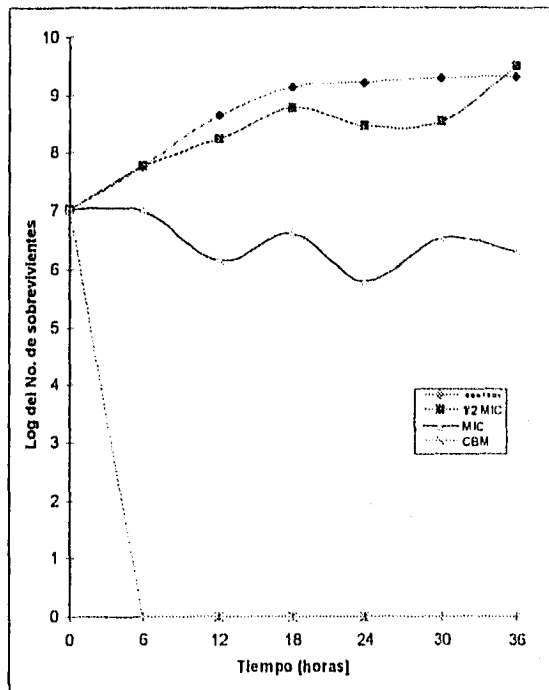
Tabla XIII  
Logaritmo del Número de Sobrevivientes

Tiempo (hs)	C	1/2 MIC	MIC	CBM
0	7.03	7.03	7.030	7.03
6	7.77	7.77	6.990	0
12	8.66	8.23	6.146	0
18	9.15	8.79	6.620	0
24	9.22	8.47	5.778	0
30	9.30	8.56	6.530	0
36	9.32	9.52	6.300	0

GRAFICA 4  
EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *V. cholerae*  
EXPUESTA AL ALCANFOR.



GRAFICA 5  
EFECTO DEL ALCANFOR SOBRE EL NUMERO DE  
SOBREVIVIENTES DE *V. cholerae*.



## VII. CUANTIFICACION DE LA CONCENTRACION DEL PRINCIPIO ACTIVO AISLADO DE LOS ACEITES ESENCIALES.

La determinación de la concentración de alcanfor presente en ambos aceites se hizo mediante cromatografía de gases. Los resultados indicaron que el aceite esencial de *L. caulescens* presenta un 10.27 % de alcanfor y 26.64 % el *T. parthenium*. Cabe hacer notar que estos resultados se restringen a los aceites esenciales de ambas plantas colectadas en un lugar y una fecha específica (ver método y resultados preliminares). Los cromatogramas se muestran en las figuras 9, 10 y 11.

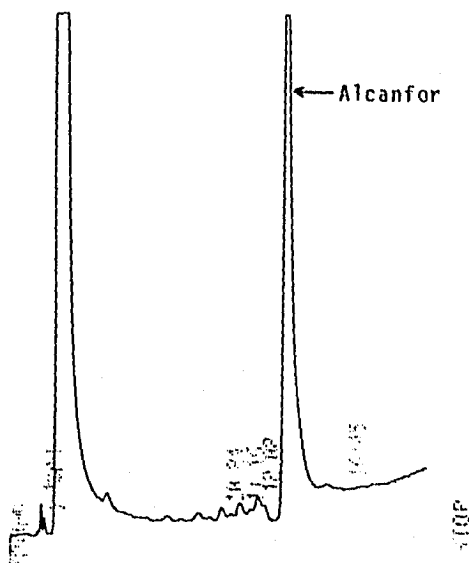


FIGURA 9: CROMATOGRAMA DEL ALCANFOR

FIGURA 10  
CROMATOGRAMA DE *L. caulescens*

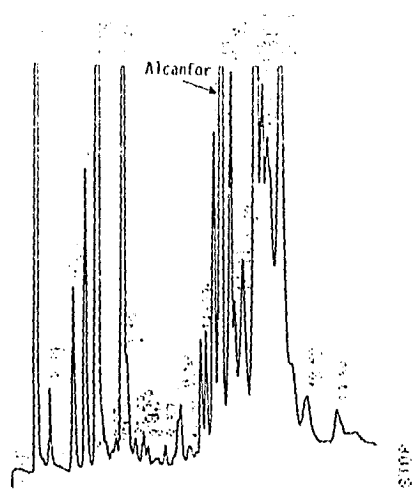
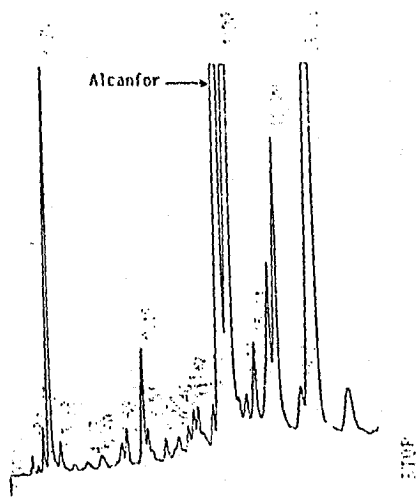


FIGURA 11  
CROMATOGRAMA DE *T. parthenium*.



