



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

IZTACALA

EFECTO ANTIMICROBIANO DE LA RAÍZ DE
Gymnosperma glutinosum (Spreng.) Less. (POPOTE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA

ISABEL ARELI ANDRADE RODRÍGUEZ

DIRECTORA DE TESIS M. EN C. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2005



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.

AGRADECIMIENTOS

A la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de ella.

Al Dr. Guillermo Acevedo por recibirme en el Laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos, así mismo por sus valiosas aportaciones en la realización de este trabajo.

A la M. en C Margarita Canales no solo por dirigir esta Tesis, si no por enseñarme que con disciplina y dedicación las cosas se hacen rápido y bien. Además por contagiarme su entusiasmo y pasión por el trabajo. Mil gracias.

A la Dra. Tzasná Hernández y la M. en C. Ana María García por su tiempo, dedicación y paciencia (prometo ya no comerme los puntos).

A la Bióloga Edith López Villafranco por sus valiosas sugerencias, por adoptarme en el herbario y por transmitirme el amor a la Botánica.

A Rocío Serrano por el apoyo brindado.

DEDICATORIAS

A Dios por regalarme la vida y estar conmigo en todo momento.

A mis padres que con su ejemplo me han enseñado que uno llega hasta donde quiere, por su apoyo, paciencia y confianza. A ti mamá por defenderme a capa y espada y a ti papá por el apoyo y los desafíos que me pones día con día, pero sobre todo por su amor. Este pequeño paso es de los cuatro.

A Karla por compartir conmigo noches de desvelo sin quejarse, por escuchar mis raras explicaciones, por los momentos de locura juntas. Te Amo chiquita

A Julio porque como dice Benedetti: Si te quiero es por que sos mi amor, mi cómplice y todo...

A Carlos y Julio por las muchas noches y pocos días compartidos, por escucharme, por sus consejos y cariño. Los quiero.

A mis amigos Anibal, Sheyla, Victor, Janet, Vero, Naza, Aleli, Salomé y Ricardo por hacer más amena mi estancia en la Universidad, por los buenos momentos y por los que vendrán.

A mi familia por su confianza y apoyo.

Al Laboratorio de Biorregulación en especial a Lalo y Toño por los divertidos días de experimentos fallidos y a las ratitas muertas en pro de la ciencia.

A mis amigos del 420, por las reuniones anuales. A Rosario, Paulina, Alfredo, Adriana (ALAG), Erika, Diana y Marina, y a los que han influido en mi, haciéndome mejor persona.

A mi

Í N D I C E

ÍNDICE GENERAL	4
ÍNDICE DE GRÁFICOS, FIGURAS Y TABLAS	6
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN	9
<i>Plantas medicinales</i>	9
<i>Metabolitos secundarios</i>	11
<i>Antimicrobianos de origen vegetal</i>	14
<i>Metabolitos secundarios de las raíces</i>	18
<i>Enfermedades de origen bacteriano y fúngico</i>	20
<i>Familia Asteraceae</i>	22
GÉNERO <i>Gymnosperma</i> Less.	24
<i>Gymnosperma glutinosum</i> (Spreng.) Less.	25
ANTECEDENTES	29
OBJETIVOS	32
ZONA DE COLECTA	33
METODOLOGÍA	37
RESULTADOS Y ANÁLISIS	40
<i>Colecta de la planta</i>	40
<i>Bioensayos preliminares</i>	40
Extracción por maceración	40
Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana	41
<i>Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana</i>	45
Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica	47
Aislamiento y caracterización de la fracción activa	49
DISCUSIÓN	53
CONCLUSIONES	58
APÉNDICE I Antibióticos	59
<i>Antibacterianos</i>	59
<i>Antifúngicos</i>	67
APÉNDICE II <i>PATOLOGÍA DE CEPAS BACTERIANAS Y FÚNGICAS</i>	69

APÉNDICE III.....	74
<i>MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR DE KIRBY – BAÜER</i>	74
<i>MÉTODO CUALITATIVO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL</i>	77
APÉNDICE IV <i>MICROTÉCNICA DE DILUCIÓN EN CALDO</i>	78
BIBLIOGRAFÍA	80

INDICE DE CUADROS, FIGURAS Y GRAFICOS

Cuadros

Cuadro 1. Naturaleza química de algunos compuestos aislados de plantas con actividad antimicrobiana	14
Cuadro 2. Tipos de Suelo encontrados en Zapotitlán Salinas, Puebla	35
Cuadro 3. Tipos de Vegetación de Zapotitlan Salinas, Puebla	35
Cuadro 4. Microorganismos utilizados	38
Cuadro 5. Comparación del rendimiento de los extractos de la raíz y parte aérea de <i>G. glutinosum</i>	41
Cuadro 6. Actividad antibacteriana de los extractos de la raíz de <i>G. glutinosum</i>	42
Cuadro 7. CMI y CBM de los extractos activosobtenidos de las raíces de <i>G. glutinosum</i>	45
Cuadro 8. Actividad antifúngica de los extractos de la raíz de <i>G. glutinosum</i>	47
Cuadro 9. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto hexánico de la raíz de <i>G. glutinosum</i>	50
Cuadro 10. Actividad de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto hexánico	51

Figuras

Figura 1. Estructura química del Isopreno	15
Figura 2. Estructura química de los flavonoides (Flavano)	16
Figura 3. <i>Gymnosperma glutinosum</i> (Spreng.) Less.	26
Figura 4. Distribución de <i>G. glutinosum</i> en el territorio nacional	27
Figura 5. Ubicación geográfica de Zapotitlán Salinas, Puebla	33
Figura 6. Microplaca para determina CMI y CBM	46
Figura 7. CMI y CBM de extracto de acetato de etilo sobre <i>S. aureus</i>	46
Figura 8. <i>R. solani</i> y sensidiscos del extracto hexánico	48

Figura 9. <i>R. solani</i> y densidiscos del extracto de acetato de etilo	48
Figura 10. <i>R. solani</i> y sensidiscos del extracto metanólico	48
Figura 11. <i>F. sporotrichum</i> y sensidiscos del extracto hexánico	48
Figura 12. Difusión en agar de las fracciones del extracto hexánico sobre <i>V. cholerae</i> caso clínico	51

Gráficos

Gráfico 1. Rendimiento (contenido de sólidos en g) de cada uno de los extractos obtenidos de la raíz de <i>G. glutinosum</i>	40
Gráfico 2. Comparación de la actividad antibacteriana de los extractos de la raíz de <i>G. glutinosum</i>	43
Gráfico 3. Sensibilidad bacteriana a los extractos de la raíz de <i>G. glutinosum</i>	44

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de la raíz de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. colectada en Zapotitlán Salinas, Puebla. Se obtuvieron extractos de distinta polaridad (hexánico, de acetato de etilo y metanólico), se determinó que el extracto de mayor rendimiento fue el metanólico.

Los bioensayos se realizaron sobre 12 cepas bacterianas (4 gram positivas y 8 gram negativas) y 6 especies de hongos de importancia médica y agronómica.

Los extractos que mostraron actividad antibacteriana fueron el hexánico y de acetato de etilo. El extracto hexánico actuó sobre 4 cepas bacterianas y el de acetato de etilo sobre 8 de ellas. Los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico mostraron actividad antifúngica. El extracto hexánico exhibió actividad sobre las especies *F. sporotrichum*, *R. solani* y *C. albicans*, mientras el extracto de acetato de etilo fue activo contra *R. solani* y *C. albicans*, también el extracto metanólico presentó actividad contra *R. solani*.

Para la evaluación cuantitativa de la actividad de los extractos se registró que el extracto hexánico posee un efecto bactericida a una concentración menor a 0.125 mg/ml sobre la cepa de *V. cholerae* caso clínico.

Se eligió fraccionar el extracto hexánico mediante cromatografía en columna debido a la presencia de cristales, los antecedentes fitoquímicos y a que presentó los valores más bajos de CMI y CBM. De la cromatografía en columna se obtuvieron un total de 35 fracciones, 4 de las cuales exhibieron actividad antibacteriana. Se caracterizó la fracción 25S por presentar halos de inhibición mayores, se realizó una cromatografía en capa fina usando como fase móvil Hexanos - Cloroformo 6:4, se reveló con sulfato sérico y se obtuvieron 4 manchas cuyos R_f fueron 0.12, 0.217, 0.30, 0.385. También se determinó que el diterpeno ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico no está presente en la fracción activa 25S aislada de la raíz de *G. glutinosum*.

