



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

Estudio comparativo de la actividad antibacteriana de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. de dos localidades: San Rafael Coxcatlán, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I Ó L O G A  
P R E S E N T A  
ROCIO SERRANO PARRALES

DIRECTORA DE TESIS  
M. EN C. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

La presente investigación se realizó en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM, con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

## AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Margarita Canales Martínez por dirigir y asesorar este trabajo, así como por brindarme su apoyo y por aportar sus conocimientos e ideas en todo momento, pero principalmente por brindarme su amistad.

A la M. en C. Claudia Tzasná Hernández Delgado, por colaborar incondicionalmente en el desarrollo de este trabajo, por sus valiosos comentarios y conocimientos, por hacer de la estancia en el laboratorio momentos muy gratos gracias a su buen humor, pero igualmente por brindarme su amistad.

Al Dr. Guillermo Ávila Acevedo, por permitir que esta investigación se elaborara en las instalaciones del laboratorio a su cargo, por aportar sus conocimientos y por la revisión de este trabajo.

A la Biol. Edith López Villafranco y al Dr. Rafael Lira Saade por la revisión de este trabajo y por sus comentarios y sugerencias de la parte botánica del mismo.

Y a todos los profesores y compañeros del laboratorio que de una u otra manera colaboraron en la realización de este trabajo aportando conocimientos y comentarios para enriquecerlo.

A mis padres por apoyarme en los momentos más difíciles de la carrera y por escucharme cuando más lo necesitaba.

A mis hermanos Cecilia, Gilberto, Ma. de Jesús y Lulú por creer en mi y por apoyarme en las decisiones que he tomado.

A mis sobrinos Lalo, Arely y Brenda, que me han impulsado, sin saberlo, a seguir adelante ya que lo que hago vale la pena por personitas como ellos.

A Israel, por apoyarme y brindarme su cariño y por impulsarme a seguir más allá de donde he llegado.

Y a todos mis compañeros y amigos Fany, Salomé, Roberto, Omar, Claudia, Xochitl, Adrián, Elisa, Jose, Daniela, Alma, Francisco, Ana, Juan y a todos aquellos que se me hayan pasado, ya que colaboraron para mi crecimiento personal y profesional.

**ÍNDICE GENERAL**

Índice general.....I

Índice de gráficos y figuras.....II

Índice de tablas..... III

Abreviaturas utilizadas.....IV

Resumen.....V

Introducción..... 1

Antibióticos.....3

Mecanismos de resistencia.....6

Antimicrobianos de origen vegetal.....7

    Terpenos.....7

Familia Asteraceae.....12

Género *Gymnosperma* Less. ....14

*Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. Asteraceae.....15

Antecedentes.....19

Objetivos.....21

Áreas de colecta.....22

    San Rafael Coxcatlán, Puebla.....22

    Tepeji del Río, Hidalgo.....23

Material y métodos.....24

    1. Colecta de la planta.....24

    2. Bioensayos preliminares.....24

        2.1. Extracción por precolación.....24

        2.2. Microorganismos a utilizar.....24

        2.3. Evaluación de la actividad antibacteriana.....25

|   |    |
|---|----|
| 3. Evaluación cuantitativa.....   | 25 |
| 4. Aislamiento y elucidación de los principios activos.....   | 26 |
| 4.1. Aislamiento.....   | 26 |
| 4.2. Elucidación de estructuras.....  | 26 |
| 5. Pruebas estadísticas.....  | 26 |
| Resultados y análisis.....  | 27 |
| 1. Colecta de la planta.....  | 27 |
| 2. Bioensayos preliminares.....   | 27 |
| 3. Evaluación cuantitativa.....   | 31 |
| 4. Aislamiento y elucidación de los principios activos.....   | 34 |
| 4.1. Aislamiento.....   | 34 |
| 4.2. Elucidación de la estructura química. ....   | 38 |
| 5. Evaluación de la actividad antibacteriana del ácido<br>(-)-17hidrixi-neo-clerod-3-en-15-oico, aislado de la planta. .... | 48 |
| Discusión.....  | 49 |
| Conclusiones.....   | 53 |
| Anexo.....  | 54 |
| Regímenes de precipitación en San Rafael Coxcatlán y Tepeji del Río.....  | 54 |
| Apéndices.....  | 55 |
| Apéndice I.....   | 55 |
| Difusión en agar Kirby-Baüer.....   | 55 |
| Apéndice II.....  | 58 |
| Microtécnica de dilución en caldo.....  | 58 |
| Bibliografía.....   | 59 |

---



---

**ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS**

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. <i>Gymnosperma glutinosum</i> (Spreng). Less.....   | 17 |
| Figura 2. Detalle de la planta donde se muestra la forma de las hojas<br>y la resina en hojas y tallo.....  | 18 |
| Figura 3. Detalle de la inflorescencia de la planta donde se muestran<br>los conjuntos corimbiformes terminales.....                                      | 18 |
| Figura 4. Áreas de colecta y uso de <i>G. glutinosum</i> (Spreng.) Less.....  | 25 |
| Figura 5. HPLC de las fracciones polares del extracto hexánico.....   | 33 |
| Figura 6. HPLC de la fracción 1 obtenida al recristalizar el compuesto aislado de <i>G. glutinosum</i> .....  | 40 |
| Figura 7. Espectro de UV del compuesto con actividad antibacteriana<br>de <i>G. glutinosum</i> .....  | 41 |
| Figura 8. Espectro de IR del compuesto con actividad antibacteriana aislado de <i>G. glutinosum</i> .....   | 42 |
| Figura 9. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN <sup>1</sup> H) del<br>compuesto aislado de <i>G. glutinosum</i> .....                | 43 |
| Figura 10. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN <sup>1</sup> H) del<br>compuesto aislado de <i>G. glutinosum</i> .....               | 44 |
| Figura 11. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece (RMN <sup>13</sup> C)<br>del compuesto aislado de <i>G. glutinosum</i> .....         | 45 |
| Figura 12. Espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece (RMN <sup>13</sup> C)<br>del compuesto aislado de <i>G. glutinosum</i> .....         | 46 |
| Figura 13. Experimento DEPT del compuesto aislado de <i>G. glutinosum</i> .....   | 48 |
| Figura 14. Estructura química del ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico<br>aislado de <i>G. glutinosum</i> .....                                   | 49 |
| Gráfico 1. Actividad antibacteriana de las particiones del extracto hexánico de <i>G. glutinosum</i> sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas..... | 32 |

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plantas que contienen terpenos con actividad antibacteriana.....9

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas para los bioensayos.....27

Tabla 3. Datos etnobotánicos de la planta.....29

Tabla 4. Rendimiento de los extractos de *G. glutinosum*.....30

Tabla 5. Rendimiento de las particiones del extracto hexánico de *G. glutinosum*.....30

Tabla 6. Actividad antibacteriana de las particiones del extracto hexánico de *G. glutinosum*.....31

Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida Mínima de la fracción polar del extracto hexánico de *G. glutinosum*.....34

Tabla 8. Rendimiento de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de la fracción polar del extracto hexánico (San Rafael Coxcatlán).....36

Tabla 9. Actividad antibacteriana de las fracciones de la cromatografía en columna de *G. glutinosum* (San Rafael Coxcatlán).....38

Tabla 10. Rendimiento de las fracciones obtenidas al recrystalizar el compuesto aislado de *G. glutinosum*.....39

Tabla 11. Señales del espectro de resonancia magnética nuclear de carbono trece (RMN <sup>13</sup>C).....44

Tabla 12. Concentración Mínima Inhibitoria y Bactericida Mínima del ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico aislado de *G. glutinosum*.....50

**ABREVIATURAS UTILIZADAS**

|                      |  |
|----------------------|--|
| $\mu$                | Micras                                     |
| $\mu$ l              | Microlitros                                |
| AcOEt                | Acetato de etilo                           |
| CBM                  | Concentración Bactericida Mínima           |
| Cc                   | Caso clínico                               |
| CMI                  | Concentración Mínima Inhibitoria           |
| CCF                  | Cromatografía en Capa Fina                 |
| g                    | Gramos                                     |
| <i>G. glutinosum</i> | <i>Gymnosperma glutinosum</i>              |
| HPLC                 | Cromatografía Líquida de Alta Resolución   |
| IR                   | Infrarrojo                                 |
| Kg                   | Kilogramos                                 |
| L                    | Litro                                      |
| m.s.n.m.             | Metros sobre el nivel del mar              |
| MeOH                 | Metanol                                    |
| mg                   | Miligramos                                 |
| ml                   | Mililitros                                 |
| mm                   | milímetros                                 |
| Na                   | No activo                                  |
| ° C                  | Grados Centígrados                         |
| RMN <sup>13</sup> C  | Resonancia magnética nuclear de Carbono 13 |
| RMN <sup>1</sup> H   | Resonancia magnética nuclear de protones   |
| UV                   | Ultravioleta                               |

---

---

## RESUMEN

En la presente investigación se evaluó y comparó la actividad antibacteriana de la especie *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. colectada en San Rafael Coxcatlán, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo, para ello se obtuvieron los extractos de hexanos, acetato de etilo y metanol, los cuales mostraron diferencias en su rendimiento, siendo los de San Rafael Coxcatlán los de mayor porcentaje.

Los bioensayos se realizaron sobre 14 cepas bacterianas, 4 de ellas Gram positivas y 10 Gram negativas. Tomando en cuenta que el extracto hexánico, de la planta de San Rafael fue el que mostró mayor actividad antibacteriana, se realizó una partición de este para obtener la fracción polar y no polar del mismo. Al evaluar la actividad antibacteriana de las fracciones se obtuvieron halos de inhibición mayores en la fracción polar. Para el caso de la planta de San Rafael dicha fracción presentó actividad sobre *Sarcina. lutea*, *Staphylococcus. aureus*, *S. epidermidis*, *Shigella. boydii*, *Vibrio. cholerae* No. 01, *V. cholerae* caso clínico, *V. cholerae* INDRE 206, *Salmonella. typhi* y *Enterobacter. Agglomerans*; por su parte la de Tepeji actuó contra las mismas que San Rafael, además, contra *Bacillus. subtilis* y *Vibrio. cholerae Tor*. En el análisis estadístico se determinó que no existen diferencias significativas en la actividad de la fracción polar de ambas localidades.

En cuanto a los componentes presentes en las fracciones obtenidas del extracto hexánico se concluyó que en general poseen los mismos compuestos pero con diferente concentración. En la evaluación cuantitativa, la fracción polar de Tepeji del Río presentó valores de CMI y CBM menores que las mostradas por la planta de San Rafael.

Se aisló uno de los principios activos de la planta y mediante métodos de espectroscopía se determinó su estructura química, correspondiendo al ácido(-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico, el cual presentó actividad antibacteriana sobre *S. lutea*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. boydii*, *V. cholerae* No. 01, *V. cholerae* caso clínico, *V. cholerae* INDRE 206, *S. typhi* y *E. agglomerans*.

## INTRODUCCIÓN

Los productos naturales de origen vegetal son recursos renovables de uso múltiple para el hombre y a lo largo del desarrollo de las distintas culturas la relación entre las personas y el medio vegetal ha sido íntima y vital, ya que desde los tiempos más remotos la humanidad ha utilizado las plantas en su intento de curar las enfermedades y aliviar el sufrimiento físico, de esta manera todos los pueblos, a través de la historia han adquirido conocimiento sobre las plantas medicinales; estos conocimientos generalmente los han acumulado determinados individuos, sacerdotes, hechiceros, curanderos, etc., quienes los han transmitido de generación en generación a determinados aprendices y a sus descendientes (Domínguez, 1974; Hill, 1965).