## DISCUSION

En la fase inicial del presente estudio, se tuvo que realizar una labor de persuasión importante, pues es conocido, que para poder obtener información etnobotánica confiable y verdadera, se requiere entablar amistad con los curanderos, en este caso, con los miembros de la Organización de Médicos Indígenas Purépecha. Esta labor de "acercamiento" se logró después de varias visitas a la región de Pátzcuaro, en el Estado de Michuacán.

En cuanto al uso de plantas por los purépecha para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales de probable origen infeccioso, parece ser, que en general, ellos no utilizan combinaciones de plantas; esto facilitó en parte el estudio fitoquímico microbiológico de los preparados herbales activos.

La época de colecta es un factor importante para el estudio de las plantas medicinales; pues ya se ha comprobado que los vegetales biosintetizan metabolitos secundarios en diferentes fases de su desarrollo y también en diferentes estaciones del año en relación directa a los cambios medioambientales. En el presente estudio, se utilizaron plantas que de acuerdo a la información etnobotánica ya era permisible usarlas para su evaluación antibacteriana preliminar a excepción de *L. caulescens* que se colectó antes de la temporada recomendada para su uso, a pesar de ello el preparado herbal hecho a partir de esta planta resultó ser activo, probablemente, la temporada de colecta de esta planta no sea un factor limitante para determinar su actividad. Cabe hacer notar, que a partir de ejemplares obtenidos en la colecta secundaria, se realizó el trabajo de aislamiento del principio activo y esta recolecta se realizó en la época que recomiendan los purépecha. En los bioensayos preliminares se evaluaron *in vitro* los preparados herbales que fueron preparados de la manera más similar posible a como lo realizan los purépecha. Sólo dos plantas fueron activas *in vitro*; coincidentemente, las dos se preparan en formas de infusión. Se decidió proseguir el trabajo de investigación con los aceites esenciales, ya que en ellos se evidenció la actividad antibacteriana,



esto podría explicar el efecto antibacteriano de las infusiones, pues éstas se preparan de tal forma que hace posible que posean cantidades pequeñas de aceites esenciales en suspensión, no así la preparación por cocimiento, que implica la evaporación de las sustancias volátiles.

Las tablas II y III muestran que los halos de inhibición mayores los presentaron las cepas de *V. cholerae*, también se observa que en unos casos existen desviaciones estándar relativamente grandes, esto podría atribuirse a efectos de difusión puesto que los aceites difunden sobre el agar de manera mecánica y no por gradiente de solubilidad (a diferencia de muchos antibióticos que difunden por este efecto), de tal forma que la difusión de un ensayo a otro puede variar de manera significativa; respecto a este fenómeno, Janssen A.M. y cols. (1986) han realizado investigaciones que explican estos hechos y han concluido que las diferencias en los diámetros de los halos de inhibición cuando se evalúan aceites esenciales por la técnica de difusión en agar se debe a que existen cambios químicos en los componentes de dichos aceites, ya sea por oxidación o por combinación con los componentes del agar, que el coeficiente de difusión de las sustancias cambie durante el experimento debido a la volatilidad, que los aceites contengan un exceso de hidrocarburos monoterpénicos y que el agua presente en el agar afecte la difusión horizontal de todos los componentes de los aceites (por efecto de hidrofobicidad de dichos hidrocarburos).

Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y bactericidas medias (CBM) de igual manera fueron menores para las cepas de *V. cholerae*. Cabe hacer notar que ambos valores de CMI y CBM en el caso de estas cepas se encuentran muy cercanas entre sí, este fenómeno se debe a dos factores: en primer lugar a que la bacteria pueda ser muy sensible a los aceites esenciales y en segundo lugar a que la difusión en medio líquido (prueba de dilución en caldo) para determinar CMI y CBM sea más homogénea.

En cuanto a la curva de supervivencia que se presenta en la gráfica 1; a las 5 horas ya no hay sobrevivientes cuando las bacterias se desafían con una dosis igual a la CMI de los aceites esenciales de ambas plantas. Este efecto es significativo, si se toma en cuenta que el inóculo inicial es relativamente grande. Las gráficas 2 y 3 muestran las curvas de regresión correspondientes para cada aceite esencial, en ambos casos, la regresión manifiesta rectas con un factor de

corrección aceptable; sin embargo, en las curvas experimentales se observa que hay una variación significativa en la pendiente a partir de la cuarta hora. Este tipo de curvas son conocidas como de impacto múltiple e indican que la sensibilidad del microorganismo depende de la capacidad de penetración de la sustancia o las sustancias químicas inactivantes presentes en los aceites hacia el interior de la célula (Davis, Dulbecco, 1984).

Respecto a la separación del principio activo, se tuvieron que usar fases móviles distintas en los sistemas cromatográficos usados para la separación de los componentes de cada aceite, por ello se cree que aunque se aisló el mismo compuesto activo de ambos aceites, los demás componentes en su mayoría podrían ser diferentes.

El compuesto activo aislado, el alcanfor, ya ha sido reportado como antibacteriano, (Tyler, Brady, and Robbers, 1988) los parámetros físicos así como espectrales del compuesto aislado coinciden con los reportados por la literatura. La cantidad de este compuesto presente en cada uno de los aceites esenciales fue calculada por cromatografía de gases, en el caso del aceite de *L. caulescens* el alcanfor está presente en 10.3 % y en el caso del aceite de *T. parthenium* en un 26.6 %. Esta diferencia se podría deber a que la biosíntesis de los terpenos cíclicos, como el alcanfor, está determinada por la presencia y actividad de las ciclasas de monoterpenos, enzimas que se producen en células glandulares vegetales y que se sintetizan dependiendo de estímulos externos tales como la radiación solar, la temperatura, humedad relativa y de las propiedades del suelo donde crece la planta, ya que estas enzimas son dependientes de iones  $Mn^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  de tal forma que en suelos carentes de estos, las plantas normalmente productoras de monoterpenos cíclicos producen menos cantidades de estos compuestos (Croteau, R. 1988).