INTRODUCCIÓN

Plantas medicinales

El hombre desde épocas remotas ha buscado en las plantas sustancias útiles para aliviar y curar sus enfermedades, por lo cual las plantas medicinales constituyen el recurso mas conocido y accesible para grandes núcleos de la población. La información sobre el uso de las plantas medicinales ha sido adquirida de manera empírica y transmitida de generación en generación, este conocimiento se ha recopilado mediante informes escritos desde hace 6,000 años (Argueta, et al., 1994; Cordero, 1996).

Culturas tales como la Hindú, China, Romana y Griega poseen una basta cantidad de obras relacionadas con las plantas medicinales. Algunos de los documentos más antiguos son el *Papiro de Ebers* escrito hace aproximadamente 3500 años y el Rig Veda que data del año 1500 a.C. (Domínguez, 1973; Summer, 2001).

Entre los herboristas destaca el médico griego Hipócrates (460-377 a.C.) quien utilizaba a las plantas con el objeto de reestablecer la salud de sus pacientes. Teofrasto (371-287 a.C.) considerado como el primer botánico estudió ampliamente las plantas medicinales, dicho conocimiento quedó plasmado en su obra *Historia Plantarum*. Pedanio Dioscórides (Primer siglo a.C.) reunió en su obra *De Materia Medica*, un tratado completo de las propiedades, usos y cultivo de 600 plantas medicinales (Domínguez, 1973; Gómez, 1990; Summer, 2001).

En México el conocimiento de las plantas medicinales antes de la conquista era muy extenso, y se incremento con la introducción de nuevas plantas por parte de los conquistadores, esta información quedó inmersa en documentos como el Códice de la Cruz Badiano y el Códice Florentino (Domínguez, 1973; Estrada, 1989; Summer, 2001).

El Códice de la Cruz Badiano (*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*), es considerado el primer tratado posterior a la conquista sobre plantas curativas. Dicho tratado fue dictado en náhuatl en 1552 por el médico indígena Martín de la Cruz, posteriormente fue traducido al latín por Juan Badiano e ilustrado con dibujos de las plantas en un estilo típicamente indígena. El documento incluye partes subterráneas como raíces, rizomas y bulbos (Domínguez, 1973; Estrada, 1989; Summer, 2001).

El Códice Florentino redactado por Fray Bernardino de Sahagún entre los años de 1548-1585, tuvo como propósito inicial contribuir a la evangelización de los indios, mediante el diagnóstico de la realidad material e intelectual de los pueblos nahuas, así como sus costumbres prehispánicas incluida la religión. Esta obra contiene tres tomos con 12 libros escritos a dos columnas en castellano y náhuatl, el libro XI está dedicado exclusivamente a las plantas medicinales (Domínguez, 1973; Estrada, 1989; Summer, 2001).

El creciente interés en curar sus enfermedades ha hecho que el hombre profundice en el conocimiento de especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen (Lozoya, et al., 1987).

Metabolitos Secundarios

Las plantas poseen dos tipos de metabolismo denominados primario y secundario. El primero incluye sustancias como proteínas, clorofilas y carbohidratos entre otras, las cuales son comunes en todas las plantas. El metabolismo secundario, abarca sustancias que por lo general son biosintetizados a partir de metabolitos primarios, las plantas pueden producir más de 100,000 compuestos de este tipo, poseen bajo peso molecular. Normalmente se localizan en órganos y tejidos específicos, sólo son activados durante etapas particulares de crecimiento y desarrollo, períodos de estrés o ataques microbianos. A los compuestos que se obtienen como producto del metabolismo secundario de la planta se les conoce como productos naturales (Gros, et al., 1985; Mann, 1987; Hopkins, et al., 1995).

Algunos de los metabolitos secundarios son responsables de la coloración y aromas de flores y frutos, otros están vinculadas con interacciones ecológicas, como quimioatrayentes de insectos y animales polinizadores y dispersores de semillas (Hopkins, et al., 1995; Kaufman, et al., 1999). Actualmente, se ha demostrado que principalmente la mayoría de ellos participan en el mecanismo de defensa de las plantas (Harsh, et al., 2004). Entre estos últimos, se consideran a las fitoalexinas y los alelopáticos (Vivanco, et al., 2002).

Aunado a las funciones que presentan en las plantas los metabolitos secundarios pueden ser usados como agroquímicos naturales, insecticidas, herbicidas, reguladores de crecimiento, en fragancias, fibras, bebidas y fármacos entre otros (Kaufman, et al., 1999; Domingo & López -Brea, 2003).

Para el estudio de los metabolitos secundarios la fitoquímica permite aislar e identificar los principios activos de numerosas plantas con importante actividad biológica, tal es el caso de las plantas medicinales.

Aproximadamente el 60% de la población del mundo confía casi completamente en plantas para el tratamiento de enfermedades y los productos naturales han sido mucho tiempo reconocidos como una fuente importante de medicamentos terapéuticamente eficaces. De los 520 nuevos medicamentos aprobados entre 1983 y 1994, el 39% fueron obtenidos a partir de plantas, entre estos el 60-80% de antibacterianos y medicamentos citotóxicos fueron derivados de metabolitos secundarios (Harvey, 2000).

De acuerdo con Huerta (1997) alrededor de 15% de la riqueza florística mundial (37 000 especies) posee virtudes curativas. Sin embargo, de las 265 mil especies de plantas superiores que se calcula que habitan el planeta, únicamente se han estudiado en busca de actividad farmacológica entre el 5 y 10% (Cordero, 1996).

México es uno de los países que posee mayor diversidad biológica en el mundo, cuenta aproximadamente con 10% de las especies de animales y plantas que viven en el planeta. Su extraordinaria riqueza florística (26 500 especies de las cuales aproximadamente 9500 son endémicas) lo ubica en el cuarto lugar mundial. El país ofrece las condiciones adecuadas para la existencia de todos los tipos de vegetación con excepción de la tundra, debido a que en él convergen las zonas biogeográficas neártica y neotropical, la existencia de un mosaico de climas, distintos orígenes edafológicos, su historia geológica y su compleja topografía (Rzedowski & Equihua, 1987; Soberón & Llorente, 1993).

Las distintas etnias que habitan en México permitieron que la herbolaria floreciera desde la época prehispánica, actualmente se han registrado en México alrededor de 4000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total), la validación química, farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en 5% de estas especies (Huerta, 1997).

La riqueza cultural y vegetal de México lo convierten en una de las regiones más favorables para la realización de investigaciones sobre flora medicinal, de la cual muy probablemente se podrán aislar y estudiar los metabolitos secundarios presentes en las diversas especies de plantas medicinales.

Antimicrobianos de origen vegetal

Se han aislado alrededor de 12,000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituyen tan sólo el 10% de los metabolitos secundarios. Un porcentaje importante posee cierta actividad antimicrobiana, estos pueden obtenerse de las plantas medicinales como mezclas complejas en: infusiones, aceites esenciales, tinturas o extractos. También se aíslan como principios activos químicamente puros (Hamburger & Hostettmann, 1991) en el cuadro número uno se citan algunos de los compuestos químicos aislados de plantas medicinales que son usados para aliviar enfermedades de origen bacteriano y fúngico.

Cuadro 1. Naturaleza química de algunos compuestos aislados de plantas con actividad antimicrobiana

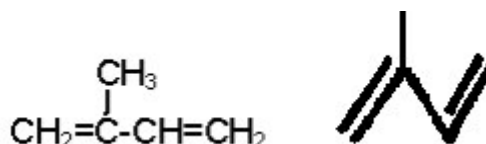
Nombre científico	Naturaleza química	Actividad contra	Referencia
<i>Mentha aquatica</i>	Monoterpeno	<i>Escherichia coli</i>	Mimica-Dukic, et al., 2003
<i>Mentha longifolia</i>	Monoterpeno	<i>Escherichia coli</i>	Mimica-Dukic, et al., 2003
<i>Mentha piperita</i>	Monoterpeno	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella sonnei</i> , <i>Micrococcus flavus</i> ATTC 10, 240, <i>Trichophyton tonsurans</i> , <i>Candida albicans</i>	Mimica-Dukic, et al., 2003
<i>Warburgia ugandensis</i>	Sesquiterpeno	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Sclerotinia libertiana</i>	Kubo & Taniguchi, 1988
<i>Angelica gigas</i>	Cumarina	<i>Bacillus subtilis</i>	Lee, et al., 2003
<i>Camelia sinensis</i>	Flavonoide	<i>Shigella</i> sp., <i>Vibrio</i> , <i>S. mutans</i>	Domingo & López-Brea, 2003
<i>Erythrina variegata</i>	Isoflavonoides	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a metilicina	Tanaka, et al., 2002
<i>Camellia sinensis</i>	Flavona	<i>Vibrio cholerae</i> 01, <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Shigella</i> sp	Domingo & López-Brea, 2003
<i>Tagetes lucida</i>	Flavona	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>V. cholerae</i>	Hernández, 1999
<i>Alternanthera caracasana</i>	Cumarina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Shigella boydi</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Sarcina lutea</i> , <i>V. cholerae</i>	Canales, 2000

Los metabolitos secundarios usados como antimicrobianos se pueden clasificar de la siguiente manera:

Terpenos

Los terpenos son generalmente lipofílicos y pueden ser considerados polímeros de el 5-carbono 2 metil-1,3 butadieno o isopreno (Figura 1.) (Hopkins, 1995).