Domínguez, (1974), menciona que los griegos y romanos difundieron ampliamente el uso de las plantas, ya que en la Biblia están descritas unas 200 plantas medicinales y sus aplicaciones. El Papiro de Ebers, escrito hace aproximadamente 3500 años, contiene descripciones de enfermedades e indicaciones para tratarlas con plantas, por ejemplo *Scilla maritima* la cual 1000 años después la empleaba Hipócrates que también conocía los usos del ajeno, cicuta, beleño, ruibarbo y manzanilla. En el año 372 a de C., Teofrasto escribió diez libros sobre la historia de las plantas; en ellos menciona los usos de la canela, el cornezuelo, el centeno, el apio y el helecho macho. En el año 77 a de C., Dioscórides escribió su "*De materia médica*" en la que menciona todas las plantas y medicinas conocidas por los griegos, esta fue considerada durante quince siglos la obra cumbre en Botánica y Farmacia. Plinio, escribió 47 volúmenes sobre Historia natural, en los cuales nombra entre más de mil, varias plantas medicinales aún en uso como son anís, alheña, casia y helecho macho (Domínguez, 1974).

Para México la tradición herbolaria se remonta a la época prehispánica y ésta se complementó con las plantas que fueron introducidas por los conquistadores europeos (Lozoya *et al.*, 1987). Actualmente en nuestro País se siguen utilizando las

plantas con propósitos curativos y debido a su distribución geográfica, cuenta con una gran riqueza florística lo que beneficia a la población mexicana, ya que alrededor del 25% utiliza la medicina tradicional, este porcentaje corresponde a 20 millones de personas aproximadamente (Hernández *et al.* 2003).

Considerando lo anterior, en los últimos años han crecido las investigaciones con el afán de encontrar drogas a partir de plantas medicinales de uso tradicional conocido (Tapia *et al.*, 2000) y en la actualidad casi el 25% de la medicinas de patente a nivel mundial tienen algún compuesto activo que tiene su origen en las plantas (Méndez, 1995), lo cual es de suma importancia ya que alrededor de 3 000 especies de plantas han sido reportadas con propiedades medicinales (Acosta, 1995) y el 95% de estas son especies silvestres (Ruiz, 2001). Muchas de ellas se han estudiado y se han reportado como poseedoras de propiedades antibacterianas, ya que poseen principios activos para este fin; estas sustancias pueden estar acumuladas al ataque de algún patógeno o producirse bajo condiciones de infección o estrés y le confieren a la planta una resistencia natural (Rubio, 1996).

Actualmente todavía falta realizar investigaciones sobre plantas que pueden ser fuente de nuevas drogas, puesto que sólo un pequeño porcentaje se ha investigado fitoquímicamente y la fracción sometida a pruebas biológicas es aún menor (Hamburger y Hostettmann, 1991).

De las plantas reportadas, 1024 son usadas para curar enfermedades del aparato digestivo en el tratamiento de diarreas infecciosas (Argueta *et al.*, 1994), lo cual resulta de importancia ya que en nuestro país, la enteritis y otras enfermedades diarreicas ocupan una de las más importantes causas de mortalidad (Rubio, 1996; Kumate, 1982).

Por lo que resulta de suma importancia que se realicen estudios fitoquímicos de especies botánicas no analizadas para que de esta manera se puedan obtener antibacterianos nuevos a los cuales las cepas no sean resistentes (Ortíz, 1996).

---

---

## ANTIBIÓTICOS

Las sustancias más comúnmente utilizadas para combatir enfermedades provocadas por microorganismos son los antibióticos los cuales son compuestos químicos derivados de organismos vivos o producidos por ellos que son capaces, a pequeñas concentraciones, de inhibir los procesos vitales de los microorganismos. El primer registro científico de actividad antibiótica fue realizado por Luis Pasteur, quien en 1877 comunicó que no se había desarrollado el carbunco en animales inyectados con un inóculo que contenía *Bacillus anthracis* y otros bacilos comunes. Posteriormente Tyndal, en 1881 estableció que en algunos tubos que contenían una infusión nutritiva y bacterias los cuales se habían contaminado con *Penicillium glaucum*, las bacterias perdían su poder de traslación y caían al fondo del tubo; Tyndal interpretó el fenómeno como debido a la suspensión de suministro de oxígeno a las bacterias por las películas formadas por el moho (Trease y Evans,1993).

Emmerich, en 1887 descubrió accidentalmente que un cobayo al que había inyectado previamente *Streptococcus erysipetalis* no padeció el cólera al inyectarle cultivos virulentos de *Vibrio cholerae*. Emmerich reconoció inmediatamente el significado del descubrimiento y logró evitar el antrax en animales de experimentación administrando *S. erysipetalis* previamente a la inyección de *B. anthracis* (Trease y Evans *op cit.*).

En 1930 Gerhard Domagk descubrió la primera sulfonamida y la llamó protosil, posteriormente D. D. Woods dilucidó el mecanismo de acción de las sulfonamidas; descubrió que los efectos de inhibición que ejercen sobre el crecimiento de las bacterias se invertían al agregar ácido p-aminobenzoico (PABA) al medio de cultivo, concluyó que la sulfonamida actúa como análogo estructural del PABA (Walker, 1998), durante la síntesis de la vitamina.

El fenómeno de la antibiosis había ya sido establecido con estos y otros experimentos y en 1928 Alexander Fleming observó la inhibición de las bacterias por una colonia de *Penicillium natatum* que se había desarrollado como contaminante en

una caja petri, por lo cual Fleming abogó en su publicación por el posible uso clínico de la sustancia formada en el cultivo de *Penicillium* (Walker, 1998).

La sustancia descubierta por Fleming, actualmente conocida como penicilina, se produjo a gran escala con el advenimiento de la segunda Guerra Mundial (Trease y Evans, 1993) y en 1940 Florey y col. reiniciaron el estudio de *Penicillium* y sus productos, logrando aislar la Penicilina G que mostró en los seres vivos su potencia contra muchos tipos de microorganismos patógenos (Domínguez, 1980).

Con el descubrimiento de las penicilinas se abrió un nuevo campo de investigación y pronto se aisló del suelo un actinomiceto (*Streptomyces griseus*), productor de un antibiótico que destruía los microorganismos no atacados por la penicilina; a este se le denominó estreptomicina. Posteriormente, en 1947 de la cepa *Streptomyces venezuelae* se aisló la cloromicetina o cloranfenicol que interfiere con la síntesis de proteínas, inhibiendo el crecimiento de los microorganismos causantes del tifo, tifoidea y de la fiebre malta. La cloromicetina es el primer antibiótico que se produce comercialmente por síntesis a partir del Benceno (Domínguez, *op. cit.*).

Actualmente, los antibióticos no sólo se obtienen de microorganismos, también se obtienen sintéticamente o bien, de organismos marinos, líquenes y plantas superiores; sin embargo, la mayoría de los antibióticos de empleo clínico se obtienen de bacterias y hongos. Entre las bacterias es especialmente importante el género *Streptomyces* ya que produce antibióticos como la estreptomicina, cloranfenicol, clorotetraciclina, tetraciclina, eritromicina y neomicina; otros antibióticos de origen bacteriano son actinomicina, tiritricina, bacitracina y polimixina. En cuanto a antibióticos de origen fúngico son las penicilinas, gruseofulvina y cefalorina (Trease y Evans, 1993).

En lo referente a su mecanismo de acción, estos son selectivos sobre los microorganismos; algunos actúan únicamente sobre bacterias Gram-positivas, otros son tóxicos para hongos, levaduras y protozoos; por otra parte, pueden ser de espectro limitado (cuando inhiben a un único microorganismo) o de amplio espectro

(inhiben tanto a bacterias Gram-positivas como a Gram-negativas, así como a gérmenes intracelulares) (Foye, 1991).

Los antibióticos pueden actuar de 4 formas diferentes:

- 1) Inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, los antibióticos beta lactámicos (penicilinas y cefalosporinas) presentan este mecanismo de acción, las cuales se fijan a proteínas fijadoras de penicilinas (PFP) que se localizan en la membrana bacteriana; el enlace con las PFP bloquea las actividades de la enzima transpeptidasa requerida para el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglucano que es uno de los componentes principales de la pared celular bacteriana. La inhibición de estas enzimas por los antibióticos beta lactámicos reduce la síntesis de pared celular, además activan las enzimas autolíticas que destruyen la misma, por lo que su mecanismo de acción es bactericida.
- 2) Inhibición de la síntesis de proteínas: La síntesis de proteínas en los microorganismos es diferente al de los mamíferos, por lo que muchos de los antibióticos de uso común actúan selectivamente inhibiendo el proceso en las bacterias, por ejemplo, las tetraciclinas se fijan a la subunidad 30 S ribosómica y bloquean la adherencia del complejo aminoacilo-tRNA. La subunidad 50 S de los ribosomas bacterianos contiene receptores específicos para eritromicina y clindamicina, estos fármacos pueden inhibir la formación del complejo de iniciación e interfieren en las reacciones de traslocación. El cloranfenicol se fija a la subunidad 50 S ribosómica y bloquea la actividad de la peptidiltransferasa.
- 3) Inhibición de la síntesis de ácido nucleico: las quinolonas y fluoroquinolonas bloquean la síntesis del ácido nucleico mediante la inhibición de la DNA girasa, la enzima que convierte al DNA superenrollado en una forma relajada; la rifampicina es un inhibidor de la RNA polimerasa dependiente de DNA.
- 4) Dislocación de la permeabilidad de la membrana celular: las polimixinas dislocan la permeabilidad selectiva de las membranas celulares bacterianas mediante la inserción en la bicapa lipídica y por medio de la formación de poros artificiales (Bergolio, 1979; Katzung y Trevor, 1991).

## MECANISMOS DE RESISTENCIA

Hasta hoy se han aislado casi 3 000 antibióticos de los que sólo algunos son eficaces como agentes terapéuticos (Méndez, 1995) ya que los microorganismos han creado resistencia a muchos de ellos.

La resistencia a los antibióticos puede ser natural y adquirida. La natural se refiere al espectro genético primigenio a la intervención generalizada de quimioterápicos y antibióticos, es decir, se manifiesta la información que ya está presente en el cromosoma bacteriano y en la que el antibiótico hace evidentes las cepas con dicha capacidad (Kumate, 1981).

Para este tipo de resistencia, los microorganismos pueden producir enzimas que inactivan a los antibióticos uniéndose con un grupo (metilo, acetilo o fosfato) o rompiendo un enlace importante (por ejemplo el anillo lactámico de las penicilinas); también pueden modificar su permeabilidad al fármaco a causa de alteraciones en las moléculas de purina o en los constituyentes lipopolisacáridos, alterando la carga neta en la superficie del microorganismo (Walker, 1998).

La resistencia adquirida es el resultado de la adecuación al medio de las mutaciones ocurridas al azar en un lapso evolutivo muy prolongado, es decir un cambio genético estable, hereditario de generación en generación (Kumate, 1981). La resistencia adquirida se hace por conjugación, transformación y transducción

La conjugación es el medio principal de la transmisión de la resistencia en la que se transfiere una molécula de DNA portadora de un gen resistente entre bacterias de distinta especie a través de un puente citoplasmático (Bergolio, 1979).

## ANTIMICROBIANOS DE ORIGEN VEGETAL

Aunque la principal fuente de antibióticos, siguen siendo los microorganismos, algunas plantas también poseen sustancias con esa actividad (Méndez, 1995)

Básicamente las plantas medicinales se utilizan en dos formas: 1) como mezclas complejas conteniendo un amplio rango de constituyentes (infusiones, aceites esenciales, tinturas y extractos; 2) Como principios activos químicamente puros (Hamburger y Hostettmann, 1991).

### TERPENOS

De los compuesto puros a pocos de ellos se les ha determinado su mecanismo de acción (Canales, 2000); dentro de estos se encuentran los Terpenos que son un amplio grupo de compuestos secundarios importantes en numerosas interacciones bióticas (Judd, 1999), comprendidas las de atraer y repeler insectos, hormonales, inhibidoras de crecimiento, como parte constituyente de moléculas transportadoras de electrones, etc. Los terpenos se clasifican según el número de unidades teóricas de isopreno de que se componen: monoterpenos (C-10), sesquiterpenos (C-15), diterpenos (C-20), triterpenos (C-30), tetraterpenos (C-40) y politerpenos (C>40) (Azcon y Talon, 1993).

Los terpenos son activos contra bacterias, hongos, virus y protozoarios. La actividad antibacteriana de estos compuestos se debe a que tienen capacidad de solubilizar la membrana ya que afectan a los componentes lipofílicos de esta, provocando lisis, este efecto es observado especialmente en bacterias Gram negativas (Kubo, 1993; Murphy, 1999).