La tabla X indica que la cepa menos sensible al alcanfor fue el microorganismo aislado de un caso clínico, aunque se tendría que realizar más investigación para explicar este hecho. Cuando se desafió *V. cholerae* (t) a diferentes concentraciones de alcanfor, se observa que este tiene efectos sobre el crecimiento del microorganismo (gráfica 4) observándose que los microorganismos expuestos a este químico describen una fase exponencial menos vertical que el control, y en todos los casos se alcanza una fase estacionaria numéricamente menor en relación al mismo control.

Esto indica que el alcanfor a dosis subletales impide que las bacterias se multipliquen de manera normal.

En cuanto a la curva de supervivencia de *V. cholerae* expuesto al alcanfor (gráfica 5) la concentración mínima inhibitoria tiene un efecto bacteriostático puesto que en el transcurso del experimento no se evidenció un efecto significativo drástico de muerte celular de *V. cholerae*, este fenómeno llama la atención si se compara este hecho con el efecto que tienen los aceites esenciales completos de ambas plantas sobre el mismo microorganismo donde se observa que a una dosis igual a la concentración mínima inhibitoria hay muerte celular utilizándose un inóculo aproximadamente 100 veces mayor (gráfica 1): Probablemente la explicación radica en que pudiese haber un efecto sinérgico entre el alcanfor y alguno o varios de los compuestos presentes en los aceites, de hecho, este fenómeno ha sido comprobado por Kubo, I. (1993), quien demostró que los monoterpenos comunes en los aceites esenciales de muchas plantas como el linalol y el  $\alpha$ -cadineno que poseen poca actividad antimicrobiana, potencian su actividad cuando se evalúan junto con otros monoterpenos como el borneol o con otros compuestos no terpénicos como el indol, así mismo, en algunos casos la combinación de terpenos aumenta 250 veces la actividad en comparación a cuando son evaluados individualmente.

En el presente trabajo se logró aislar e identificar un compuesto activo (el alcanfor) pero existe la posibilidad de que existan más sustancias activas, especialmente en el aceite de *L. canlesvens* que presentó una fracción activa además de la que contenía el alcanfor (tabla VII), desafortunadamente la cantidad de esta era tan pequeña que no se pudo estudiar químicamente.

## CONCLUSIONES

- 1 De las plantas evaluadas, las infusiones de *Lepechinia caulescens* y *Tanacetum parthenium* presentaron actividad antibacteriana.
- 2.- La actividad anti- *Vibrio cholerae* está presente en el aceite esencial de ambas plantas.
- 3.- Uno de los principios activos presentes en los aceites esenciales de ambas plantas es el alcanfor.
- 4.- La cepa menos sensible a los aceites esenciales y al alcanfor fue *V. cholerae* aislada de un caso clínico.
- 5.- El alcanfor es menos activo que los aceites esenciales completos, probablemente este fenómeno se deba a efectos de sinergia.

## APENDICE

### I. CUANTIFICACION DE SOLIDOS SOLUBLES (González y Peñalosa, 1981).

Esta técnica se utiliza para cuantificar sólidos en solución o en suspensión en agua; la metodología empleada fue la siguiente:

- a). Pesar en la balanza analítica determinada cantidad de muestra (en este caso 10 g de la infusión o de cocimiento).
- b). Secar a 100-110 °C en una estufa de vacío durante 24 horas. La estufa de vacío que se usó es de la marca Lab-Line DUO-VAC, Modelo N° 5610 con control de termostato y se trabajó a un vacío de 10 pulg. Hg.
- c). Esperar a que se enfríe. Pesar en balanza analítica. La balanza analítica que se utilizó fue una Mettler, Modelo H10.
- d). Colocar la muestra nuevamente en la estufa a 100 °C y dejarla otras 10 horas.
- e). Enfriar a temperatura ambiente y pesar nuevamente.

Cuando fue necesario, se repitió toda la operación hasta que el peso se mantuvo constante.

Los sólidos se calcularon por diferencia entre el peso de la muestra con o sin agua.

## II. METODO DE DIFUSION EN AGAR O DE KIRBY-BAUER

(Barry y Thornsberry, 1987; Vanden Berghe y Vlietnick, 1991).

Este método se utilizó para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los preparados herbales, los aceites esenciales y las fracciones producto de las separaciones cromatográficas, la metodología fue la siguiente:

**MEDIO.** Se ha seleccionado como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton (Bioxon H10-I), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral, aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

**INOCULO.** Con un hisopo estéril de poliéster se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante al de los microorganismos a ensayar (*Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella dysenteriae*, etc.). Se sumerge el hisopo en 3 ml de caldo tripteína soya (Bioxon III), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el hisopo. Incubar el tubo de cultivo a 37°C durante aproximadamente 2 a 3 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias/ml.