Fig. 1 Estructura química del Isopreno



La clasificación de este grupo de metabolitos secundarios se basa en el número de unidades de isopreno que lo componen: monoterpenos (2), sesquiterpenos (3), diterpenos (4), triterpenos (6), tetraterpenos (8), politerpenos (n) (Gros, et al., 1985).

La actividad antimicrobiana de estos compuestos se relaciona con la 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 (Murphy, 1999).

Compuestos fenólicos

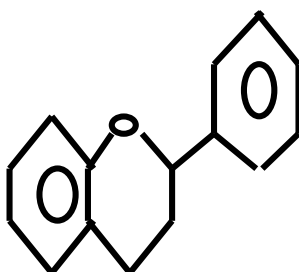
Los compuestos fenólicos se caracterizan por tener un anillo fenólico sustituido. La posición y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad (Domingo & López-Brea, 2003).

Quinonas. Este grupo de metabolitos secundarios están formados por un anillo aromático con dos grupos funcionales ceto. Producen el color marrón de las frutas cuando se dañan y son ubicuas en la naturaleza. Su potencial antimicrobiano se debe a que forman complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas por lo que las inactivan y anulan su función (Domingo & López-Brea , 2003).

Taninos. Este grupo es subdividido en taninos condensados e hidrolizables. Los taninos condensados son polímeros de unidades de flavonoides ligados por enlaces C-C, mientras tanto los taninos hidrolizables son esteres de ácidos fenólicos y un poliol que usualmente es la glucosa (Hopkins, 1995). Entre los mecanismos de acción propuestos para explicar la actividad antimicrobiana de los taninos se incluyen la inhibición de enzimas microbianas extracelulares, la privación de los substratos requeridos para el crecimiento microbiano o la acción directa en el metabolismo microbiano a través de la inhibición de la fosforilación oxidativa. También pueden formar complejos metal-tanino, que hacen inaccesibles los metales en la célula e impiden el adecuado funcionamiento celular del microorganismo (Scalbert,1991).

Flavonoides. Los flavonoides son difenilpropanos, por lo tanto se caracterizan por tener un esqueleto de 15 carbonos que provienen biogénicamente de tres unidades de acetato (C_6) y una unidad de fenilpropano (C_6-C_3), por ello su esqueleto se representa por $C_6-C_3-C_6$ (Gros, et al., 1985).

Figura 2. Estructura química de los flavonoides (Flavano).



El mecanismo de acción de los flavonoides como antimicrobianos se debe a la presencia de grupos hidróxilo libres y a que poseen una estructura planar similar a la de las bases púricas y pirimídicas, además de que pueden formar puentes de hidrógeno con ellas, por lo que se intercalan entre las bases nitrogenadas de la doble hélice inhibiendo la síntesis de ADN o ARN (Mori, et al., 1987).

Alcaloides

Se denominan alcaloides a los compuestos nitrogenados heterocíclicos, su mecanismo de acción está relacionado con una intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo (Domingo & López–Brea , 2003; Summer, 2001)

Metabolitos secundarios de las raíces

El uso de las raíces como medicamentos se remonta varios siglos, la raíz de Mandrágora (*Mandragora officinalis*) es mencionada en el antiguo testamento (Génesis 30:14) y durante la Edad Media fue la planta preferida de las “brujas y brujos” por ser alucinogéno (Vivanco, et al., 2002).

Las raíces de las plantas acumulan químicos biológicamente activos, además continuamente producen y secretan compuestos dentro de su medio ambiente (rizosfera). Alrededor del 10% del carbono fijado fotosintéticamente es secretado por las raíces (Gleba, et al., 1999).

Los tipos de metabolitos secundarios provenientes de plantas medicinales encontrados en raíces son sintetizados en función de los siguientes factores:

Factores abióticos. Algunos de los que pueden producir variaciones en los componentes secundarios de la planta son condiciones de nutrición, suelo, luz, temperatura, suministro de agua, altitud y los métodos de cultivo (Vanhaelen, et al., 2000; Yaniv & Bachrach, 2002).

Factores bióticos tales como infecciones bacterianas, fúngicas o virales, la presencia de insectos o su ovoposición, la competencia con otras plantas y la herbivoría (Vanhaelen, et al., 2000).

Factores genéticos. Las poblaciones de plantas son una entidad dinámica, por lo que a menudo se producen mutaciones que pueden propiciar variaciones metabólicas que modifiquen las características químicas de la planta. Estas modificaciones pueden ser no recesivas y conferir a la planta, después de recombinación genética, una adaptabilidad a diferencias ecológicas (Vanhaelen, et al., 2000).

Ontogénicos. Estos factores también desempeñan un papel significativo en la naturaleza de los componentes activos encontrados en las raíces de las plantas medicinales. Aunque se espera que las concentraciones de metabolitos secundarios aumenten con la edad de la planta, esto no es generalmente así, ya que estos componentes puede variar también según la etapa de desarrollo (Yaniv & Bachrach, 2002).

Enfermedades de origen bacteriano y fúngico

Las enfermedades infecciosas ocasionan serios problemas de salud, aunado a esto los microorganismos han desarrollado resistencia a los antibióticos, lo que dificulta su tratamiento (Davis, 1994). En México las dos primeras causas de morbilidad en el año 2002 fueron las infecciones de vías respiratorias y las infecciones intestinales (SSA, 2002), así mismo la diarrea es, responsable de aproximadamente 5 millones de muertes al año en infantes (0-4 años) (INEGI, 2001).

Entre las bacterias que producen enfermedades de importancia médica se encuentran cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *epidermidis* ya que constituyen una fuente de infección en pacientes hospitalizados (Apéndice II) (Mims, et al., 1999; Humphrey, 2002). El principal foco de infección para los humanos son los alimentos contaminados, estos pueden contener bacterias como *Shigella boydy*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae* y *Salmonella tify* que provocan infecciones gastrointestinales de importancia médica (Apéndice II) (Myrvin & Weiser, 1991; Mims, et al., 1999; Cordell, 2000; Chart, 2002 a,b,c). Hongos patógenos como *Tricophyton mentagrophytes* y *Aspergillus niger* ocasionan micosis superficiales y micosis profundas o sistémicas en el hombre (Apéndice II) (Myrvin & Weiser, 1991). *Candida albicans* es una de las principales levaduras patogénicas, infecta especialmente a pacientes inmunocomprometidos y puede invadir varios tejidos (Apéndice II) (Myrvin & Weiser, 1991; Esquenazi, et al., 2002).

De manera directa el hombre se ve también afectado por hongos fitopatógenos, ya que millones de personas dependen de los productos vegetales para sobrevivir. Las enfermedades ocasionados por hongos reducen la variedad de plantas que pueden desarrollarse en una determinada zona geográfica, así como las fuentes de empleo que se generan con los cultivos y el procesamiento del material vegetal. El tipo y monto de las pérdidas ocasionadas por las enfermedades de las plantas varía de acuerdo a la

especie, el agente patógeno y la localidad entre otras. Entre los hongos patógenos de plantas se pueden mencionar *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichum* y *Rhizoctonia solani* que provocan daños en granos almacenados, raíces, tallos y hojas de plantas de importancia económica (Apéndice II) (Fich & Fich 1974; Agrios, 1996).