De este grupo, se encuentra bien documentada la actividad de los diterpenos (C-20) que son sustancias de gran interés, tanto por su comportamiento químico, como por sus propiedades biológicas; como la actividad reguladora del crecimiento vegetal que tienen las giberelinas, la actividad insecticida que tienen algunos

diterpenos ent-kauránicos y las propiedades tóxicas de los diterpenos con esqueleto de taxano (Romo de Vivar, 1985).

Además de lo anteriormente señalado, muchos estudios han demostrado que los diterpenos muestran actividades farmacológicas importantes y algunos de ellos han sido identificados como los principales compuestos activos de drogas crudas usadas en la medicina tradicional, mostrando actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antineoplásica y analgésica (Harbone y Tomas, 1991). Algunos de estos compuestos son los principales responsables de la resistencia de un gran número de plantas (Martínez, 1967).

Sin embargo, a pesar de su importancia por las propiedades que ofrecen, también muchos de ellos promueven el desarrollo de tumores y otros son irritantes de la piel (Harbone y Tomas, *op. cit.*). Existen diferentes especies que poseen algún terpeno con actividad antibacteriana, algunas de ellas se mencionan en la tabla 1.

**Tabla 1. Plantas que contienen terpenos con actividad antibacteriana.**

| ESPECIE                     | COMPUESTO                    | ACCIÓN SOBRE   | REFERENCIA                      |
|-----------------------------|------------------------------|--|---------------------------------|
| <i>Centipeda minima</i>     | Lactonas<br>sesquiterpénicas | <i>B. subtilis</i><br><i>S. aureus</i>   | Robin <i>et al.</i> , 1998      |
| <i>Centipeda minima</i>     | Lactonas<br>sesquiterpénicas | <i>S. aureus</i><br><i>B. subtilis</i>   | Taylor y Towers, 1997           |
| <i>Cistus monspeliensis</i> | Diterpeno                    | <i>S. aureus</i><br><i>S. epidermidis</i><br><i>S. hominis</i><br><i>K. pneumoniae</i><br><i>E. coli</i><br><i>P. aeruginosa</i> | Kolocouris <i>et al.</i> , 2001 |

Continuación de la Tabla 1

|                               |                                       |  |  |
|-------------------------------|---------------------------------------|--|--|
| <i>Combretum imberbe</i>      | Triterpenos                           | <i>P. vulgaris</i>   | Katerere <i>et al.</i> , 2003          |
| <i>Terminalia stuhlmannii</i> | Pentaciclicos                         | <i>S. aureus</i><br><i>C. albicans</i><br><i>S. aureus</i><br><i>E. coli</i><br><i>M. fortuitum</i>                          |  |
| <i>Crossopetalum gaumeri</i>  | Terpenoides                           | <i>B. cereus</i><br><i>S. epidermidis</i><br><i>M. luteus</i>  | Ankli <i>et al.</i> , 2000             |
| <i>Eucaliptos globulus</i>    | Alcohol sesquiterpénico<br>(globulol) | <i>E. coli</i><br><i>S. typhi</i><br><i>E. agglomerans</i><br><i>S. boydii</i>   | Rubio, 1996                            |
| <i>Eupatorium salvia</i>      | Diterpenoides                         | <i>B. cereus</i><br><i>S. aureus</i><br><i>M. luteus</i><br><i>B. subtilis</i><br><i>C. michiganensis</i>                    | Urzua <i>et al.</i> , 1998             |
| <i>Euphorbia sessiliflora</i> | Diterpenos                            | <i>B. cereus</i><br><i>B. subtilis</i><br><i>M. flavas</i><br><i>M. catarrhalis</i><br><i>N. sicca</i><br><i>C. albicans</i> | Sutthivaiyakit <i>et al.</i> ,<br>2000 |
| <i>Juniperus excelsa</i>      | Diterpenos y un<br>sesquiterpeno      | <i>M. tuberculosis.</i>  | Topçu <i>et al.</i> , 1999             |
| <i>Lycopus europaeus</i>      | Diterpenos                            | <i>S. aureus</i>   | Gibbons <i>et al.</i> , 2003           |
| <i>Ocimum basilicum</i>       | Aceites esenciales                    | <i>Staphylococcus</i><br><i>Enterococcus</i><br><i>Pseudomonas</i>   | Opalchenova y<br>Obreshkova, 2003      |

Continuación de la Tabla 1

|  |                              |  |                              |
|--|------------------------------|--|------------------------------|
| <i>Plectranthus hereroensis</i>  | Diterpeno                    | <i>S. aureus</i><br><i>V. cholerae</i>   | Batista <i>et al.</i> , 1995 |
| <i>Salvia sp.</i>  | Diterpenos                   | <i>B. subtilis</i><br><i>S. aureus</i><br><i>E. coli</i><br><i>Salmonella sp</i>   | González, 1999               |
| <i>Salvia viridis</i><br><i>S. ceratophylla</i><br><i>S. blepharochlaena</i><br><i>S. caespitosa</i> | Diterpenos                   | <i>S. aureus</i><br><i>S. epidermis</i><br><i>E. faecalis</i><br><i>B. subtilis</i><br><i>E. coli</i><br><i>P. mirabilis</i> | Ulubelen, 2004               |
| <i>Saussurea petrovii</i>  | Triterpenos                  | <i>B. subtilis</i><br><i>E. coli</i><br><i>S. aureus</i>   | Dai <i>et al.</i> , 2001     |
| <i>Senecio graveolens</i>  | Aceite esencial              | <i>M. luteus</i><br><i>S. aureus</i><br><i>C. albicans</i>   | Pérez <i>et al.</i> , 1999   |
| <i>Tanacetum parthenium</i>  | Aceite esencial              | <i>E. coli</i><br><i>E. agglomerans</i><br><i>S. boydii</i><br><i>S. typhi</i><br><i>V. cholerae</i>                         | Méndez, 1995                 |
| <i>Tanacetum argyrophyllum</i><br><i>var. argyrophyllum</i>  | Lactonas<br>sesquiterpenicas | <i>S. aureus</i><br><i>B. megaterium</i><br><i>B. subtilis</i><br><i>E. coli</i>   | Gören <i>et al.</i> , 1990   |
| <i>Tanacetum densum</i>  | Lactonas<br>sesquiterpenicas | <i>B. subtilis</i><br><i>K. pneumoniae</i>   | Gören <i>et al.</i> , 1991   |

## Continuación de la Tabla 1

|   |                              |  |                     |
|---|------------------------------|--|---------------------|
| <i>Tanacetum argyrophyllum</i><br><i>var. argyrophyllum</i> | Lactonas<br>sesquiterpénicas | <i>S. aureus</i><br><i>B. megaterium</i><br><i>B. subtilis</i><br><i>E. coli</i> | Gören et al., 1990  |
| <i>Tanacetum densum</i>                                     | Lactonas<br>sesquiterpénicas | <i>B. subtilis</i><br><i>K. pneumoniae</i>                                       | Gören et al., 1991  |
| <i>Terminalia macroptera</i>                                | Triterpenos                  | <i>B. subtilis</i><br><i>P. fluorescens</i><br><i>C. cucmerinum</i>              | Conrad et al., 1998 |
| <i>Vernonia colorata</i>                                    | Lactonas<br>sesquiterpénicas | <i>S. aureus</i><br><i>B. subtilis</i><br><i>E. coli</i><br><i>K. pneumoniae</i> | Rabe et al., 2002   |

*B. cereus*: *Bacillus cereus*, *B. megaterium*: *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*: *Bacillus subtilis*, *C. albicans*: *Candida albicans*, *C. cucmerinum*, *Cladosporium cucmerinum*, *C. michiganensis*: *Clavibacter michiganensis*, *E. agglomerans*: *Enterobacter agglomerans*, *E. faecalis*: *Enterobacter faecalis*, *Enterococcus*, *E. coli*: *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*: *Klebsiella pneumoniae*, *M. flavas*: *Micrococcus flavas*, *M. luteus*: *Micrococcus luteus*, *M. catarrhalis*: *Moxarella catarrhalis*, *M. fortuitum*: *Mycobacterium fortuitum*, *M. tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*, *N. sicca*: *Neisseria sicca*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*: *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*: *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella sp.*, *S. tiphy*: *Salmonella tiphy*, *S. typhimurium*: *Salmonella typhimurium*, *S. boydii*: *Shigella boydii*, *S. dysenteriae*: *Shigella dysenteriae*, *S. aureus*: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis*, *S. hominis*: *Staphylococcus hominis*, *S. faecalis*: *Streptococcus faecalis*, *V. cholerae*: *Vibrio cholerae*.

## FAMILIA ASTERACEAE

La familia Asteraceae es una de las mayores en el reino vegetal, consta aproximadamente de 20,000 especies, divididas en 13 tribus (Romo de Vivar, 1985), las cuales tienen distribución mundial.

México se considera uno de los centros de diversificación de esta familia, representando el 13% del total la flora Mexicana (Rzendowski, 1972); las Asteraceae anuales son abundantes durante los meses de mayor precipitación, destacan los géneros *Baccharis*, *Cosmos*, *Eupatorium*, *Senecio*, *Tagetes* y *Tridax* por su número de especies. Muchos representantes de esta familia son útiles ya sea como alimento o como medicinales (Reyes, 1993).

La investigación química realizada en años recientes ha incrementado el interés medicinal de esta familia, entre las plantas investigadas están comprendidas algunas que poseen actividad antitumoral o antibacteriana (Trease y Evans, 1993).

Las Asteraceae son químicamente diversas; muchos miembros de la familia acumulan terpenos. mono-, sesqui-, di- y triterpenos. Las lactonas sesquiterpénicas también son comúnmente encontradas en este grupo de plantas (Stumpf y Conn, 1981; Heywood *et al.*, 1977) las cuales son de tipos variables, entre estas se pueden mencionar los eudesmanólidos (como santonina), germacranólidos, guayanólidos y pseudogayanólidos; algunas poseen actividad citotóxica (Trease y Evans, 1993); se han reportado cerca de 3000 estructuras de lactonas sesquiterpénicas en la familia (Heinrich *et al.*, 1998).

Los politerpenos son conocidos especialmente de la tribu Cichorieae, por su parte, los alcaloides son raramente encontrados en la familia, excepto dentro de la tribu Senecioneae (Stumpf y Conn, 1981) en la cual los alcaloides son tóxicos y se derivan de la pirrolizina, algunos producen necrosis y cirrosis hepática (Heinrich, 1998) y son peligrosos para el ganado. En la familia también se encuentran otros alcaloides

de tipo piridina, quinoleína y diterpenoide. Entre otros componentes, se citan los esteres insecticidas del pelitre y saponinas triterpenoides de la grindelia, ciclitoles, cumarinas y flavonoles (Trease y Evans, 1993).

Dentro de la tribu Astereae se ha reportado la presencia de diterpenoides tipo labdano y clerodano, asimismo, en esta tribu raramente se pueden encontrar lactonas sesquiterpénicas (Heywood *et al.*, 1977).

Dentro de la familia también se ha encontrado la presencia de poliacetilenos los cuales son más frecuentemente encontrados en raíces, sin embargo, también se han reportado a bajas concentraciones en tejidos de hojas (Heinrich *et al.*, 1998).

Muchas de las sustancias elaboradas por esta familia, son tóxicas o muestran otra actividad fisiológica significativa y esta puede ser una razón por la que las plantas de las Asteraceae son raramente usadas en dietas humanas o para comida animal (Heywood *et al.*, 1977).

### **GÉNERO *Gymnosperma* Less.**

El género monotípico *Gymnosperma* Less crece en regiones abiertas y semidesérticas, especialmente en México (Maldonado *et al.*, 1994), distribuyéndose desde el sur de los Estados Unidos, por lo que Reyes (1993) reporta al Género como endémica de México en base a la propuesta de Megaméxico 3 formulada por Rzedowski (1991).