El estándar 0.5 de McFarland se prepara añadiendo 0.5 ml de sulfato de bario a 99.5 ml de  $H_2SO_4$  0.36 N. (Hendrickson, 1987). La comparación de la turbidez entre el estándar y el caldo con el organismo en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o en su defecto en un espectrofotómetro (Spectronic 21 Milton Roy) a 660 nm.

Si la suspensión de organismos es menos turbia que el estandar, se añade solución salina hasta igualarlas. Una vez logrado esto, se sumerge un segundo hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlo se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocular la superficie de una placa de agar de Müller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente, es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, la placa de Müller-Hinton está lista para la aplicación de las muestras a las que se les evaluará su actividad antibacteriana.

**APLICACION DE SUSTANCIAS.** Para este caso, se utilizaron cilindros de acero inoxidable USP (United States Pharmacopeia) y sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel whatman del N° 5 (los cilindros se utilizaron durante los bioensayos preliminares, y cuando se bioensayaron los aceites esenciales; los sensidiscos se utilizaron para evaluar biológicamente las fracciones separadas mediante cromatografía). En todos los casos se hicieron las diluciones necesarias para que los cilindros y los sensidiscos llevaran la cantidad deseada de producto.

Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los cilindros o los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril; los cilindros deben colocarse por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los cilindros se deben presionar suavemente con una punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Sobre cada cilindro se coloca la concentración de cada extracto a evaluar.

**PREPARACION DE MUESTRAS.** Para el bioensayo preliminar el vehículo fue agua destilada; cuando se evaluaron los aceites esenciales, estos se colocaron tal cual en la superficie de las placas, sobre los cilindros. En cuanto a la evaluación de las fracciones, los sensidiscos se

impregnaron con soluciones valoradas de las muestras hasta llegar a la concentración deseada de sustancia por disco; en este caso, se utilizaron solventes como el metanol y el cloroformo para solubilizar los compuestos, para posteriormente impregnar los discos dejando evaporar el solvente durante 12 horas

**CONTROLES NEGATIVOS.** Se utilizó agua destilada para los bioensayos preliminares, aceite de oliva estéril cuando se evaluaron los aceites esenciales, discos a los que se les agregó metanol o cloroformo y que se dejaron evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

**CONTROL POSITIVO.** Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales a sensidiscos con antibiótico para bacterias Gram-negativas (Bigaux) encontrándose que kanamicina presentaba halos de inhibición dentro de los límites de susceptibilidad reportados (Barry y Thornsberry, 1987), debido a esto, se utilizaron discos de kanamicina de 30 µg (Bigaux E-03).

**INCUBACION.** Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad, se les colocó en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35 °C, sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>. Es preciso evitar presión de CO<sub>2</sub> debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Asimismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición. Se incuban siempre placas con discos sin sustancia a evaluar como control (control negativo).

**INTERPRETACION DE RESULTADOS.** Las zonas de inhibición se midieron con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hizo por triplicada y se reportaron los valores promedio.



### III. DETERMINACION DE CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA (CMI) Y DE CONCENTRACION BACTERICIDA MEDIA (CBM).

#### METODO DE MACRODILUCION EN CALDO (Jones et al., 1987)

##### a). PREPARACION DE REACTIVOS Y DILUCIONES.

La solución antimicrobiana de trabajo se prepara diluyendo la droga en el caldo de Müller-Hinton a la mayor concentración final deseada. La prueba se realiza en tubos de ensayo de 13 por 100 mm con tapa de rosca o con taponés de algodón. Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos, del modo siguiente: Se colocan 2 ml de solución de trabajo de la droga en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes es añadido 1 ml de caldo de Müller-Hinton. Con una pipeta esterilizada se transfiere 1 ml del primer tubo al segundo. Después de mezclar bien el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 ml con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al tercer tubo. El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml que se descarta. El último tubo no recibe agente antimicrobiano y sirve de control de crecimiento. Las concentraciones finales de antimicrobianos en esta prueba son iguales a la mitad a la serie inicial de dilución, debido al agregado de una concentración igual de inóculo en caldo.

##### b). INOCULACION E INCUBACION DE LOS TUBOS

Se prepara un inóculo que contenga  $10^6$  a  $10^7$  UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utiliza el estándar 0.5 de McFarland y diluyendo luego 1:200 en caldo). Añadir a cada tubo, 1 ml del inóculo ajustado. Incubar los tubos a 35 °C durante 16 a 20 horas. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO<sub>2</sub> a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo.

#### c). INTERPRETACION DE RESULTADOS

La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM). Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se considera evidencia de que la droga ha sido incapaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

#### d). DETERMINACION DE LA CONCENTRACION BACTERICIDA MEDIA (Finogold y Jo Baron, 1989).

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un organismo se realiza la prueba de actividad bactericida que emplea el mismo sistema de dilución en caldo. Cuando la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento inmediatamente después de ser sembrado, la cual se inocula en una placa de agar de Müller-Hinton para determinar el número real de unidades formadoras de colonia (UFC) del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la inoculación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación del factor de dilución.