El tratamiento de estas y otras enfermedades se ve dificultado por la aparición de patógenos resistentes a los distintos fármacos, las agentes antifúngicos presentan problemas de solubilidad, estabilidad y absorción. En el caso de las infecciones fúngicas en plantas, el costo del método de control es muy elevado (Agrios, 1996; Cordell, 2000).

El desarrollo de nuevos agentes antibacterianos y antifúngicos puede hacerse de manera sintética, semisintética, por ingeniería genética, química combinatoria u obtenerse de productos naturales, por lo cual las plantas constituyen una fuente importante para tal uso, ya sea como agente terapéutico directo o después de sufrir modificaciones químicas para incrementar su potencia, reducir su toxicidad, o elevar su solubilidad (Mims, et al., 1999; Cordell, 2000;).

Cuando las búsquedas de compuestos antimicrobianos se realizan en especies que fueron recolectadas de acuerdo con información etnobotánica se incrementa la posibilidad de encontrar compuestos valiosos para la agricultura o la medicina (Cordero, 1996), tal es el caso de la planta *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. (Serrano, 2004; Canales, et al., en prensa) especie perteneciente a la familia botánica Asteraceae.

Familia Asteraceae

La familia Asteraceae es considerada la más grande de las angiospermas, está constituida por 20,000 especies agrupadas en casi 1000 géneros (Cronquist,1981). Su distribución es prácticamente cosmopolita y una de las más comunes en cualquier tipo de hábitat. México es uno de sus principales centro de diversificación y en su territorio se encuentra la concentración más cuantiosa de géneros y especies de todo el mundo, (3000 especies agrupadas en 380 géneros) (Ortiz- Bermúdez, et al., 1993; Heinrich, et al., 1998). Sin embargo los compuestos potencialmente antimicrobianos de las raíces de esta familia han sido poco estudiados (Romo de Vivar, 1985), entre ellos podemos citar los siguientes trabajos:

Zamilpa y colaboradores aislaron el diterpeno ácido beyerenico de las raíces de *Viguiera hypargyrea*, el cual mostró actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*, patógenos del hombre (Zamilpa, et al.,2002).

En el 2001 Garduño- Ramírez y colaboradores obtuvieron 4 nuevos eremofilanos de las raíces de *Psacalium radulifolium*, además demostraron que uno de los compuestos con mayor actividad antimicrobiana es el cacalol.

Las proteínas tipo I inactivadoras del ribosoma fueron aisladas de las raíces de *Mirabilis expansa*. Las proteínas ME1 y ME2 mostraron actividad contra los hongos *Pythium irregulare*, *Fusarium oxysparum*, *Alternaria solani*, *Trichoderma reesei*, *T. harzianum* y las bacterias *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens* y *A. radiobacter* (Vivanco, 2001).

Se ha demostrado la actividad antifúngica del extracto hexánico de *Echinea* sp. contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehata*, *C. kefyr*, *C. albicans*, *C. steatolytica* y *C. tropicalis*, dicha actividad se atribuyó a los cetoalquenos y cetoalquinos abundantemente presentes en las raíces de la planta (Binns, et al., 2000).

Los eudesmanólidos obtenidos de la raíz de *Inula helenium* y *Rudbeckia subtomentosa* presentan actividad antimicobacteriana (Cantrel, 1999).

Una de las especies de la familia Asteraceae en las que no se ha demostrado actividad antimicrobiana de las raíces es *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less.

GÉNERO *Gymnosperma* Less.

El género *Gymnosperma* engloba plantas subarborescentes, glutinoso-resinosas; que poseen hojas alternas, sésiles; con cabezuelas corimboso-paniculadas; su involucreo es cilindro-turbinado, poseen brácteas escasas, coriáceas y márgenes escariosos, graduadas, las exteriores más cortas; su receptáculo es plano y desnudo (Rzendowski & Rzendowski, 1985).

Tiene pocas flores liguladas, fértiles, sus corolas inconspicuas, amarillas; las flores del disco son generalmente hermafroditas, con corolas amarillas, la garganta angostamente campanulada; anteras con bases obtusas; ramas del estilo de las flores hermafroditas elípticas, aplanadas, provistas de un apéndice lanceolado, pubescente; aquenio oblongo, algo comprimido, vilano ausente o en forma de coronita breve. Se ha descrito una sola especie de México y algunas zonas vecinas (Rzendowski & Rzendowski, 1985).

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

Nombres comunes:

G. glutinosum se conoce popularmente como tatalencho, escobilla, jarilla, pegajosa, tezozotla (náhuatl), xonequiletl, zacayauchi, xinecuite, popote.

Clasificación:

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Spermatophyta

SUBDIVISIÓN: Angiospermae

CLASE: Dicotiledoneae

ORDEN: Asterales

FAMILIA: Asteraceae

TRIBU: Astereae

GÉNERO: *Gymnosperma*

ESPECIE: *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less (Figura 3)

Descripción:

Esta planta es un subarbusto que mide hasta 1 m. de alto, erecto, glabro a casi glabro, glutinoso, sus tallos son más o menos ramificados, estriados; posee hojas lineares a lanceoladas que miden de 1-8.5 cm de largo y 1-9 mm de ancho, agudas a acuminadas en el ápice, margen entero, trinervadas, densamente punteadas en ambas caras, las cabezuelas son numerosas agrupadas en densos conjuntos corimbiformes terminales, sésiles o sobre pedúnculos que miden hasta 3 mm de largo; involucro de 9 a 15 brácteas elípticas a ovadas, verdes en el ápice, las más largas de 4-5 mm de longitud; las flores son de color amarillo pálido, posee de 5-9 flores liguladas con corolas de 2-3 mm de largo, con el tubo largo y la parte laminar de 1 mm de longitud o menos; tiene de 2-4 flores del disco cuyas corolas miden de 2.5 a 4 mm de largo, a menudo no todas son fértiles; aquenios de 1-1.5 mm de largo, pubérulo (Rzendowski & Rzendowski, 1985; SEMARNAT, 2004).

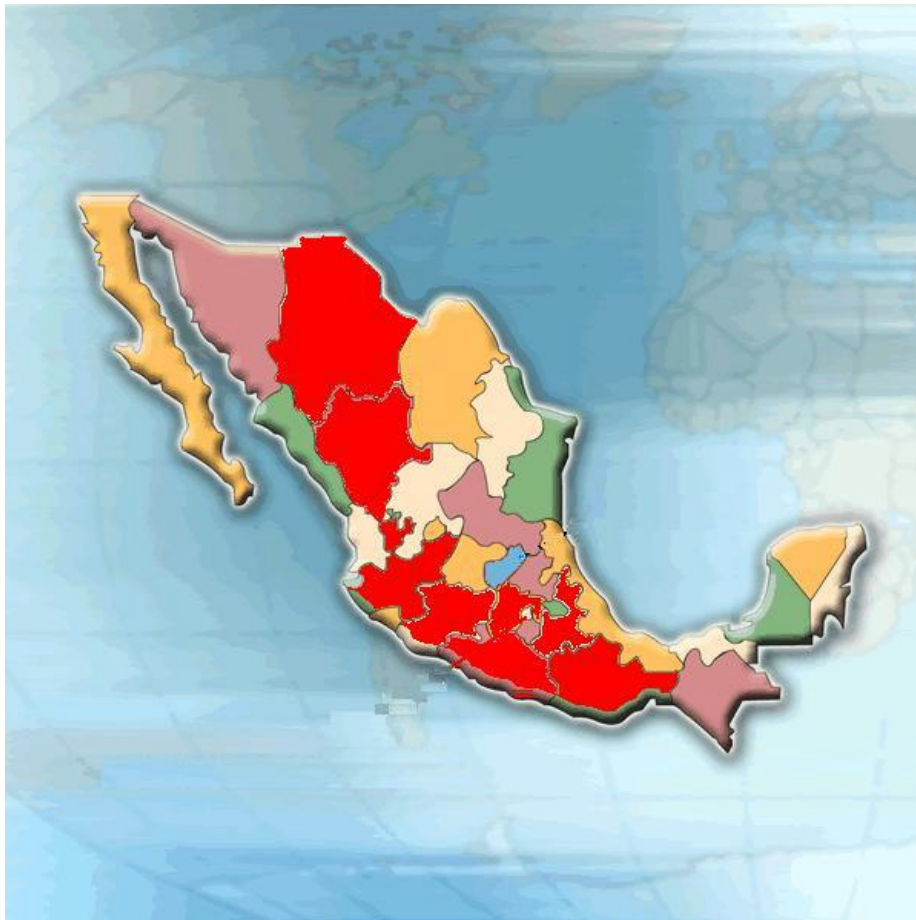
Figura 3. *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less



Distribución:

G. glutinosum se encuentra reportada para los estados de Chihuahua, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Estado de México, Nayarit y Puebla (Figura 4) (Rzedowski & Rzedowski, 1985; Ortiz-Bermúdez, et al., 1993; Lara & Marquez, 1996; Hernández, et al., 2003; Canales, et al., en prensa).