Las especies pertenecientes a este género son plantas subarborescentes, glutinoso-resinosas, hojas alternas, sésiles a casi sésiles, cabezuelas corimboso-paniculadas; involucre cilíndrico-turbinado, sus brácteas escasas, coriáceas y con márgenes escariosos granulados, las exteriores más cortas, receptáculo plano, desnudo; flores liguladas pocas, fértiles, sus corolas inconspícuas, amarillas, flores del disco generalmente hermafroditas, sus corolas amarillas con la garganta angostamente campanulada; anteras con bases obtusas; ramas del estilo con flores hermafroditas elípticas, aplanadas, provistas de un ápice lanceolado, pubescente; aquenios oblongos algo comprimidos, vilano ausente o en forma de coronita breve (Rzedowski, 1985).

***Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. Asteraceae**

**SINONIMÍAS:** *Selloa glutinosa* Sprengel; *Gymnosperma corimbosa* DC; *Gymnosperma multiflorum* DC; *G. Scoparium* DC; *Selloa multiflora* Kuntze.

**NOMBRES COMUNES:** Escobilla, jarilla, pegarrosa; Estado de México: Tezozotla (Náhuatl); Guerrero: Xonequiletl, zacayauchi; Puebla: Xinecuite; San Rafael: Popote; Tepeji del Río: Tatalencho.

**CLASIFICACIÓN:**

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Spematophyta

SUBDIVISIÓN: Angiospermae

CLASE: Dicotiledoneae

ORDEN: Asterales

FAMILIA: Asteraceae

TRIBU: Astereae

GÉNERO: *Gymnosperma*

ESPECIE: *glutinosum*

NOMBRE CIENTÍFICO: *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Figura 1).

**BOTÁNICA Y ECOLOGÍA:** Subarbusto de hasta 1 m de altura, erecto, glabro o casi glabro, glutinoso; tallos más o menos ramificados, estriados, hojas lineares a lanceoladas de 1 a 8.5 cm de largo y de 1 a 9 mm de ancho, agudas a acuminadas en el ápice, margen entero, trinervadas, densamente punteadas en ambas caras (Figura 2), cabezuelas numerosas en densos conjuntos corimbiformes terminales (Figura 3), sésiles o sobre pedúnculos hasta de 3 mm de largo; involucre de 9 a 15 brácteas elípticas a ovaladas, verdes en el ápice, las más largas de 4-5 mm de longitud; flores liguladas 5 a 9, sus corolas de 2-3 mm de largo, con el tubo largo y la parte laminar de 1 mm de longitud o menos; flores del disco 4 a 6, sus corolas de 2.5 a 4 mm de largo, a menudo no todas fértiles; aquenios de 1-1.5 mm de largo (Rzendowski, 1985).

Es originaria de América Boreal Austral y Occidental se encuentra en clima templado, entre los 2,250 y los 3,000 m.s.n.m.



**Figura 1. *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less.**



**Figura 2. Detalle de la planta donde se muestra la forma de las hojas y la resina en hoias v tallo.**



**Figura 3. Detalle de la inflorescencia de la planta donde se muestran los conjuntos corimbiformes terminales.**

**ETNOBOTÁNICA Y ANTROPOLOGÍA:** Es una planta utilizada en el Estado de México, Durango y Guanajuato para tratar el reumatismo y dolor de pies (Argueta *et al.*, 1994). Como uso general se ha reportado la utilización de las flores como antirreumático, contra la diarrea y como analgésico (Semarnat, 2001). En Puebla se utiliza para dolor de cabeza, jotes y piquetes de hormiga; también se utiliza cuando hay rotura de huesos en animales. Otros usos que se le asignan son contra la diarrea, fiebre amarilla y para soldar huesos, en Guerrero se utiliza para aplicar limpias a los animales (Argueta, *et al.*, 1994).

**HISTORIA:** A inicios del siglo XX; el Instituto Médico Nacional la describe como diurético, antipalúdico, digitálico y antiséptico, posteriormente Maximino Martínez la menciona como antidiarreico, antirreumático, cicatricial y regenerativo, vulnerario y analgésico; Luis Cabrera reporta su uso como diurético y vasodilatador coronario; finalmente, la Sociedad Farmacéutica de México la refiere como digitálico (Argueta *et al.*, 1994).

**HÁBITAT:** Es una especie de hábito terrestre (Yu, *et al.*, 1988) y se encuentra asociada a bosques de encino, de pino, mixto de encino-pino y pino-encino (Argueta *et al.*, 1994), matorrales y pastizales, de preferencia en áreas perturbadas y en la vegetación secundaria (Rzendowski, 1985).

**DISTRIBUCIÓN Y ÁREAS DE USO:** Se distribuye a lo largo del Valle de México, Guatemala y de Arizona a Texas (Rzendowski, 1985) y es utilizada en el estado de Durango, México, Puebla, Guanajuato, Guerrero (Argueta *et al.*, 1994), Zacatecas y Nuevo León (Aguilar *et al.*, 1994)

**DÓISIS:** Como antidiarreico se utiliza en infusión al 10%, sin exceder de 100 mg a 1 g por día; como analgésico se aplica localmente sin exceder de 500 mg a 2.5 g.

---

---

## ANTECEDENTES

*Gymnosperma glutinosum* ha sido principalmente reportada en estudios florísticos hechos en diversas regiones del país, tal es el caso de Romero (1982), Castilla (1983), Núñez (1990), Rocha (1992), Reyes (1993), Zavaleta (1996), Tenorio (1997), Díaz (1997); Sánchez (1998), Royo (2001), quienes evaluaron parámetros como forma de vida, abundancia y distribución de la planta, ellos coinciden en que esta se encontró principalmente en matorral xerófilo y pastizal, generalmente en zonas perturbadas.

Por otra parte en aspectos químicos, Martínez (1967) reporta en la planta, aceites esenciales, resina ácida y neutra, ácido orgánico no determinado, ácido análogo al gálico, materia colorante, azúcar, albúmina, goma, principios pécticos y sales minerales en tallos y flores; Domínguez y Torre (1974) aislaron dos flavonoides pentametoxilados de *G. glutinosum*, siendo estos el 4', 5'-pentametoxiflavona y el 5-hidroxi-3,6,7,8,3'-pentametoxiflavonoide; en otro trabajo, Miyakado *et al.* (1974) aislaron un triol diterpeno, siendo el gymnospermin con estructura (-)-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ , 15-trihidroxi-labdano; Yu, *et al.* (1988) aislaron 21 flavonoides de dicha planta, 14 de los cuales eran conocidos y los restantes 7 se reportaban como nuevos componentes, siendo el 5,7-dihidroxi-3,6,8,2',4',5'-hexametoxiflavona, el 5,4',5'-trihidroxi-3,6,7,8,2'-pentametoxiflavona, el 5,7,4'-trihidroxi-3,6,8,2',5'-pentametoxiflavona, el 5,7,4',5'-tetrahidroxi-3,6,8,2'-tetrametoxiflavona, el 5,7,4',5'-tetrahidroxi-3,6,2'-trimetoxiflavona, el 5,7,4',5'-tetrahidroxi-3,2'-dimetoxiflavona y el 3,5,4'-trihidroxi-6,7,8,3'-tetrametoxiflavona. Por su parte, Arroyo (1992) aisló un diterpeno con esqueleto de labdano, correspondiendo éste a 13,14,15-trihidroxi-labdano-7-eno; Maldonado *et al.* (1994) aislaron dos nuevos diterpenos con estructura (+)-ent-labd-7-en-13S,14R,15-triol y el ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico; Martínez *et al.* (1994) aislaron dos nuevos diterpenos que corresponden al ácido ent-dihidrotucumonoico y ácido 2-geloyl-ent-dihidrotucumonoico; Horie *et al.* (1998) aislaron 5 flavonoides, cuatro de estos ya habían sido reportados por Yu, *et al.* (1988). Calderón *et al.* (2001) llevaron a cabo un estudio acerca del cristal y estructura molecular de un compuesto de *G. glutinosum*, siendo éste el ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico, elucidada anteriormente por Maldonado *et al.* (1994); sin embargo,

---

en éste nuevo estudio elucidaron la estructura con RMN  $^{13}\text{C}$ , ya que anteriormente no había podido ser determinada por esta técnica.

En cuanto a la farmacología y toxicidad de la planta Argueta, *et al.* (1994) reportaron la acción del aceite esencial de la planta, el cual actúa principalmente en el sistema nervioso ya que excita la acción motora de los centros musculares e impide las funciones de las extremidades de los centros sensitivos de la piel y la excitabilidad de la fibra muscular.

En lo referente a las propiedades medicinales que se le han atribuido a *Gymnosperma glutinosum* por la medicina tradicional, se puede mencionar a Martínez (1967) y Argueta *et al.* (1994), quienes la reportan como antidiarréico, antirreumático y analgésico; Rocha (2002) y Hernández *et al.* (2003) realizaron un estudio etnobotánico en Zapotitlán de las Salinas y reportan a la planta como antidiarreico.

A pesar de los estudios etnobotánicos mencionados, no existen las suficientes investigaciones enfocadas a comprobar dichas propiedades, sólo el estudio realizado por Canales (*en proceso*) quien evaluó la actividad antibacteriana de los extractos (hexanos, metanol, acetato de etilo y agua) de la planta sobre 14 cepas bacterianas y reporta que el extracto hexánico fue el más activo, ya que inhibió el crecimiento de 6 diferentes cepas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. boydii*, *V. cholerae* Tor, *V. cholerae* agua y *V. cholerae* caso clínico).

En el presente trabajo se tomó como punto de partida el estudio mencionado, y se comparó la actividad antibacteriana de la planta colectada en dos localidades con la finalidad de contribuir a ampliar el conocimiento que se tiene acerca de las drogas utilizadas para combatir las enfermedades gastrointestinales, lo que resulta de importancia debido a que estas constituyen una gran problemática en los países en desarrollo (Brooks *et al.*, 1999) y que para México son una de las principales causas de muerte en áreas rurales (INEGI, 1999; citado en Hernández *et al.*, 2003).

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Evaluar y comparar la actividad antibacteriana de *Gymnosperma glutinosum* de dos localidades: San Rafael Coxcatlán, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la actividad antibacteriana del extracto hexánico de *G. glutinosum* de ambas localidades
- Aislar el compuesto activo de la planta mediante técnicas cromatográficas.
- Determinar la estructura del compuesto activo mediante técnicas espectroscópicas de UV, IR, resonancia magnética nuclear de protones (RMN  $^1\text{H}$ ) y resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ).
- Determinar la actividad antibacteriana del compuesto puro aislado de la planta.

---

## ÁREAS DE COLECTA

### SAN RAFAEL COXCATLÁN, PUEBLA

San Rafael Coxcatlán, Municipio de Coxcatlán, se localiza al sureste del Valle de Tehuacán, Puebla a  $18^{\circ} 12'$  y  $18^{\circ} 14'$  de latitud norte;  $97^{\circ} 07'$  y  $97^{\circ} 09'$  de longitud oeste a 957 m.s.n.m. (Figura. 4) (INEGI, 1991).

Su clima es  $Bs_0(h_1) W'' (w) (e) g$  y corresponde al seco muy cálido o cálido, con lluvias en verano. Precipitación media anual de 450.7 mm; precipitación invernal menor de 5%; temperatura media de  $24^{\circ} C$  (García, 1981).