Luego que se ha determinado la CIM, se siembra en placas de agar Müller-Hinton una cantidad conocida del inóculo (usualmente 0.1 ml) tomado de cada uno de los tubos de caldo que no presentaban turbidez luego de la incubación. El número de colonias que se desarrolla en estos subcultivos luego de incubar durante 18 horas se compara con el número de UFC/ml del cultivo original. En aquellos tubos que no presentaban turbidez, algunos microorganismos pueden permanecer viables. Debido a que incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0.1 % del inóculo original, se denomina Concentración Bactericida Media (CBM).

#### IV. CURVA LETAL (Curva de Supervivencia y efecto sobre el crecimiento).

( Kubo, 1993; Shoenknecht et al., 1987).

El crecimiento de *V. cholerae* se investigó mediante medidas (en caldo Müeller-Hinton) de turbidez y conteo de células viables de la bacteria sometida a las drogas vegetales.

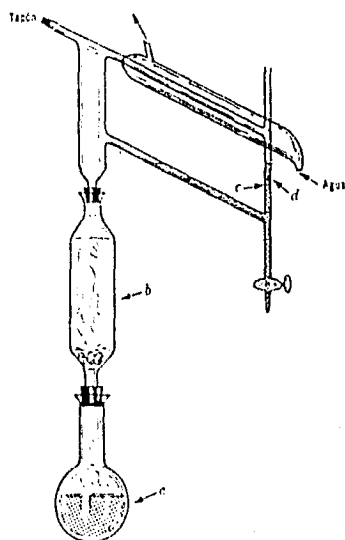
El desarrollo fue el siguiente:

1. Preparar y rotular por lo menos un tubo con el extracto problema, para muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora, hasta las 6 horas. A partir de este muestreo, se preparan tubos para realizar lecturas cada 6 horas.
2. Preparar y rotular un tubo sin antimicrobiano que sirva como control del desarrollo.
3. Se prepara el inóculo, con aproximadamente  $3 \times 10^8$  bacterias/ml en un tubo de ensayo con 10 ml de caldo Müeller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un período de 12-18 horas de incubación).
4. Inocular con ayuda de una micropipeta 0.1 ml de la suspensión de bacterias en los tubos que contienen el antimicrobiano (este estará a una concentración igual a la concentración bactericida media) y sus múltiplos medios; esto es, la MIC, la mitad de la MIC, etc. La concentración final debe ser aproximadamente de  $3 \times 10^6$  bacterias/ml de caldo en cada tubo. Incubar en una estufa sin presión de  $\text{CO}_2$ .
5. Muestrear cada hora durante las 6 primeras horas, además se realizan diluciones para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo, a partir de este tiempo se muestrea cada 6 horas. Concomitantemente, se lee en el espectrofotómetro cada 2 horas a 660 nm. La duración del experimento es de 24 a 36 horas.

## V. OBTENCION DE ACEITES ESENCIALES

(Charlwood and Charlwood, 1991; Dominguez, 1973).

Los aceites esenciales se obtuvieron por la técnica de destilación por "arrastre de vapor" a partir de material vegetal lo más fresco posible, en este método se explota la característica que poseen las esencias de presentar bajas presiones de vapor y por lo tanto pueden ser arrastradas por sustancias que poseen presiones de vapor más altas. El aparato que se utilizó es el siguiente:



Empleando este aparato se pueden destilar por arrastre de vapor continuo de 100 a 500 g de planta fresca, con buena recuperación de esencia. Sin embargo, para poder obtener la cantidad adecuada para llevar a cabo la presente investigación fue necesario montar varias unidades. En caso de que el rendimiento sea muy bajo, se puede colocar en "d" un poco de éter etílico para obtener la esencia y el destilado, se colecta la esencia o la mezcla esencia-éter, se refrigera a 0 °C durante 24 horas para separar el éter de la mezcla. La cantidad de aceite se puede medir en una micropipeta (Dominguez, 1973).

## AI SLAMI ENTO

Para separar los compuestos activos, se procedió a determinar la mezcla de solventes (fase móvil) y el soporte (fase estacionaria) para obtener la mejor separación en cromatografía de placa fina y así poder extrapolar estos resultados en el montaje de la cromatografía de columna. Una vez determinado el sistema cromatográfico se procedió a la separación de fracciones. Las fases móvil y estacionaria para separar los componentes de cada una de las plantas activas se exponen en los resultados, así como las subsecuentes separaciones cromatográficas hasta la obtención de los principios activos. En todos los casos de separación por placa fina se utilizaron cromatofolios de gel de sílice Merck (Kieselgel 60-5553); para las cromatografías en columna se utilizó sílica gel de malla 70-230 (Sigma 5-2509).

## ELUCIDACION DE ESTRUCTURAS

La elucidación de estructuras del compuesto puro se lleva a cabo mediante determinación de parámetros físicos (punto de fusión) y espectroscópicos en el ultravioleta, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de protones y  $^{13}\text{C}$ . El punto de fusión se determinó en un aparato Fisher-Johns. El espectro ultravioleta se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda II; el solvente usado fue metanol grado HPLC (Aldrich 27, 047-4). Los espectros de RMN $^1\text{H}$  y RMN $^{13}\text{C}$  se obtuvieron en un Varian Gemini 200A.

El espectro de masas se determinó en un espectrómetro de masas Jeol JMS-Sx 102A con base de datos. La muestra se analizó por introducción directa.