Figura 4. Distribución de *G. glutinosum* en el territorio nacional ■



Etnobotánica y antropología:

G. glutinosum es utilizada en el Estado de México, Durango y Guanajuato para tratar el reumatismo. Las hojas y tallo se maceran en alcohol durante 3 y hasta 8 días, con esta mezcla se frota las partes afectadas; se puede beber, tomar baños con el cocimiento de las ramas, o aplicar fomentos sobre las reumas y los golpes. Cuando hay dolencia de los pies, se colocan sobre los zapatos las hojas frescas; o las ramas se sumergen en alcohol, y se dejan reposar durante tres días al cabo de los cuales se frota con éste los pies diariamente. En Guerrero se utiliza para aplicar limpias en animales. Otros usos que se le asignan son contra la fiebre amarilla, para soldar huesos y contra la diarrea (Argueta, et al., 1994).

En el estado de Puebla *G. glutinosum* es usada para aliviar el dolor de cabeza, se muelen las yemas de xinecuite (*G. glutinosum*), chichiuiia (*Gonolobus uniflorus*) y romero (*Rosmarinus officinalis*) y se colocan a manera de emplasto sobre la frente. Los jiores, enfermedad de la piel que se caracteriza por manchas blanquecinas, es tratada con las yemas molidas de esta planta. Los piquetes de hormiga se alivian frotando las yemas sobre la zona afectada. Cuando hay rotura de huesos en animales las yemas se calientan y se amarran con un trapo al hueso dañado (Argueta, et al., 1994). En San Rafael Coxcatlán, Puebla es utilizada en forma de té para aliviar la diarrea (Canales, et al., en prensa) y en cocción para el mismo fin en el municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla (Hernández, et al., 2003).

ANTECEDENTES

La planta *Gymnosperma glutinosum* ha sido reportada principalmente en estudios enfocados al conocimiento de la vegetación de determinadas localidades tal es el caso de Valiente-Banuet quien la localiza en Selva Baja Caducifolia en el Valle de Tehuacán–Cuicatlán, Puebla y como elemento de la vegetación denominada Chaparral (Valiente-Banuet, et al., 1998), Ortiz-Bermudez y colaboradores en 1998 la reportan en su estudio sobre la Familia Asteraceae en el estado de Nayarit.

Los compuestos químicos que se han aislado de la parte aérea de la planta incluyen principalmente flavonoides y diterpenos. Sanggong y colaboradores (1988) extrajeron 21 flavonoides de *G. glutinosum*, de los cuales catorce eran ya conocidos y 7 reportados por primera vez. Horie y colaboradores (1998) utilizaron los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C para elucidar la estructura química de 5 flavonas. El ácido ent-dihidrotucumanoico y el ácido 2-angeloil ent-dihidrotucumanoico fueron elucidados por Martínez y colaboradores en 1994 mediante técnicas de espectroscopia y análisis de difracción de rayos X, este mismo método fue utilizado para corroborar la estructura de los diterpenos (+) ent-labd-7-en-13S,14R,15,triol y el ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico cuyas estructuras se establecieron en un principio por transformaciones químicas y espectroscopia (Maldonado, et al., 1994). La estructura molecular del ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico fue nuevamente determinada por Calderón y colaboradores (2001) por espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C , técnica por la cual no había podido ser determinada.

Los estudios farmacológicos y toxicológicos de la planta indican que el aceite esencial de la planta excita la acción motora de los centros musculares e impide las funciones de las extremidades de los nervios sensitivos de la piel y la excitabilidad de la fibra muscular, se ha reportado que dicho aceite esencial puede causar la parálisis de los centros bulbares respiratorios.

El extracto hidroalcohólico administrado por vía subcutánea produce parálisis, dilatación de las pupilas, somnolencia, abatimiento de la temperatura y la muerte (Argueta, et al.,1994).

Los estudios etnobotánicos realizados en el municipio de Zapotitlán Salinas Puebla reportan su uso por los habitantes de la región como antidiarreico, utilizando la parte aérea en cocción (Hernández, et al., 2003). En San Rafael Coxcatlán, Puebla es utilizada en forma de té para aliviar la diarrea (Canales, et al., en prensa).

Estudios enfocados a corroborar las propiedades de la planta han sido realizados por Canales y colaboradores (en prensa) quienes evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos hexánico, metanólico, de acetato de etilo y acuoso de la parte aérea de la planta sobre 14 cepas bacterianas, reportando el extracto hexánico como el más activo al inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* CDC V12, *V. cholerae* INDRE 206, *V. cholerae* aislado de un caso clínico. Serrano en el 2004 purificó el compuesto activo ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico de la parte aérea, además confirmó su actividad como antibacteriano contra *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* No.01, *V. cholerae* INDRE 206, *V. cholerae* caso clínico, *Salmonella typhi* y *Enterobacter aerogenes*.

La actividad antimicrobiana de las raíces de dicha planta no ha sido evaluada, además solo se ha reportado su acción contra bacterias no así como antifúngica, por lo cual los objetivos del presente trabajo fueron:

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antimicrobiana de la raíz de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less.

OBJETIVOS PARTICULARES

Colectar la raíz de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less en Zapotitlán Salinas, Puebla

Obtener los extractos herbales de distinta polaridad de la raíz de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less mediante la técnica de maceración

Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos sobre bacterias y hongos patógenos usando la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer e inhibición del crecimiento radial respectivamente

Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de los extractos activos

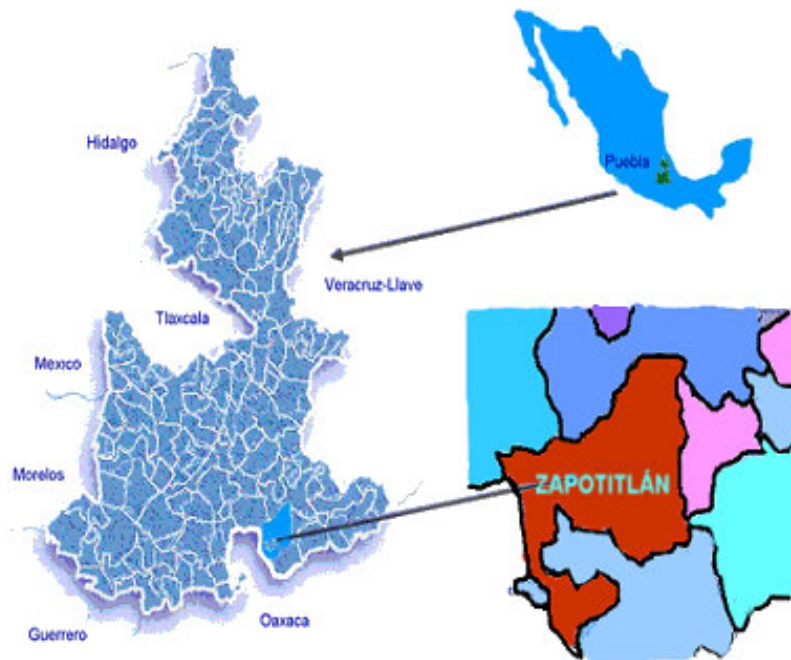
Aislar la fracción activa mediante técnicas cromatográficas biodirigidas

ZONA DE COLECTA

Zapotitlán Salinas, Puebla

Ubicación geográfica: El municipio de Zapotitlán Salinas (Figura 5) forma parte del Valle de Tehuacan-Cuicatlán, localizado en la región sureste del estado de Puebla. El municipio colinda al norte con Tehuacán, al sur con Caltepec, al oeste con Chilac y San José Miahuatlán, al este con el estado de Oaxaca y al noreste con San Martín Atexcala (Dávila, et al.,2002).

Figura 5. Ubicación geográfica de Zapotitlán Salinas, Puebla.