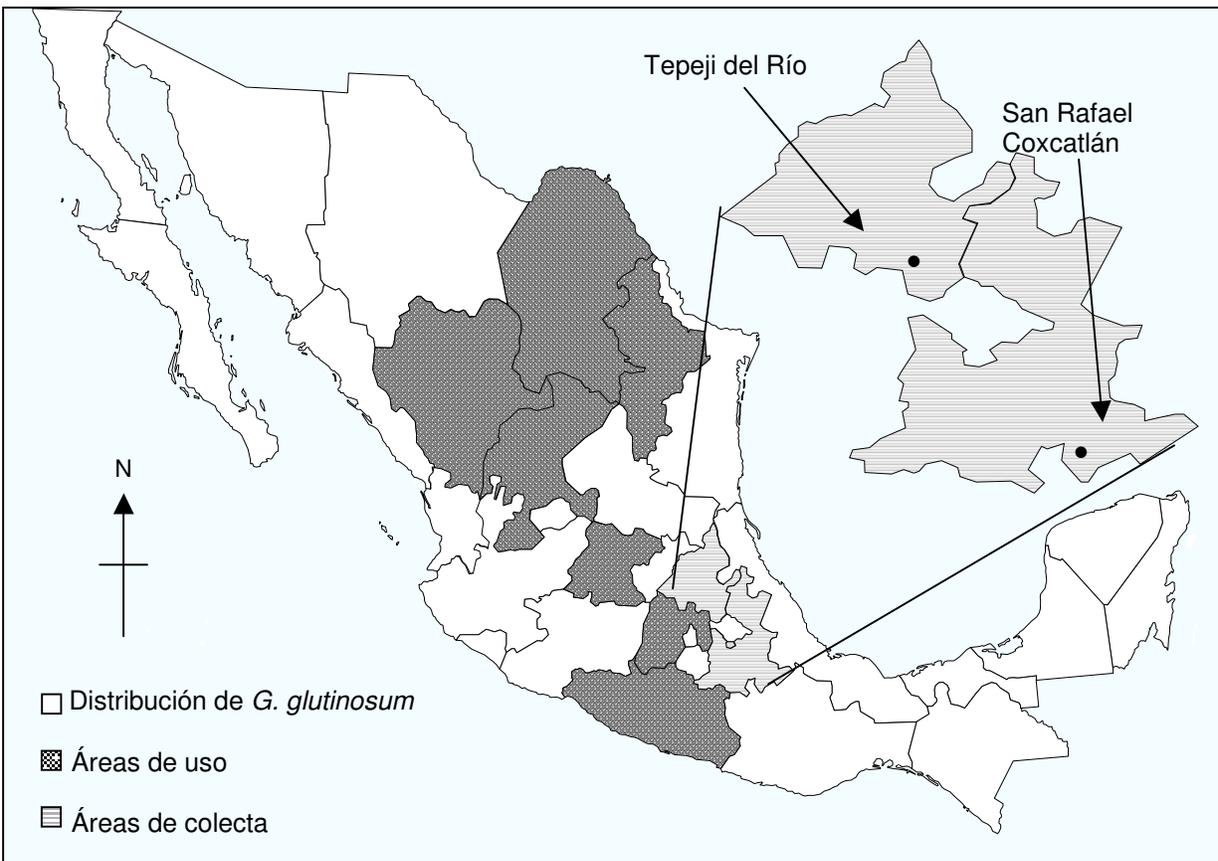
Presenta una morfología de planicies con pequeñas terrazas de pendiente suave (García, 1981; Trujillo, 1988) y una vegetación natural e inducida representada por matorral crasicaule y cardonal (INEGI, 1984<sup>a</sup>) con dominancia de gramíneas de distribución heterogénea a lo largo de toda la zona (García 1981).

Presenta rocas sedimentarias, principalmente arenisca y conglomerado (INEGI, 1984<sup>b</sup>). Los suelos están pobremente desarrollados, encontrando principalmente regosoles calcáreos y eutricos; litosoles gruesos, xerosoles háplicos y lúvicos de textura media en fase física lítica y pedregosa (INEGI, 1984<sup>c</sup>).

### TEPEJI DEL RÍO, HIDALGO

Se encuentra ubicado a  $19^{\circ} 54'$  latitud norte y  $99^{\circ} 21'$  longitud oeste (Fig. 4) (CETENAL, 1978); a una altitud de 2,175 m.s.n.m. Su clima es  $Cw_0(w)$  que corresponde al tipo templado subhúmedo con lluvias en verano, con precipitación media anual de 704.5 mm y temperatura media de  $15.8^{\circ} C$  que varía entre  $18.2^{\circ} C$  en mayo y junio y  $12.2^{\circ} C$  en enero (García, 1981).

La localidad se encuentra desprovista de vegetación ya que está fuertemente dañada por erosión hídrica, sólo presenta vegetación secundaria representada por matorral subinerme y nopalera (CETENAL, 1980).



**Figura 4. Áreas de colecta y uso de *G. glutinosum* (Spreng.) Less.**

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. COLECTA DE LA PLANTA

El presente estudio se llevó a cabo con la especie *Gymnosperma glutinosum* colectada en San Rafael Coxcatlán, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo. Con cada una, se realizaron bioensayos de acuerdo al siguiente método.

### 2. BIOENSAYOS PRELIMINARES

#### 2.1. Extracción por percolación

Se tomaron 522 g de material desecado y triturado (parte aérea), los cuales se colocaron en una columna de cristal para percolado y se le agregaron solventes en orden creciente de polaridad (hexanos, acetato de etilo y metanol). Una vez obtenidos los extractos, se destiló el exceso de solvente a presión reducida en un rotavapor. El extracto obtenido se colocó en charolas de vidrio para completar la evaporación del solvente; finalmente se calculó el rendimiento total, mediante diferencia de peso.

#### 2.2. Microorganismos a utilizar

Las cepas bacterianas que se utilizaron se han reconocido como causantes de enfermedades gastrointestinales en México (Canales, 2000), estas se listan en la tabla 2.

**Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas para los bioensayos**

| Bacteria   | Gram | Bacteria  | Gram |
|--|------|---|------|
| <i>Sarcina lutea</i> <sup>a</sup>                    | +    | <i>Vibrio cholerae</i> Caso Clínico <sup>a</sup>        | -    |
| <i>Bacillus subtilis</i> <sup>a</sup>                | +    | <i>Vibrio cholerae</i> CDC V12 <sup>a</sup>             | -    |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12938 <sup>a</sup> | +    | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <sup>a</sup>         | -    |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> <sup>a</sup>       | +    | <i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430 <sup>a</sup>         | -    |
| <i>Shigella boydii</i> ATCC 8700 <sup>a</sup>        | -    | <i>Enterobacter agglomerans</i> ATCC 27155 <sup>a</sup> | -    |
| <i>Vibrio cholerae</i> No. 01 <sup>a</sup>           | -    | <i>Enterobacter aerogenes</i> <sup>a</sup>              | -    |
| <i>Vibrio cholerae</i> INDRE 206* <sup>a</sup>       | -    | <i>Yersinia enterocolitica</i> <sup>b</sup>             | -    |

\* Aislada de agua contaminada

<sup>a</sup> Donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán.

<sup>b</sup> Donada por el laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI de las FES-Iztacala.

### 2.3. Evaluación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Koneman, 1985) (Apéndice I). Los discos se impregnaron con el extracto a una concentración de 2 mg/10µl; como control positivo se utilizaron sensidiscos de cloranfenicol (25µg/disco), como controles negativos se utilizaron sensidiscos impregnados con 10 µl de los diferentes solventes (hexanos, acetato de etilo y metanol). Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

## 3. EVALUACIÓN CUANTITATIVA

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) utilizando la microtécnica de dilución en caldo (Koneman,

1985) (Apéndice II), para lo cual se emplearon concentraciones crecientes de las fracciones a evaluar, siendo de 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2 mg/ml.

#### **4. AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS**

##### **4.1. Aislamiento**

Para separar los compuestos activos se utilizaron técnicas cromatográficas de columna y de placa fina biodirigidas, procediendo a determinar la mezcla de solventes (fase móvil) y el soporte (fase estacionaria). Para la separación por placa fina se utilizaron cromatofolios de gel sílice Merck (Kieselgel 60) y para las cromatografías en columna se utilizó sílica gel de malla 70-230 (Sigma 5-2509). Asimismo se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), para verificar la pureza de las fracciones

##### **4.2. Elucidación de estructuras**

Para determinar las estructuras se realizaron estudios espectroscópicos en los espectros de absorción UV, IR, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones (RMN <sup>1</sup>H) y de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C).

#### **5. PRUEBAS ESTADÍSTICAS**

Para analizar los resultados de los bioensayos se utilizó el análisis estadístico ANOVA y posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos realizados.

## RESULTADOS Y ANÁLISIS

### 1. COLECTA DE LA PLANTA

La colecta de la planta se realizó durante el mes de junio de 2001 (San Rafael) y 2002 (Tepeji de Río). La determinación de la planta fue realizada por la Biol. Edith López Villafranco en el Herbario IZTA de la FES Iztacala; asimismo se depositó un ejemplar de la especie en el mismo. Los datos etnobotánicos de la planta se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3. Datos etnobotánicos de la planta**

|                    |   |
|--------------------|---|
| Nombre científico  | <i>Gymnosperma glutinosum</i>   |
| Nombre común       | Popote *<br>Tatalencho ♦  |
| Número de registro | 29982 *<br>28243 ♦  |
| Parte usada        | Parte aérea   |
| Forma de uso       | Antidiarreico: Infusión con la parte aérea. *<br>Antirreumático: Macerada en alcohol. ♦ |
| Colector           | M. en C. Margarita Canales Martínez *<br>Biol. Roberto Garcilazo Tovar ♦                |

♣ San Rafael

♦ Tepeji

### 2. BIOENSAYOS PRELIMINARES

De la extracción por percolación se obtuvieron extractos en orden creciente de polaridad (hexanos, acetato de etilo y metanol), obteniendo los siguientes resultados (Tabla 4).

**Tabla 4. Rendimiento de los extractos de *G. glutinosum*, con diferentes solventes**

| Extracto         | San Rafael Coxcatlán |       | Tepeji del Río |       |
|------------------|----------------------|-------|----------------|-------|
|                  | Gramos               | (%)   | Gramos         | (%)   |
| Hexano           | 43.25                | 8.28  | 25.86          | 4.90  |
| Acetato de etilo | 39.44                | 7.55  | 44.52          | 8.52  |
| Metanol          | 67.53                | 12.93 | 57.47          | 11.00 |

El rendimiento (%) se calculó con respecto a 522 g de planta seca.

En la tabla anterior se puede observar que el porcentaje de más alto rendimiento en ambas localidades corresponde al extracto metanólico (12.93% para San Rafael y 11% para Tepeji); los porcentajes más bajos de rendimiento son el de acetato de etilo para San Rafael (7.55%) y el de hexanos para Tepeji (4.9%).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos por Canales (en proceso), se procedió a separar los componentes del extracto hexánico, para ello se realizó una partición con mezclas de metanol-hexanos (1:1) obteniendo dos fases, una polar (metanol) y una no polar (hexanos). El rendimiento de las fracciones obtenidas se muestra en la tabla 5.

**Tabla 5. Rendimiento de las partición del extracto hexánico de *G. glutinosum***

| Partición | San Rafael Coxcatlán |      | Tepeji del Río |      |
|-----------|----------------------|------|----------------|------|
|           | Gramos               | %    | Gramos         | %    |
| Hexanos   | 22.98                | 4.40 | 15.47          | 2.96 |
| Metanol   | 20.07                | 3.84 | 9.63           | 1.84 |
| Interfase | 0.40                 | 0.07 | 0.24           | 0.04 |

El rendimiento en (%) se calculó con respecto a 522 g de planta seca

La tabla anterior muestra que el porcentaje más alto de rendimiento, tanto para San Rafael como para Tepeji, corresponde a la fracción no polar (hexanos), de la cual se obtuvo un rendimiento de 4.40 y 2.96%, respectivamente.

En la tabla 6 se muestran los resultados de la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas del extracto hexánico, las cuales presentaron actividad sobre 9 cepas bacterianas; la fracción polar de Tepeji actuó sobre 11 de ellas y la fracción no polar tuvo actividad sobre 10 cepas bacterianas; además se observa que la fracción polar de ambas localidades presenta los mayores halos de inhibición ( $19.25 \pm 3.95$  para San Rafael y  $22.25 \pm 9.74$  para Tepeji del Río).