## BIBLIOGRAFIA

Anand, N. and Nithyawand, S. (1984). Integrated approach to development of new drugs from plants and indigenous remedies. In: Natural Products and Drug Development. Alfred Benzon Symposium 20. Edited by Krogsgaard-Larsen, Christensen, and Kofod. Munksgaard Copenhagen. Pp. 78-92.

Anon (1986). UNIDO Document: 10/R.219. Pharmaceutical industry development in developing countries and the concept of total quality control. United Nations Industrial Development Organization. Vienna, Aus.

Asakawa, Y. (1990). Terpenoids and aromatic compounds with pharmacological activity From bryophytes . In: Bryophytes. Their Chemistry and Chemical taxonomy. Edited by Zinneister, H.D. Clarendon Press. Oxford England. Pp. 394-397.

Atlas, R.M. and Bartha, R. (1981). Microbial Ecology: Fundamentals and Applications. Addison-Wesley Pub. Co. London, England. Pp. 270-272.

Barret, T.J. and Blake, P.A. (1991). Epidemiological use fulness of changes in haemolytic activity of *Vibrio cholerae* biotype El Tor during the seventh pandemic. J. Clin. Microbiol. 13(1): 126-129.

Barry, A.L. y Thornsberry, C. (1987). Pruebas de susceptibilidad: Técnicas para pruebas de difusión. En: Manual de microbiología clínica. 4ª Edición. Editado por Lennette, E.H. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Bauman, P. and Shubert R. (1984). Selection 5. "Facultative anaerobic Gram negative rods, Family II Vibrionaceae" P.R. 516-550. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1 J.G. Holt and N.R. Krieg (Eds.) Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Beeber, L.W., Alvez da Silva, A. Correa, L.R., De Andrade, A., Carneiro Do Nascimento, S. De Souza, I., Mello, J.F., and Jürgen, H. (1986). Anticancer and antimicrobial glycosides from *Ipomoea bahiensis*. *Phytochemistry*. 25 (5): 1077-1081.

Brock, T.D. (1978). *Biología de los microorganismos*. Ediciones Omega. Barcelona, España. Pp. 488-491.

Bustamante, M. E. (1982). La situación epidemiológica de México en el Siglo XIX. En: *Ensayos sobre la historia de las epidemias en México*. Colección Salud y Seguridad Social: Serie Historia Tomo II. IMSS. México, D.F. p. 465.

Castiglioni, A. (1941). La medicina de los pueblos del extremo oriente. En: *Historia de la Medicina*. Editado por Castiglioni, A. Salvat Editores. Barcelona, España. Pp. 97-105.

Clewell, D.B. (1981). Plasmids, drug resistance and the gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiological Review*. 45 (40a): 25-32.

Charlwood, B.V. and Charlwood, K.A. (1991). Monoterpenoids. In: *Methods in plant biochemistry*. Vol. 7 "Terpenoids". Edited by Charlwood, B. and Banthorpe, D.V. Series editor Dey P.M. Academic Press. San Diego, Ca. USA. Pp. 80-83.

Croteau, R. (1988). The biogenesis of terpenoids. *ISI. Atlas of Sci. Biochem.* (1), 182-188.

Davis, B.D. y Dulbecco, R. (1984). Aspectos cuantitativos de la acción letal de las radiaciones. En: *Tratado de microbiología*. Editado por Davis, B.D. y Dulbecco, R. 3ª Edición. Salvat Editores Barcelona, España. Pp. 175-176.

Domínguez X.A. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial LIMUSA. México, D.F. México. Pp. 229-239.

Elwell, L.P. and Shipley, P.L. (1980). Plasmid mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Annual Review of Microbiology*. Academic Press. 34: 465-496.

Farnsworth, N.R., Akerele, O., Bingel, A.S., Soejarto, D.D., and Guo, Z. (1985). The current importance of plants as a source of drugs. *Bull. WHO.* 63(6): 965-981.

Finegold, S.M. y Jo Baron, E. (1989). Métodos para evaluar la efectividad antimicrobiana. En: *Diagnóstico microbiológico. 7ª Edición*. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. Pp. 191-210.

Finkelstein, R.A. and Dorner, F. (1985). Cholerae enterotoxin cholerae. *Pharmacol. Ther.* 27: 34-47.

Fischer, N.H. (1991). Sesquiterpenoid lactones. In: *Methods in Plant Biochemistry. Vol. 7 "Terpenoids"* Edited by Charlwood, B.V. and Banthorpe, D.V. Series. Editor Dey, P.M. Academic Press. San Diego, Cal. USA. Pp. 187-210.

Forbes, B.A. and Shaberg, D.R. (1983). Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: Evidence for conjugative exchange of resistance. *Journal of Bacteriol.* 153 (627): 45-51.

García Zúñiga, A. (1985). Labiatae. En: *La Flora Fanerogámica del Valle de México*. Editado por Rzedowski, J. Vol II. ENCB,IPN. México. Pp. 295-296.

Giono, C.S. (1991). Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* 01. Publicación Técnica del INDRE No. 10. Secretaría de Salubridad. México.

González, M.S. y Peñalosa, C. I. (1981). Manual de Biomoléculas. ENEP Iztacala, UNAM México.

Gören, N., Jakupovic, J. and Topal, S. (1990). Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum argyrophyllum* var. *argyrophyllum*. *Phytochemistry* 29 (5): 1467-1469.