Las coordenadas geográficas de Zapotitlán Salinas son los paralelos 18° 07' 18" y 18° 26' 00" de latitud norte, los meridianos 97° 19' 24" y 97° 39' 06" de longitud occidental y posee una superficie de 484.77 Km² (Dávila, et al.,2002).

Orografía: El municipio pertenece a dos regiones morfológicas; el noreste forma parte del Valle de Tehuacán, que muestra un relieve montañoso en general, el cual forma un arco que corre de norte, este y sur declinado hacia el centro-este donde el municipio alcanza su menor altura. El declive no es abrupto, destacan algunos cerros como el Pajarito y el Calvario (Dávila, et al.,2002).

Litología: Desde San Antonio Texcala hasta el Paso de Agua de Burro se extiende una serie constituida por lutitas calcáreas y margas con la intercalación de gruesos lentes de caliza fosilífera. El complejo basal está formado principalmente por rocas ígneas constituidas esencialmente por esquistos de clorita y sericita. También hay rocas ígneas intrusivas que afloran en lomeríos redondos (Calderón- García, 1956).

Clima: El clima del Valle, determinado en la estación de Zapotitlán Salinas, de acuerdo a la clasificación de Köppen modificada por García (1981) es Bsohw" (i)g que corresponde a un clima seco, semicálido con lluvias en verano y escasas el resto del año. La temperatura media anual entre 18-22°C y oscilaciones estacionales de 4° a 18°C. La precipitación media anual no excede los 412.40 mm³ (Neri, 2000).

Edafología: Los suelos son en mayor proporción de origen calcáreo y de profundidad variable. La heterogeneidad edáfica se debe a la dinámica genética pasada y actual en la cuenca, y que se expresa en su morfología (Rivas, 2003). Se pueden identificar cuatro tipos de suelos (Cuadro 2).

Hidrología: El municipio pertenece a la cuenca del Papaloapan en su mayor parte, excepto el extremo suroeste que pertenece a la cuenca del Balsas. Posee un arroyo principal donde desembocan varios arroyos intermedios ubicado al centro-este y llamado Agua de Gavilán. El Río Zapotitlán se une al río Tehuacán en el Valle del mismo nombre formando el Río Salado, se considera a este río uno de los principales afluentes del Papaloapan (Secretaría de Gobernación, Puebla 1988).

Cuadro 2. Tipos de Suelo encontrados en Zapotitlán Salinas, Puebla.
(Secretaría de Gobierno, Puebla 1988)

Tipo de suelo	Características	Ubicación en la localidad
Vertisoles (V)	Textura arcillosa y pesada, que se agrietan notablemente cuando se secan.	Extremo este
Rendzinas (E)	Presenta una alta fertilidad para las actividades agropecuarias	Abarca una extensa área del centro y oeste
Regosoles (R),	Formados por material suelto que no sea aluvial reciente, como dunas, cenizas volcánicas, playa etc., son pobres en nutrientes y prácticamente infértiles.	Localizado al poniente del municipio
Litosoles (I),	Espesor menor a 10 cm sobre roca o tepetate, no son aptos para cultivos.	Cubre todo el extremo suroeste en zonas montañosas

Fauna: En la zona se encuentran aproximadamente 91 especies de aves, 11 especies de anfibios, 48 especies de reptiles y 24 especies de murciélagos, la información disponible para el resto de los grupos de mamíferos es pobre (Dávila, et al., 2002).

Vegetación: En la zona de estudio se encuentran tres principales tipos de vegetación de acuerdo con Rzedowski (1978): Matorral xerófilo, Bosque espinoso y Bosque tropical caducifolio (Cuadro 3). Se encuentra un total de 2621 especies de plantas vasculares con un gran porcentaje de endemismo (Dávila, et al., 2002).

Cuadro 3. Tipos de Vegetación de Zapotitlán Salinas, Puebla

Matorral xerófilo	Bosque espinoso	Bosque tropical caducifolio
Es la comunidad más extendida en la región y constituye varias asociaciones de porte arbustivo característico de zonas áridas y semiáridas. En esta comunidad se encuentran principalmente tetecheras y cardonales (Osorio-Beristain, et al., 1996).	El Bosque espinoso en Zapotitlán presenta asociaciones típicas de arbustos espinosos de la familia Leguminosae. Esta comunidad predomina principalmente en terrenos planos poco pedregosos (Zavala, 1982).	El bosque tropical caducifolio o selva baja caducifolia en Zapotitlán se caracteriza por el predominio de la familia Leguminosae (Osorio-Beristain, et al., 1996).

Datos Socioeconómicos: Según datos del INEGI la población para el año 2000 (INEGI, 2000) se estimó en 8900 habitantes, 4145 hombre y 4755 mujeres. La mayoría de la población son de origen mestizo descendientes de Popolocas.

Las ocupaciones de los habitantes incluyen la agricultura, recolección de leña, artesanos en talleres de ónix, extracción de sal, trabajos de albañilería y en los últimos años, la industria textil se ha desarrollado en la comunidad, existen aproximadamente 5 fábricas en el pueblo.

METODOLOGÍA

Colecta de la Planta

El presente estudio se llevó a cabo con la raíz de la planta *Gymnosperma glutinosum* colectada en el mes de Agosto del 2004 en la localidad de Zapotitlán Salinas, Puebla. La determinación de la planta fue realizada por el Biólogo Martín Paredes. Se depósito un ejemplar en el herbario IZTA.

Bioensayos preliminares

Extracción por maceración.

Para llevar a cabo la extracción por maceración se pesaron 75 g de la raíz seca y molida, se colocaron en un matraz de vidrio con capacidad de 1 litro y se agregaron solventes en orden creciente de polaridad (hexanos, acetato de etilo y metanol), dejando cada solvente por 4 días. Una vez obtenidos los extractos se procedió a filtrarlos, posteriormente se destiló el exceso de solvente a presión reducida en un rotavapor. Los extractos se colocaron en recipientes de vidrio con la finalidad de completar la evaporación del solvente. El contenido de sólidos de cada uno de los extractos se calculó mediante diferencia de peso.

Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó para las bacterias mediante el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Konneman, et al.,1985) e inhibición del crecimiento radial para el caso de los hongos (Wang & Bun, 2002). Los discos se impregnaron con 2mg de cada extracto; se utilizó como control positivo cloramfenicol (25 µg/disco) para las cepas bacterianas y ketoconazol a una concentración de 7 µg/disco para los hongos, como control negativo se usaron discos impregnados con 10µl de cada uno de los solventes utilizados. Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice III).

Microorganismos utilizados

Se utilizaron 12 cepas bacterianas y 6 especies de hongos de importancia medica y agronómica, enlistadas en la Cuadro 4:

Cuadro 4. Microorganismos utilizados

BACTERIAS	Gram
<i>Sarcina lutea</i> ^a	+
<i>Bacillus subtilis</i> ^a	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12938 ^a	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^a	+
<i>Vibrio cholerae</i> No.01 ^a	-
<i>Vibrio cholerae</i> INDRE206 ^{a*}	-
<i>Vibrio cholerae</i> caso clínico ^a	-
<i>Vibrio cholerae</i> CDC V12 ^a	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ^a	-
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430 ^a	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> ^a	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> ^b	-

* Aislada de agua contaminada

a Donadas por el laboratorio de Microbiología de la FES Cuautitlán

b Donada por el laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI de la FES Iztacala

HONGOS
<i>Candida albicans</i> ^c
<i>Aspergillus niger</i> ^c
<i>Trichopyton mentagrophytes</i> ^c
<i>Fusarium sporotrichum</i> ^c
<i>Fusarium moniliforme</i> ^c
<i>Rhizoctonia solani</i> ^d

c Donada por el Laboratorio de Fisiología Vegetal UBIPRO, FES Iztacala

d Donada por el Dr. Raúl Rodríguez, INIFAP, Celaya

Evaluación cuantitativa

De los extractos que tuvieron actividad se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM), mediante la microtécnica de dilución en caldo (Apéndice IV), las concentraciones que se evaluaron fueron 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2 mg/ml. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

Aislamiento y caracterización de la fracción activa

Del extracto hexánico que fue uno de los que presentó actividad se realizó una cromatografía en columna (cc), usando como fase estacionaria gel sílice marca Kieselgel G Macherey-Nagel con una malla de 60, como fase móvil se utilizaron distintos solventes con la finalidad de incrementar la polaridad gradualmente (hexano, mezclas de hexano: clorofloro y metanol). Las alícuotas se tomaron cada 10 ml.