**Tabla 6. Actividad antibacteriana de las particiones del extracto hexánico de *G. glutinosum***

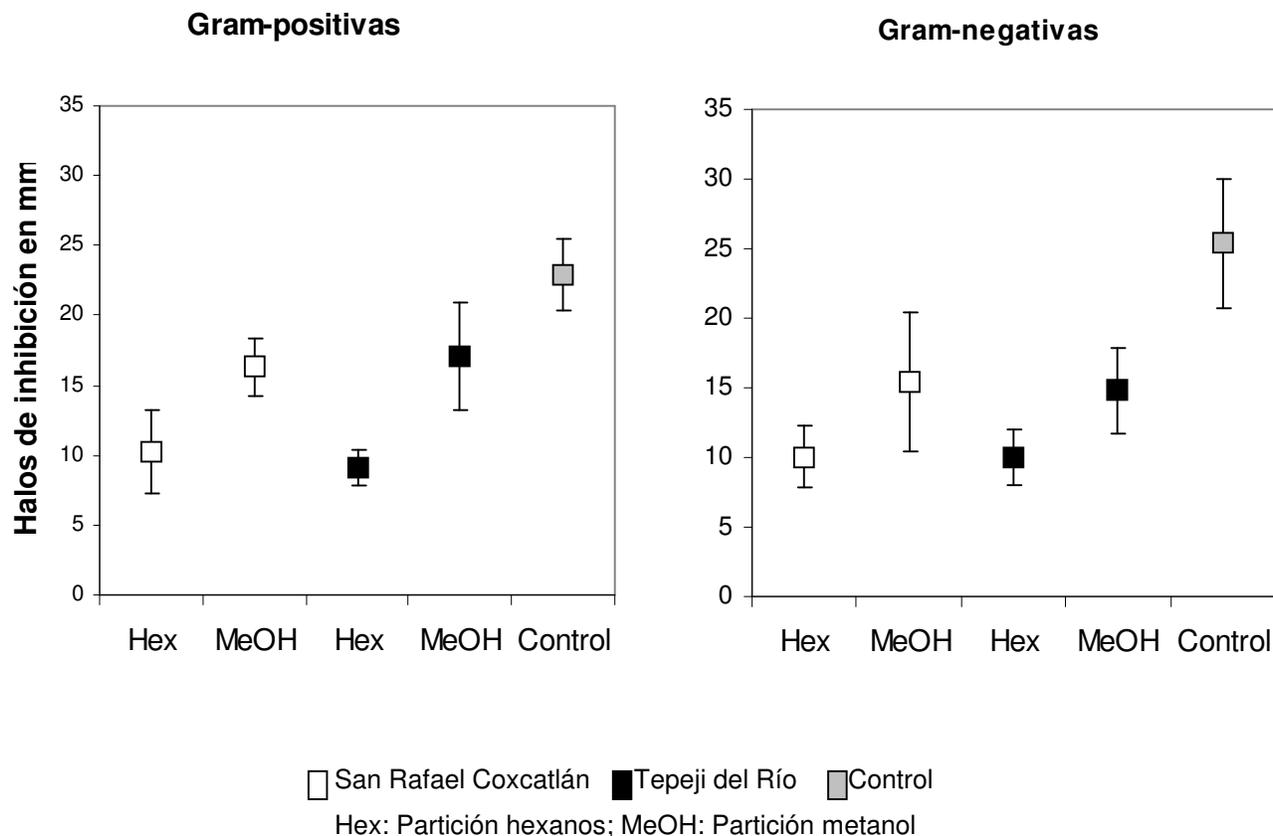
| Bacteria                  | San Rafael Coxcatlán |            | Tepeji del Río |            | Control       |
|---------------------------|----------------------|------------|----------------|------------|---------------|
|                           | P. Hexanos           | P. Metanol | P. Hexanos     | P. Metanol | Cloranfenicol |
| <i>S. lutea</i>           | 13.66±4.62           | 18.66±2.08 | 10.50±1.00     | 22.25±9.74 | 23.57±0.75    |
| <i>B. subtilis</i>        | Na                   | Na         | Na             | 17.67±1.53 | 28.50±0.71    |
| <i>S. aureus</i>          | 8.00±0.50            | 14.67±0.58 | 8.00±1.00      | 14.67±0.58 | 27.00±1.41    |
| <i>S. epidermidis</i>     | 9.00±0.50            | 15.67±0.58 | 8.67±0.58      | 13.67±0.58 | 22.00±0.50    |
| <i>S. boydii</i>          | 8.50±0.58            | 19.25±3.95 | 9.00±0.50      | 17.67±2.31 | 30.00±0.58    |
| <i>V. cholerae No. 01</i> | 7.67±0.58            | 20.00±1.00 | 7.33±0.58      | 16.00±0.50 | 23.50±0.71    |
| <i>V. cholerae Tor</i>    | Na                   | Na         | 10.00±0.50     | 12.66±0.57 | 33.00±7.02    |
| <i>S. typhi</i>           | 13.50±7.77           | 18.00±1.41 | 12.26±0.58     | 17.66±0.57 | 25.67±1.15    |
| <i>V. cholerae Agua</i>   | 11.00±0.50           | 9.00±0.50  | 9.67±0.58      | 9.33±0.57  | 29.67±1.15    |
| <i>E. aerogenes</i>       | 11.00±0.81           | 17.25±0.50 | 13.00±0.5      | 16.33±0.57 | 22.40±1.67    |
| <i>V. cholerae Cc</i>     | 8.50±0.70            | 9.33±2.51  | 8.67±0.58      | 14.00±1.00 | 27.33±2.30    |

Halos de inhibición en mm; valor promedio de 3 repeticiones; los extractos fueron probados con una concentración de 2mg/10µl por sensidisco. Na = No activo

Las fracciones no fueron activas contra *E. coli*, *E. agglomerans* y *Y. enterocolítica*, por lo que no se incluyen en la tabla.

Los resultados del análisis estadístico de ANOVA mostraron que existen diferencias significativas entre las particiones obtenidas y el control, posteriormente con la prueba de Tukey se determinó que no existen diferencias significativas en cuanto a la actividad de las fracciones no polares de ambas localidades, lo mismo ocurre con la actividad de las fracciones polares. Lo anterior se puede observar en el gráfico 1.

**Gráfico 1. Actividad antibacteriana de las particiones del extracto hexánico de *G. glutinosum* sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas**



En el gráfico anterior se observa que la fracción no polar presenta halos de inhibición muy similares para ambas localidades, lo mismo ocurre con la fracción polar, esta última presenta los halos de inhibición mayores. La actividad también es muy similar entre bacterias Gram-positivas y negativas.

Tomando en cuenta que los halos de inhibición de las fracciones polares fueron los de mayor diámetro, estas se sometieron a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando como fase móvil metanol:acetonitrilo:agua en una proporción 25:25:50, respectivamente. La cromatografía se obtuvo de manera isocrática (Figura 5).

## DISCUSIÓN

Resulta de gran importancia contar con previa información florística, etnobotánica y fitoquímica de la especie con la que se llevó a cabo este trabajo, ya que estudios como estos proporcionaron la base para que esta investigación se realizara en un tiempo relativamente corto y al mismo tiempo contribuyeron para el análisis y discusión de los resultados obtenidos.

En lo referente al rendimiento de los extractos obtenidos, este varió enormemente entre las dos localidades, sin embargo el mayor rendimiento para ambas es el de el extracto de metanol con 12.93% y 11% para San Rafael y Tepeji respectivamente, lo que indica que una mayor proporción de los compuestos encontrados en la planta son polares.

La diferencia en rendimiento de los extractos obtenidos de *G. glutinosum* se atribuye principalmente a que las condiciones ambientales difieren enormemente entre las áreas de colecta, lo que coincide con lo mencionado por Lambers *et al.*, 1997 quien señala que los metabolitos secundarios en las plantas se sintetizan en respuesta a la intensidad de luz, estrés hídrico, suministro de nutrientes, altas temperaturas, entre otros factores; asimismo, Kinghorn *et al.*, 1992 y Bohnert *et al.*, 1998 mencionan que cuando las células o tejidos de las plantas son sujetas a condiciones de estrés hay un aumento en la producción de algunos de los metabolitos secundarios usualmente producidos en los tejidos de la planta. Lo que nos puede dar una idea de la mayor acumulación de metabolitos secundarios en la planta colectada de San Rafael, ya que la precipitación media es menor que la de Tepeji y la temperatura media es mayor (Anexo 1), encontrándose la planta en condiciones de mayor estrés.

---

Los metabolitos secundarios además de lo anteriormente señalado, también son utilizados como mecanismos de defensa contra patógenos, esta propiedad es mencionada por Murphy, 1999 y Lambers *et al.*, 1997 lo que explica la propiedad antibiótica de los extractos de plantas, entre ellas *G. glutinosum*.

Canales (*en proceso*), reportó que el extracto hexánico de la planta tuvo actividad contra mayor número de bacterias (6 cepas) y mostró los halos de inhibición mayores (19 mm para *S. aureus*), con respecto a los extractos de AcOEt, MeOH y agua, sin embargo, en la presente investigación se hizo una partición de dicho extracto y las fracciones mostraron actividad contra mayor número de cepas (9 cepas para San Rafael y 11 para Tepeji), además los halos de inhibición aumentaron considerablemente con respecto al extracto crudo por lo que puede inferirse, posiblemente que los compuestos presentes en este actúan de manera antagónica entre sí, o bien los compuestos con actividad antibacteriana se encuentran en una concentración muy baja.

La fracción polar del extracto hexánico tuvo mayor actividad antibacteriana y en general fue muy similar entre ambas localidades, variando únicamente en la actividad contra *B. subtilis* y *V. cholerae* Tor, ya que la fracción polar de San Rafael no actuó contra estas dos cepas. Tal similitud en cuanto a la actividad de las fracciones polares se atribuye a que estas presentan compuestos similares a diferentes concentraciones.

Las diferencias en concentración se hicieron evidentes al determinar la CMI y CBM de las fracciones mencionadas ya que para Tepeji estas fueron menores, mostrando valores por debajo de 0.125 mg/ml para 6 cepas. La fracción de San Rafael mostró este valor únicamente para una cepa (*S. lutea*). Lo que indica que en la fracción obtenida de la planta de Tepeji, el o los compuestos responsables de la actividad antibacteriana se encuentran en mayor concentración.

De una de las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna de la fracción polar de la planta de San Rafael, se aisló un diterpeno con actividad antibacteriana, siendo el ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico, cuya fórmula molecular es

---

$C_{20}H_{34}O_3$ . Este compuesto ya había sido aislado anteriormente por Maldonado *et al.*, 1994 y Calderón *et al.*, 2001. En el presente trabajo se compararon las señales de los espectros de IR, RMN  $^1H$ , RMN  $^{13}C$  y DEPT; con los datos obtenidos por los autores mencionados encontrando diferencias mínimas, debidas al solvente utilizado.

El ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico mostró un punto de fusión de 140 a 141° C, lo que coincide con lo mencionado por Harbone y Baxter, 1993, quienes señalan que los terpenos presentan puntos de fusión de 140 a 180° C. Sin embargo, este resultado varía con lo reportado por Maldonado *et al.*, 1994 quien aisló el compuesto y reporta para este un punto de fusión de 137 a 138° C; esta diferencia se atribuye a que el grado de pureza de los compuestos aislados posiblemente no es el mismo, ya que Domínguez, 1980 menciona que el punto de fusión para un compuesto puro no debe variar en más de 1° C.

En cuanto al espectro de absorción UV, Dey y Harbone, 1991 mencionan que los terpenos absorben de 275 a 380 nm, aunque este rango puede variar por efecto de los solventes utilizados en el aislamiento del compuesto, lo que explica que el espectro de absorción del diterpeno aislado se encontrara en los 244 nm.

Al evaluar la CMI y CBM del ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico, se observó que estos se mantienen constantes para *S. lutea* y *S. aureus*, sin embargo, disminuyeron para *S. epidermidis* y *V. cholerae* agua. Es importante hacer notar que para estas últimas los valores de CMI y CBM fueron menores a los que se habían obtenido con anterioridad al probar la fracción polar obtenida de la partición realizada al extracto hexánico (Tabla 9). La actividad antibacteriana del ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico puede ser debida al grupo OH libre que presenta, ya que Urzúa *et al.*, 1998 aisló un diterpeno con actividad antibacteriana y atribuye principalmente tal característica al grupo OH libre que presenta en su estructura química.