Gören, N., Bozok-Johansson, C., Jakupovic, J., Lin, L., Shieh, H., Cordell, G.A., and Celik, N. (1992). Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum densum* Subsp. *sivasicum*. *Phytochemistry* 30 (1): 101-104.



Guiney, D.G. (1986). Resistance to antimicrobial drugs. In: Infections Diseases and Medical Microbiology . 2<sup>nd</sup> Edition. Edited by Brande, A.W.B. Saunders Co. Philadelphia, Penn. U.S.A. Pp. 210-212.

Hamburger, M. and Hostettman, K. (1991). Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30(12): 3864-3874.

Hammerschmidt, F.J., Clark, A.M., Soliman, F.M., El-Kashoury, E.A., Abd El-Kawy, M.M., and El-Fishawy, A.M. (1993). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Jasomia candidans* and *J. montana*. *Planta Médica*. 59: 68-70.

Hendrickson, D.A. (1987). Reactivos y Colorantes. En: Manual de microbiología clínica. 4<sup>a</sup> Edición. Editado por Lennette, E.H. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 1356.

Holmgren, J. (1982). Pathogenesis and prevention of cholera. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 36:58-645.

INDRE (1991). Manual de *Vibrio cholerae* O1. S.S.A. México, D.F. México 12 p.

Janssen, A.M., Scheffer, J.J.C., and Svendsen, B. (1986). Antimicrobial screening of essential oils - aspects of the agar overlay technique. En: *Progress in essential oil research*. Editado por Brunke, E.J. Walter de Gruyter. Berlin. Alemania. Pp. 401-419.

Jones, R.N., Barry, A.L., Gavan, T.L., and Washington II, J.A. (1987). Pruebas de susceptibilidad: Técnicas de microdilución y macrodilución en caldo. En: Manual de microbiología clínica. 4<sup>a</sup> Edición. Editado por Lennette, E.H. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 1206-1212.

Kasai, S., Watanabe, S., Kawabata, J., Tahara, S., and Mizutani, J. (1992). Antimicrobial catechin derivatives of *Argrimonia pilosa*. *Phytochemistry*. 31 (3): 787-789.

Khan, K.A. and Shoeb, A. (1984). Two antibacterial biphenyls from *Rhynchosia suaveolens*. *Phytochemistry*. 23 (4): 765-766.

Kleckner, N. (1981). Transposable elements in prokaryotes. *Annual Review of Genetics*. 15: 341-404.

Konishy, K., Ito, C., and Kanbara, H. (1987). Tannic acid in membranes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 35: 1169.

Kubo, I. (1993). Antimicrobial activity of green tea flavor components. In: *Bioactive volatile compounds from plants*. Edited by Teranishi, R. and Buttery, R.G. American Chemical Society Washington, D.C. USA. Pp. 57-70.

Masuda, T., Inazumi, A., Yamada, Y., Padolina, W.G., Kikuzaki, H., and Nakatani, N. (1991). Antimicrobial phenylpropanoids from *Piper sarmentosum*. *Phytochemistry*. 30 (10): 3227-3228.

Mellado, C.V., Sánchez, A., Femia, P., Navarro, G., Erosa, E., Bonilla, D.M., y Domínguez, M.S. (1994). *La medicina tradicional de los pueblos indígenas de México*. Vol. III Editado por Zolla, C. Instituto Nacional Indigenista. Pp. 665-689.

Mills, T. and Roberson, C.J. (1987). *Instrumental data for drug analysis*. Vol. I, Second Edition. Elsevier. New York, USA. Pp. 302-303.

Mitscher, L. A., Gollapudi, S.R., Khanna, I.K., Drake, S.D., Hanumaiah, T., Ramaswamy, T., and Rao, K.V.J. (1985). Antimicrobial agents from higher plants activity and structural revision of flemiflavanone-D from *Flemingia stricta*. *Phytochemistry*. 24 (12): 2885-2887.

Mitscher, L.A., Okwute, S.K., Gollapudi, S.R., Drake, S., Avona, E. (1988). Antimicrobial pterocarpanes of nigerian *Erythrina mildbraedii*. *Phytochemistry*. 27 (11): 3449-3452.

Mitscher, L.A., Gollapudi, S.R., Oburn, D.S., and Drake, S. (1985). Antimicrobial agents from higher plants: Two dimethyl benzosochromans from *Karwinskia humboldtiana*. *Phytochemistry*. 24 (8): 1681-1683.