Una vez obtenidas las alícuotas se sometieron a cromatografía en capa fina (ccf) para lo cual se emplearon cromatofolios de silica gel con malla de 60 marca Merck (Kieselgel), se agruparon de acuerdo al parecido de Rf.

Para caracterizar la fracción activa se realizó una ccf y se observó bajo luz U.V. a λ de 254 y 366nm, dicha placa, también se reveló con el reactivo sulfato sérico y se procedió a determinar el valor de rf de cada una de las manchas presentes. Se realizó también una ccf de la fracción activa usando como referencia el ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico aislado por Serrano (2004).

Análisis Estadístico

Para analizar los resultados de difusión en agar de Kirby-Baüer se utilizó un Análisis de Varianza Factorial (ANOVA) realizado en el software Statistica V.5.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Colecta de la planta

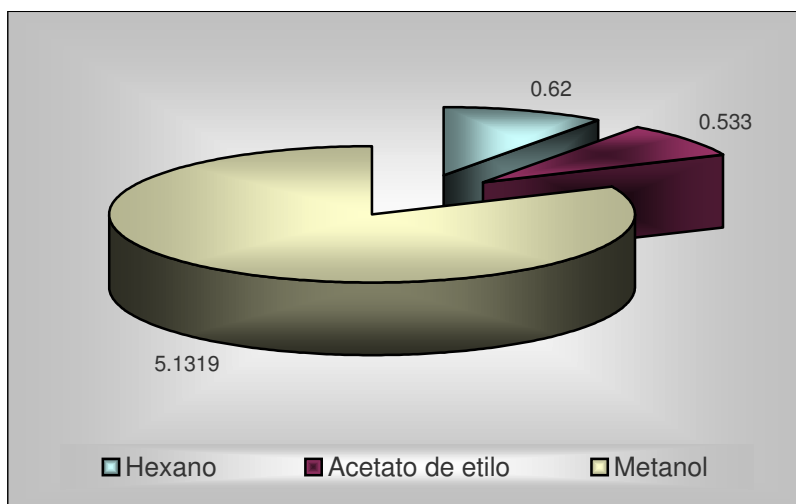
La raíz de la planta *Gymnosperma glutinosum* fue colectada en el mes de Agosto del 2004 en la localidad de Zapotitlán Salinas, Puebla, en las coordenadas geográficas 18°24.688' de latitud norte y 97°25.807' de longitud oeste y a una altitud de 5843 pies. La determinación de la planta fue realizada por el Biólogo Martín Paredes. Se depósito un ejemplar en el herbario IZTA, con número de registro 29982.

Bioensayos preliminares

Extracción por maceración

De la extracción por maceración se obtuvieron extractos en orden creciente de polaridad (hexanos, acetato de etilo y metanol) obteniendo los resultados que se muestran en el gráfico 1.

Gráfico 1. Rendimiento (contenido de sólidos en g) de cada uno de los extractos obtenidos de la raíz de *G. glutinosum*



Rendimiento obtenido a partir de 76.5 g de raíz de *G. glutinosum*

En el gráfico anterior se puede observar que el extracto de más alto rendimiento correspondió al extracto metanólico con 5.13 g. El rendimiento más bajo fue el del extracto de acetato de etilo con 0.533 g. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Serrano (2004) de la parte aérea de la planta, en el cual se obtuvo mejor rendimiento del extracto metanólico. Las cantidades obtenidas de la parte aérea superan por mucho las del presente trabajo, ya que del total de la raíz de la planta se obtuvieron 6.71% de extracto metanólico comparado con 12.93% obtenido de la parte aérea, lo mismo ocurre con los demás extractos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Comparación del rendimiento de los extractos de la raíz y parte aérea de *G. glutinosum*

Extracto	(%)	Serrano (2004) (%)
Hexano	6.71	8.28
Acetato de etilo	0.70	7.55
Metanol	0.81	12.93

Resultados obtenidos de 76.5 g de raíz de *G. glutinosum*

Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana

En la Cuadro 6 se muestran los resultados del efecto antibacteriano de los extractos herbales obtenidos de la raíz de *G. glutinosum*. Se puede observar que los extractos hexánico y de acetato de etilo fueron activos, no así el extracto metanólico. Además ninguno de los extractos mostró actividad contra las cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* y *Yersinia enterocolitica*.

Con la finalidad de determinar si existían diferencias significativas entre la actividad antibacteriana de los extractos, se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) bifactorial. Los factores evaluados fueron los extractos (con dos niveles: hexánico y de acetato de etilo) y las bacterias (con ocho niveles: *S. lutea*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae* No.01, *Vibrio cholerae* INDRE 206, *Vibrio cholerae* caso clínico, *Vibrio cholerae* CDC V12).

Cuadro 6. Actividad antibacteriana de los extractos de la raíz de *G. glutinosum*

Bacteria	Hexano	Acetato de etilo	Metanol	Control positivo (cloranfenicol 5µg)
<i>Sarcina lutea</i>	6.66 ± 0.57	10.66 ± 0.57	Na	31.33 ± 1.55
<i>Bacillus subtilis</i>	9.00 ± 1.00	9.60 ± 1.15	Na	25.33 ± 1.15
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12938	Na	10.00 ± 1.00	Na	19.66 ± 2.08
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	9.33 ± 1.15	10.66 ± 0.57	Na	20.00 ± 1.73
<i>Vibrio cholerae</i> No.01	Na	8.66 ± 0.57	Na	33.66 ± 0.57
<i>Vibrio cholerae</i> INDRE206	Na	8.66 ± 0.57	Na	27.33 ± 2.31
<i>Vibrio cholerae</i> caso clínico	9.33 ± 1.15	11.33 ± 0.57	Na	27.00 ± 1.00
<i>Vibrio cholerae</i> CDC V12	Na	8.66 ± 0.57	Na	30.66 ± 1.53
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Na	Na	Na	16.67 ± 3.05
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430	Na	Na	Na	22.33 ± 0.57
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Na	Na	Na	15.00 ± 1.00
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Na	Na	Na	16.33 ± 1.15

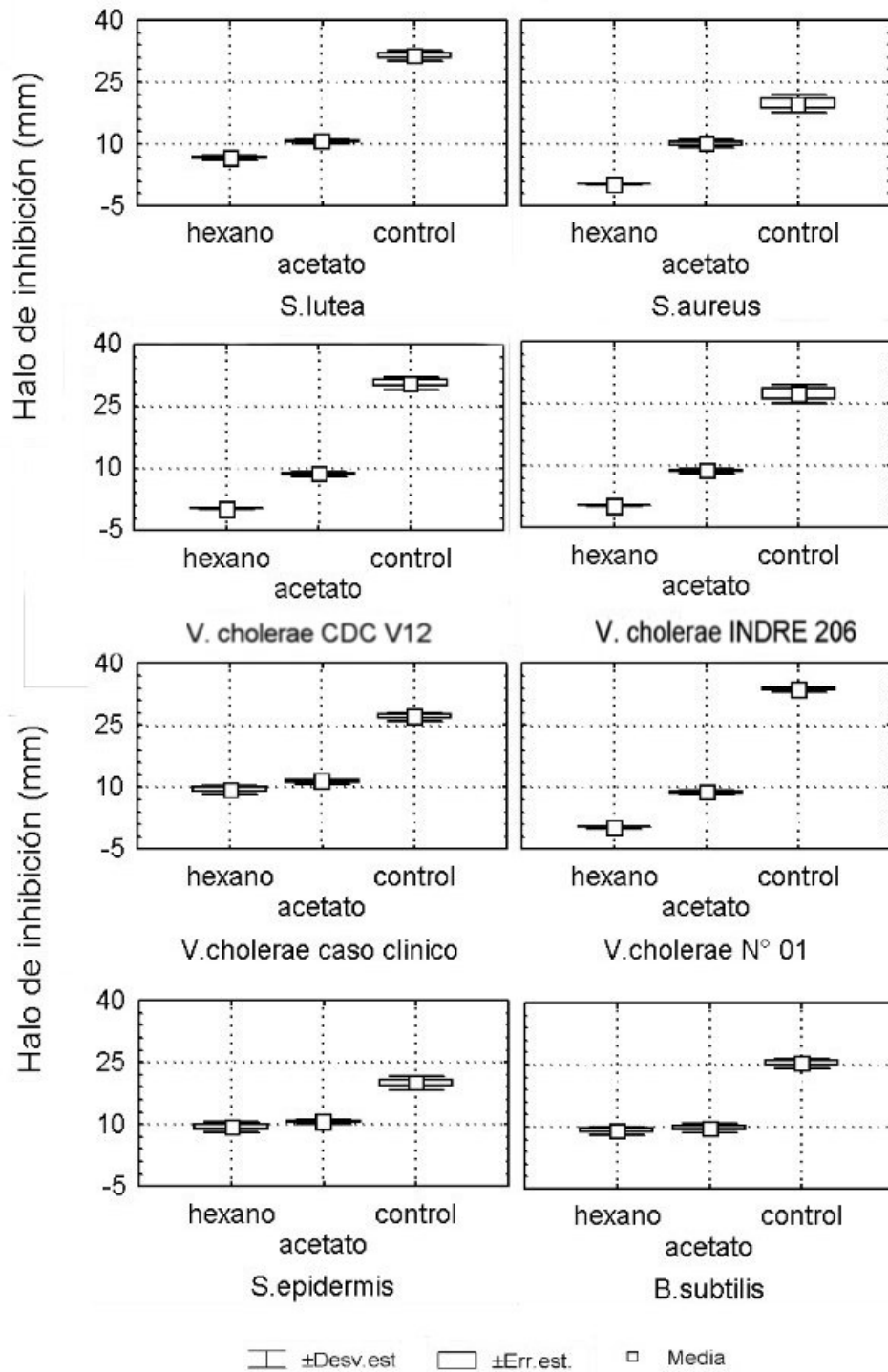
Halos de inhibición en mm; valor promedio de 3 repeticiones; los extractos fueron probados con una concentración de 2mg/idisco.