Finalmente, aunque se ha reportado que los diterpenos presentan actividad antibacteriana, (Harbone y Tomas, 1991), también se ha documentado que algunos de ellos son tóxicos, principalmente los diterpenos con esqueleto de taxano (Romo de

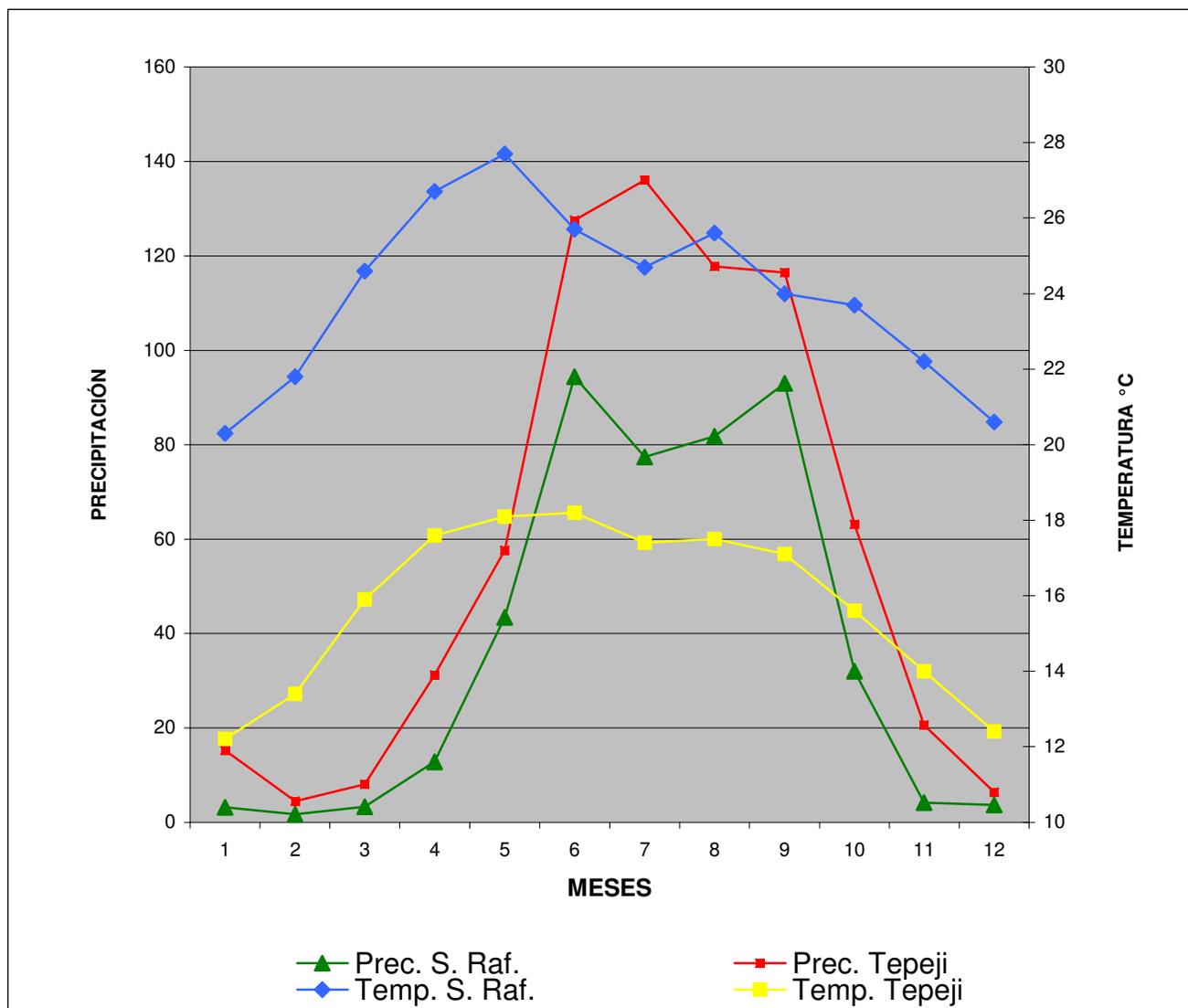
Vivar, 1985), por lo que es necesario, en estudios posteriores, realizar pruebas de citotoxicidad con el compuesto aislado, debido a que Argueta *et al.*, 1994 mencionan la presencia de sustancias tóxicas en la planta; también es necesario realizar el estudio fitoquímico completo de la planta, ya que se obtuvieron 13 fracciones que presentaron actividad antibacteriana y sólo una de ellas fue analizada.

## CONCLUSIONES

- *G. glutinosum* presenta actividad antibacteriana.
  
- La parte activa contra mayor número de bacterias es la partición polar del extracto hexánico para ambas localidades y esta no presentó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la actividad antibacteriana.
  
- Los compuestos con actividad antibacteriana no son afectados por las condiciones ambientales entre ambas localidades, pero si su concentración.
  
- El compuesto con actividad antibacteriana aislado de la planta es el ácido(-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico.
  
- El uso tradicional de esta especie, tiene una base fitoquímica.

## ANEXO

### RÉGIMENES DE PRECIPITACIÓN EN SAN RAFAEL COXCATLÁN Y TEPEJI DEL RÍO



(Tomado de García, 1981)

---

---

## APÉNDICES

### APÉNDICE I

#### DIFUSIÓN EN AGAR DE KIRBY-BAÜER.

(Koneman, 1985)

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los preparados herbales, y las fracciones producto de las separaciones cromatográficas, la metodología es la siguiente:

**a) MEDIO:** Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müeller-Hinton (Bioxon 110-1), 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 producen una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

**b) INOCULO:** Con un asa de siembra estéril se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante al de los microorganismos a ensayar (*Escherichia coli*, *Salmonella thypi*, *Shigella boydii*, etc. ) se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müller- Hinton ( Bioxon 260), se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Incubar el tubo de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estandar 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 cloruro de bario a 99.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36 N. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudios se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o en su defecto con un espectrofotómetro (Spectronic 21 Milton Roy ) a 660 nm.

Si la suspensión de organismos es menos turbia que el estándar, volver a incubar el tubo; si por el contrario, la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina al 0.9 % hasta igualarlas. Una vez logrado esto, se sumerge un segundo isopo estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlos se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el isopo contra la pared interna del tubo. Con este isopo se inocula la superficie de una placa de agar de Müller Hinton (Bioxon 110-1). previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente; es aconsejable mantener la tapa entre abierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar, finalmente, se siembra mediante estrías 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 la actividad antibacteriana.

**c) APLICACIÓN DE SUSTANCIAS:** Para este caso, se utilizarán sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5; se harán las diluciones necesarias para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto (2 mg/10µl).

Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con la sustancias a evaluar se colocan en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril.

**d) PREPARACIÓN DE MUESTRAS:** Para el bioensayo preliminar el vehículo será hexanos. En cuanto a la evaluación de las fracciones, los sensidiscos se impregnarán con las soluciones valoradas de las muestra hasta llegar a la concentración deseada de sustancias (2 mg/10µl) por disco dejando evaporar el solvente durante 24 horas.

**e) CONTROLES NEGATIVOS:** Para los bioensayos preliminares se utilizarán sensidiscos con hexanos (10µl) dejándolos evaporar durante 24 horas al igual que los experimentales.

**f) CONTROL POSITIVO:** Se evaluará la sensibilidad de las cepas experimentales a sensidiscos con 25 µg de cloranfenicol.

**g) INCUBACIÓN:** Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad. Se colocan en una incubadora (aparato 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 de 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 disimular 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 sustancias a evaluar como control (control negativo).

**h) INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:** Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, la prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio en mm.

## APÉNDICE II

### DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MINIMA (CBM).

#### MICROTÉCNICA DE DILUCIÓN EN CALDO (Koneman, 1985)

En esta técnica la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica. En éste caso, se utilizaron placas con 96 concavidades.

- La microplaca se prepara colocando 50 microlitros de caldo de Müeller-Hinton (Bioxon 260) con la concentración de extracto que se quiere probar en las concavidades apropiadas. La placa se deja durante 24 horas con el fin de que se evapore el solvente en el cual se disolvió el extracto.
- Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 ml de caldo Müeller-Hinton (Bioxon 260) y se incuba a 35°C durante 24 horas obteniendo una concentración bacteriana de aproximadamente 10 organismos/ml. En cada una de las 96 concavidades se colocan 50 microlitros de ésta suspensión.
- Una vez que se encuentra cargada la placa con la suspensión bacteriana, se cubre con su tapa para evitar el desecamiento durante la incubación la cual será a 35°C durante 24 horas.
- Como control negativo se utilizó como control negativo el solvente del extracto y clorenfenicol como control positivo.
- Después del tiempo de incubación, se añade a cada cavidad 50 microlitros de una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada. La placa se incuba otros 30 minutos. En las cavidades donde se desarrolla el organismo, el colorante es reducido a formazán, de color rojo visible, observándose un botón rojo en el fondo de la cavidad. Donde no hay desarrollo la solución permanece clara.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

**Acosta**, J. A. 1995. Determinación de la acción antibacteriana *in vitro* de plantas de uso popular sobre *Streptococcus pyogenes*. Tesis Biólogo. ENEP Iztacala. UNAM.

**Aguilar**, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez, P., López, M. E. 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. México. Pp 49-50.

**Ankli**, A., Heilmann, J., Heinrich, M., Sticher, O. 2000. Cytotoxic cardenolides and antibacterial terpenoids from *Crossopetalum gaumeri*, *Phytochemistry*. 54(5):531-537.

**Argueta**, V. A., Cano, A. L., Rodsarte, M. E. 1994. Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana III. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. pp. 1318-1319.

**Arroyo**, R. G.A. 1992. Contribución al estudio Fitoquímico de *Gymnosperma glutinosum*. Tesis Químico. FES Cuautitlán. UNAM. México. 45p.

**Azcon**, B. A., Talon, M. 1993. Fisiología y Bioquímica vegetal. Interamericana Mc Graw-Hill. Pp 239.

**Batista**, O., Simões, M. F., Duarte, A., Valdeira, M. L., De la Torre. M. C., Rodríguez, B. 1995. An antimicrobial abietane from the root of *plectranthus hereroensis*, *Phytochemistry*. 38(1):167-169.

**Bergolio**, R. M. 1979. Antibióticos. Ed. Panamericana. Argentina. pp. 17-25.

**Bohnert**, H. J. Sheveleva, E. 1998. Plant stress adaptations – making metabolism move. University of Arizona. Physiology and metabolism. pp. 267-273.

**Brooks**, F., Butel, J.S., Morse, S.A., 1999. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 16ª. Edición. Manual Moderno. México, D. F. 899p.

**Bruneton**, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Ed. Acribia. 593 p.

- Calderón**, J. S., Segura, C. R., Céspedes, C. L. Y toscano, R. A. 2001. Crystal and Molecular Structure of (-)-17 Hydroxy-neo-clerod-3-en-15-oic acid from *Gymnosperma glutinosum*. *Analytical Sciences*. 17:1467-1468.
- Canales**, M. M. 2000. Actividad antibacteriana de la planta *Alternanthera caracasana* (Tianguis) Tesis M. en C. ENEP. Iztacala. UNAM.
- Castilla**, H. M. E. 1983. Estudio Florístico de Cerro Gordo (Próximo a San Juan Teotihuacán) y regiones aledañas. Tesis Biólogo. ENEP Iztacala. UNAM. Pp 107.
- CETENAL**. 1978. Carta topográfica. 1:50,000. E14-A18.
- CETENAL**. 1980. Carta geológica. 1:50,000. E14-A18.
- Conrad**, J., Vogler, B., Klaiber, I., Roos, G., Walter U., Kraus, W. 1998. Two triterpene esters from *Terminalia macroptera* bark, *Phytochemistry*. 48(4):647-650.
- Dai**, J. Q., Xiu Z. Q., Yang Z. C., Yang, L., Li, Y. 2001. Glyceroglycolipids from *Serratula strangulata*, *Phytochemistry*. 58(8): 1305-1309.
- Dey** P. M. & Harbone, 1991. *Methods in plant, Biochemistry*. Vol. 7. Terpenoids. Editado Academia. Londres.
- Díaz**, P. M. 1997. Caracterización fisiológica ecológica de la Vegetación de la Subcuenca de Oriental Puebla-Tlaxcala-Veracruz. Tesis Lic. En Biología. UNAM. Campus Iztacala.
- Domínguez**, X. A. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa. México.
- Domínguez**, X. A. y Torre, B. 1974. Two pentamethoxylated flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry*. 13: 1624-1625.
- Domínguez**, X. A. 1980. *Experimentos de Química Orgánica*. Ed. Limusa. México. 203 p.
- Dominguez**, X. A. 1980. *Química Orgánica*. Ed. Continental. México. pp. 505-529.