- Moellering, R.C. (1990). Principios de terapia infecciosa. En: Enfermedades infecciosas. Editado por Mandell, G.L. et al. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. México. Pp. 214-221.
- Moffat, A.C. (1986). Clarke's isolation and identification of drugs. Second Edition. The Pharmaceutical Press. London, England. Pp. 442.
- Mori, A., Nishino, C., Enoki, N., and Tawata, S. (1987). Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*. 26 (8): 2231-2234.
- Mukerjee, S. (1978). "Principles and practices of typing *Vibrio cholerae*". *Methods in Microbiology*. 12: 51-115. Ed. T. Bergan and J.D. Morris. Acad. Press. N.Y. USA.
- Nakatani, N., Ikeda, K., Kikuzaki, H., Kido, M., and Yamaguchi, Y. (1988). Diaryldimethylbutane lignanes from *Myristica argentea* and their microbial action against *Streptococcus mutans*. *Phytochemistry*. 27 (10): 3127-3129.
- Nash, D.L. and Williams, L.O. (1976). Flora de Guatemala. Vol. 24 Part. XII. Field Museum of Natural History. Pp. 388.
- Nishizawa, K., Nakata, I., Kishida, A., Ayer, W.A., and Browne, L.M. (1990). Some biologically active tannins of *Nuphar variegatum*. *Phytochemistry*. 29 (8): 2491-2494.
- Nitao J. K., Nair, M.G., Thorogood, D.L., Johnson, K., and Scriber, J.M. (1991). Bioactive neolignans from the leaves of *Magnolia virginiana*. *Phytochemistry*. 30 (7): 2193-2195.
- Novic, R.P. and Morse, S.I. (1967). In vivo transmission of drug resistance factors between strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Experimental Medicine*. 125 (45): 35-40.
- Principe, P. (1989). Novel compounds for pharmaceuticals. In: Economic and Medicinal Plant Research. Edited by Farnsworth N.R. et al. Academic Press. London, England. Pp. 1-17.

- Ravn, H. and Brimer, L. (1988). Structure and antibacterial activity of plantanajoside, a caffeic acid sugar ester from *Plantago major* subsp *major*. *Phytochemistry*. 27 (11): 3433-3437
- Rzedowski, G.C. (1979). *Lepidium*. En: La Flora Fanerogámica del Valle de México. Editado por Rzedowski, J. Vol. I. Compañía Editorial Continental, S.A. México, D.F. México. Pp. 229-231.
- Rzedowski, J. y Rzedowski, G.C. (1985). *Calendulae*. En: La Flora Fanerogámica del Valle de México. Editado por Rzedowski J. Vol. II. ENCB, IPN. México, D.F. México. Pp 614-615.
- Sadtler Handbook of Proton Magnetic Spectrometry (1978). Sadtler. Vol. I. Heyden, Philadelphia.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30 (12): 3875-3883.
- Schmitt, A., Teliakalli, H., and Mitscher, L.A. (1991). Plicatin B, the antimicrobial principle of *Psoralea imnea*. *Phytochemistry* 30 (11): 3569-3570.
- Sepúlveda, J. (1992). Epidemiología y cólera. En: El Cólera: Epidemias y Pandemias. Editado por Kumate, J. et al. Interamericana-Mc Graw-Hill. México, D.F. México. Pp. 178-180.
- Sepúlveda, M.T. (1988). La medicina entre los purépecha. Editado por la UNAM. México, D.F. México. Pp. 117-167.
- Shoenknecht, F.D., Sabath, L.D., and Thornsberry, C. (1987). Pruebas especiales de susceptibilidad. En: Manual de Microbiología Clínica. Lennette, E.H. (ed.). 4ª edición. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 1239-1249.
- Skold, O. and Widh, A. (1974). A new dihydrofolate reductase with low trimethoprim sensitivity induced by an R-factor mediating high resistance to trimethoprim. *Journal of Biological Chemistry*. 249 (4324): 13-20.
- Tada, M. and Sakurai, K. (1991). Antimicrobial compound from *Cercidiphyllum japonicum*. *Phytochemistry*. 30 (4): 1119-1120.

- Tomás-Barberán, F., Iniesta-San Martín, E., Tomás-Lorente, F., and Rumbero, A. (1990). Antimicrobial phenolic compounds from three spanish *Helichrysum* species. *Phytochemistry* 29 (4): 1093-1095.
- Trace, B. (1993). *Tratado de Farmacognosia*. 15ª Ed. Editorial Interamericana, México, D.F. México. Pp. 730-732.
- Tyler, V.E.; Brady, L.R. and Robbers, J.E. (1988). *Pharmacognosy*. 9<sup>th</sup> Edition. Lea and Febiger. Philadelphia, USA. Pp. 124-126.
- Vanden Berghe, D.A. and Vlietnick, A.J. (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: *Methods in plant biochemistry*. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey-P.M. Academic Press. New York, USA. Pp. 47-71.
- Waage, S.K. (1984). A biologically active flavonoids from *Gossypium arboreum*. *Phytochemistry*. 23 (11): 2509-2511.
- Waage, S.K., Hedin, P.A., and Grimley, E. (1984). A biologically active procyanidin from *Machaerium floribundum*. *Phytochemistry*. 23 (12): 2785-2787.
- Wagner, H., Bladt, S., and Zgainski, E.M. (1990). *Plant drug analysis*. Elsevier. Berlin Germany. Pp. 11-53.
- Wang, Y., Hamburger, M., Gueho, J., and Hostettmann, K. (1989). Antimicrobial flavonoids from *Psiadia trinervia* and their methylated and acetylated derivatives. *Phytochemistry* 28 (9): 2323-2327.
- Wijesekera, R.O.B. (1991). Plant-derived medicines and their role in global health. In: *The Medicinal Plant Industry*. Edited by Wijesekera, R.O.B. Pp. 1-17.
- Willets, N. and Skurray, P. (1980). The conjugation system of F-like plasmids. *Annual Review of Genetics*. Academic Press. 14: 14-41.

Zimmermann, W. (1980). Penetration of  $\beta$ -lactam antibiotics into their target enzymes in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of highly sensitive mutant with its parent strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18 (94): 13-28.