---

**Foye, W. O.** 1991. Principios de Química Farmacéutica. Ed. Reverté. Barcelona. 986 p.

**García, E.** 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. CETENAL. México.

**Gibbons, S., Oluwatuyi, M., Veitch, N.C., Gray, A. I.** 2003. Bacterial resistance modifying agents from *Lycopus europaeus*, *Phytochemistry*. 62(1): 83-87.

**González, 1989**

**González, A. G., Abad, T., Jiménez, I. A., Ravelo, A. G., Zahira, A. J. G. L., San Andrés, L., Plasencia, M., Herrera J. R., Moujir, L.** 1999. A first study of antibacterial activity of diterpenes isolated from some *Salvia* species (Lamiaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*. 17(4):293-296.

**Gören, N., Bozok-Johansson, C., Jakupovic, J., Lin, L. J., Shieh, H.L., Cordell, G. A., Çelik, N.** 1991. Sesquiterpene lactones with antibacterial activity from *Tanacetum densum* subsp. *sivasicum*, *Phytochemistry*, 31(1):101-104.

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

**Hamburger, M. & Hostettmann, K.** 1991. Bioactivity in plants: The link between *Phytochemistry and Medicine*. *Phytochemistry*. 30(12):3864-3874.

**Harbone, J. B. & Tomas. B. F. A.** 1991. *Ecological Chemistry and Biochemistry of plant terpenoids*, Oxford Science Publications. pp. 230-251.

**Harbone J. B. & Baxter, H.** 1993. *Phytochemical dictionary a handbook of bioactive compounds from plants*. Taylor and Francis. London.

**Heinrich, M., Robles, M., West, J. E., Ortiz de Montellano, B.R. & Rodriguez, E.** 1998. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). *Ann. Rev. of Pharmacol. and Toxicol.* 38: 539-565.

**Hernández**, T., Canales, M., Ávila, J. G., Durán, A., Caballero, J., Romo, V. A., Lira, R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*. 88: 181-188.

**Heywood**, V. H., Harbone, J. B. & Turner, B. L. 1997. *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Academic Press. New York. U.S.A. 619 p.

**Hill**, A. F. 1965. *Botánica Económica. Plantas útiles y productos vegetales*. Ediciones Omega. Barcelona. pp. 280-282.

**Horie**, T., Ohtsuru, Y., Shibata, K., Yamashiata, K., Tsukayama, M. Y kawamura, Y. 1998. C NMR spectral assignment of the a-ring of Polyoxygenated flavones. from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry*. 47: 865-874.

**INEGI**. 1984 (c). Carta edafológica. 1:250,000. E14-6.

**INEGI**. 1984 (b). Carta geológica. 1:250,000. E14-6.

**INEGI**. 1984 (a). Carta uso del suelo y vegetación. 1:250,000. E14-6.

**INEGI**. 1991. Carta topográfica. 1:250,000. E14-6.

**Judd**, W. S., Cambell, C. S. Kellog, E. A. Stevens, P. F. 1999. *Plant Systematics a Phylogenetic Approach*. Sinauer Associates. USA. pp. 8

**Katerere**, D. R., Gray, A. I., Nash, R. J., Waigh, R. D. 2003. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from African Combretaceae, *Phytochemistry*. 63(1):81-88 .

**Katzung**, B. G. & Trevor, A. J. 1991. *Farmacología. El Manual Moderno*. pp 318-321.

**Kazmi**, M. H., Malik, A., Hameed, S., Akhatar, N., Noor, A, S. 1994. An anthraquinona derivative from *Cassia Italica*. *Phytochemistry*. 36: 761-763.

**Kinghorn**, D. A. y Balandrin, M. F. 1992. *Human medicinal agents from plants*. American Chemical Society. Washington. pp 73.

**Kolocouris**, A., Mavromoustakos, T., Demetzos, C., Terzis, A., Golic, G. S. 2001. Structure elucidation and conformational properties of a novel bioactive clerodane diterpene using a combination of high field NMR spectroscopy, computational analysis and X-ray diffraction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 11(6): 837-840.

**Koneman**, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Sommers, H. M. 1985. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana. México. 386-393.

**Kubo**, Y. 1993. Antimicrobial activity of green tea flavor components. En bioactive volatile compounds from plants. Editores American Chemical Society. E. U. A.

**Kumate**, J. 1981. Antibiótico y Quimioterapia. Ed. Francisco Méndez Hernández. México.

**Lambers**, H., Chapin, F. S., Pons, T. L. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer. United States of America. Pp. 427.

**Lozoya**, X., Aguilar, A. y Camacho, J. R. 1987. Encuesta sobre el uso actual de las plantas en la Medicina Tradicional Mexicana. *Rev. Med. IMSS*. México. 25(4):283-291.

**Maldonado**, E., Segura, C.R., Ortega, A. Calderón, J. S. Y Fronczek, F. R. 1994. Ent-Labdane and neo-clerodane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry*. 35:721-724.

**Martínez**, M. 1967. Las plantas medicinales de México, Ediciones Botas. Sexta Edición. México. pp. 299-300.

**Martínez**, R., Calderón, J. S. Toscano, R. A., Valle, A. L. Y Mendoza, C. H. M. 1994. Ent- Neoclerodane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum*. *Phytochemistry*. 35: 1505-1507.

**Méndez**, M. J. 1995. Actividad antimicrobiana de *Tanacetum parthenium* (L.) Fam. Compositae. Tesis Biólogo. UNAM. ENEP Iztacala. Pp 2-21.

**Miyakado**, M., Ohno , N., Yoshioka, H., Mabry, T. J. and Whiffin, T. 1974. Gymnospermin: A new labdan triol from *Gymnosperma glutinosa*. *Phytochemistry*. 13:189-190.

**Murphy**, C. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. 12:4:564-582.

**Núñez**, R. J. E. 1990. Estudio Florístico de la Vertiente Oriental de la Sierra de alcaparrosa en el Estado de México. Tesis Lic. En Biología. ENEP Iztacala. UNAM. 122 p.

**Opalchenova**, G., Obreshkova, D. 2003. Comparative studies on the activity of basil—  
—an essential oil from *Ocimum basilicum* L.—against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. *Journal of Microbiological Methods*. 54(1):105-110.

**Ortíz**, Z. E. H. 1996. Actividad antibacteriana de la raíz de *Buddleia cordata*. Tesis Biólogo. ENEP Iztacala. UNAM.

**Paredes**, F. M. 2001. Estudios ethnobotánicos en Sapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis Lic. En Biología. UNAM. Campus Iztacala.

**Pérez**, C., Agnese, A. M., Cabrera, J. L. 1999. The essential oil of *Senecio graveolens* (*Compositae*): chemical composition and antimicrobial activity tests. *Journal of Ethnopharmacology*. 66(1): 91-96.

**Rabe**, T., Mullholland, D., van Staden, J. 2002. Isolation and identification of antibacterial compounds from *Vernonia colorata* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 80(1):91-94.

**Reyes**, 1993. Estudio Florístico en el Municipio de San Juan Mixtepec, Distrito de Juxtlahuaca, Oaxaca. Tesis Biólogo. UNAM. Campus Iztacala. pp 1,58.

**Robin**, S. L. Taylor., Towers, G. H. N. 1998. Antibacterial constituents of the nepalese medicinal herb, *Centipeda minima*. *Phytochemistry*. 47(4): 631-634.

**Rocha**, A. I. F. 2002. Evaluación antibacteriana de algunas plantas medicinales utilizadas en la región de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis Biólogo. UNAM Campus Iztacala. 52 p.

**Romero**, R. S. 1982. Estudio florístico de la Región de Huehuetoca, Estado de México. Tesis Biólogo. ENEP Iztacala. UNAM. 36 p.

**Romo** de Vivar, A. 1985. Productos naturales de la flora mexicana. Limusa. México. pp 70. 220 p.

**Royo**, M. M. H. & Melgoza, C. A. 2001. Listado florístico del campo experimental La campana y usos de su flora. 39(2)105-125.

**Rubio**, C. L. J. 1996. Estudio Químico y microbiológico de la planta *Eucaliptos globulus*. Tesis Biólogo. UNAM. ENEP Iztacala. pp. 1-14.

**Ruíz**, V. R. 2001. Actividad antibacteriana de extractos vegetales contra cepas de *Escherichia coli* de origen clínico. Tesis. M en C. FES. IZTACALA. UNAM. México. pp. 15-17.

**Rzendowski**, 1972. Contribuciones a la Fitogeografía florística e histórica de México III. Algunas tendencias en la distribución geográfica y ecológica de las Compositae mexicanas. Ciencias. México. 27:123-132.

**Rzendowski**, J. y C de Rzendowsky G. 1985. Flora Fanerogámica del Valle de México Vol II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN e Instituto de Ecología. México. pp. 501, 581.

**Rzendowski**, J. 1991. Diversidad y orígenes de la Flora fanerogámica del Valle de México. Acta Botánica Mexicana. 4:3-21.

**Sánchez**, G. A. 1998. Clasificación y ordenación de la Vegetación de la Sierra de Catorce, San Luis Potosí. Tesis M en C. ENEP Iztacala. UNAM. pp 170.

**SEMARNAT.** (2001). *Gymnosperma glutinosum*. Especies con usos no maderables en bosques de encino, pino y pino-encino en los Estados de Chihuahua, Durango, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca.

**Stumpf,** P. K., Conn, E. E. 1981. The Biochemistry of plants. Vol 7. A comprehensive Treatise. Editors-in-chief. USA. pp 170.

**Suthivaiyakit,** S., Thapsut, M., Prachayasittikul, V. 2000. Constituents and bioactivity of the tubers of *Euphorbia sessiliflora*. *Phytochemistry*. 53(8):947-950.

**Tapia,** C. B., Ascarrunz, R. L. F. & Mena, T. R. 2000. Valoración *in vitro* de la actividad antibacteriana de especies vegetales. Universidad Mayor de San Andrés. Bolivia.

**Taylor,** R. S. L. y Towers; H. N. 1997. Antibacterial constituents of the Nepalese medicinal herb, *Centipeda minima*. *Phytochemistry*. 47(4):631-634.

**Tenorio,** L. P. 1997. Estudio florístico de la Cuenca de Río Hondo, Puebla Oaxaca, México. Tesis Biólogo. UNAM. ENEP Iztacala. pp. 1-26.

**Topçu,** G., Erenler, R., Çakmak, O., Bozok J. C., Çelik, C., Chai H., Pezzuto, J. M. 1999. Diterpenes from the berries of *Juniperus excelsa*, *Phytochemistry*, 50(7): 1195-1199

**Trease,** G. E. y Evans, W. C. 1993. Tratado de Farmacognosia. 15<sup>a</sup> ed. Ed. Interamericana. México. pp 728-730.

**Trujillo,** H. A. 1988. Aspectos ecológicos y fenológicos de un Pastizal semiárido de Coxcatlán, Puebla. Tesis. Biólogo. ENEP Iztacala. UNAM. México.

**Ulubelen,** A. 2004. Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochemistry*. 64(2): 395-399.

**Urzua,** A., Caroli, M., Vasquez, L., Mendoza, L., Wilkens M., Tojo, E. 1998. Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 62(3):251-254.

**Villegas**, D. M. 1970. Estudio Florístico y ecológico de las plantas arvenses de la parte meridional de la Cuenca de México. An. Escuela Nacional de las Ciencias Biológicas. 18:17-89.

**Walker**, T. S. 1998. Microbiología. Ed. Mc Graw-Hill. Interamericana. México. pp. 79-85.

**Yu**, S., Fang, N. Y Mabry, T. J. 1988. Flavonoids from *Gymnosperma glutinosum*. Phytochemistry. 27: 171-177.

**Zavaleta**, M. G. 1996 Flora y evaluación ambiental de la barranca Arroyo Santa Cruz, Naucalpan, Estado de México. Tesis Lic en Ecología. Universidad del Valle de México. pp. 65-112.