Na: No activo

El análisis de varianza mostró que existen diferencias significativas ($F=2922$; $P<0.05$) entre la actividad de cada uno de los extractos y el control positivo que en este caso fue cloramfenicol, lo cual indica que la inhibición del crecimiento bacteriano se debe al efecto del extracto.

En el gráfico 2 se puede observar que no existen diferencias entre la actividad de los extractos hexánico y de acetato de etilo sobre las bacterias *B. subtilis* y *S. epidermidis*, es decir que ambos extractos tuvieron el mismo efecto antibacteriano. Por el contrario la actividad de los extractos contra *S. lutea*, *S. aureus*, y las cuatro cepas de *V. cholerae*, mostró diferencias significativas, el extracto hexánico mostró una menor actividad, lo cual indica que estadísticamente el extracto de acetato de etilo posee un mayor efecto antibacteriano.

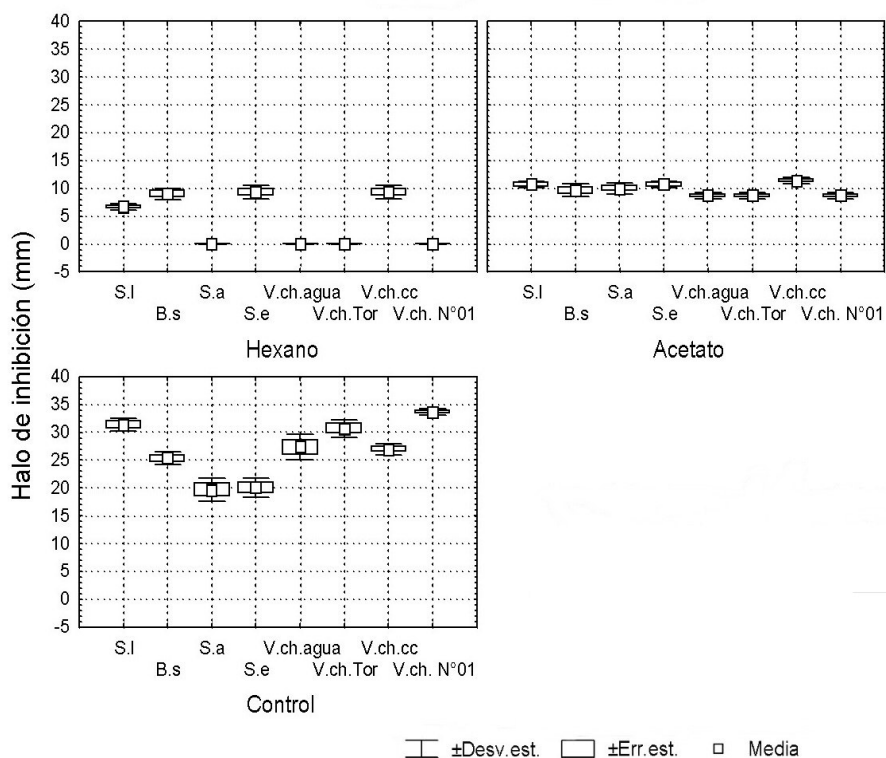
Gráfico 2. Comparación de la actividad antibacteriana de los extractos de la raíz de *G. glutinosum*



Con respecto a la sensibilidad de las bacterias el análisis de varianza evidenció que existen diferencias significativas ($F=34$; $P<0.05$), por lo que la actividad de los extractos varía dependiendo de la cepa utilizada. En el gráfico 3 se puede observar que las cepas más sensibles para el extracto hexánico fueron *S. epidermidis* y *V. cholerae* caso clínico, la que presentó menor sensibilidad fue *S. lutea*, mientras las cepas restantes no mostraron sensibilidad al extracto.

Las bacterias *S. lutea*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y las cuatro cepas de *V. cholerae* fueron sensibles al extracto de acetato de etilo, las que exhibieron mayor sensibilidad fueron *S. lutea*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *V. cholerae* caso clínico, las cepas restantes de *V. cholerae* mostraron halos de inhibición inferiores.

Gráfico 3. Sensibilidad bacteriana a los extractos de la raíz de *G. glutinosum*



S.l.: *Sarcina lutea*; *B.s.*: *Bacillus subtilis*; *S.a.*: *Staphylococcus aureus*; *S.e.*: *Staphylococcus epidermidis*;
V.ch N°01: *Vibrio cholerae* No.01; *V. ch agua*: *Vibrio cholerae* INDRE 206; *V.ch cc*: *Vibrio cholerae* caso clínico; *V. ch Tor*: *Vibrio cholerae* CDC V12

Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana

De cada una de las cepas bacterianas sobre las cuales se obtuvo actividad se determinaron la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima obteniendo los resultados que se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. CMI y CBM de los extractos activos obtenidos de las raíces de *G. glutinosum*

Bacteria	Extracto	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)
<i>Sarcina lutea</i>	Hexano	0.25	0.5
<i>Bacillus subtilis</i>	Hexano	0.25	0.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Hexano	0.5	0.75
<i>V. cholerae</i> caso clínico	Hexano	<0.125	<0.125
<i>Sarcina lutea</i>	Acetato de etilo	0.125	0.5
<i>Bacillus subtilis</i>	Acetato de etilo	0.25	0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12938	Acetato de etilo	0.25	0.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Acetato de etilo	0.5	0.75
<i>Vibrio cholerae</i> No.01	Acetato de etilo	0.25	0.5
<i>Vibrio cholerae</i> INDRE 206	Acetato de etilo	0.5	0.75
<i>Vibrio cholerae</i> caso clínico	Acetato de etilo	0.25	0.5
<i>Vibrio cholerae</i> CDC V12	Acetato de etilo	0.25	0.5

Datos obtenidos de tres repeticiones.

En el cuadro anterior se observa que el extracto hexánico es el que presenta mayor actividad, ya que se registró para *V. cholerae* caso clínico una CMI y CBM por debajo de los 0.125mg/ml. La menor actividad se presenta sobre *V. cholerae* INDRE 206 y *S. epidermidis*, ya que con el extracto de acetato de etilo se mostró una CMI de 0.5 mg/ml y una CMB de 0.75mg/ml.

En la Figura 6 se puede observar la disminución de la concentración bacteriana debido al efecto del extracto de acetato de etilo, ya que en todos los casos se produjo crecimiento bacteriano en los controles. Gracias a la solución de sal de tetrazolio que en presencia de organismos vivos se reduce a formazán (virando a un color morado), se pueden determinar la CMI y CBM. La Figura 7 muestra un acercamiento donde se observa a detalle el efecto del extracto de acetato de etilo obtenido de la raíz de *G. glutinosum*. El extracto presentó un efecto bacteriostático a una concentración de 0.25 mg/ml y bactericida a 0.5 mg/ml sobre la bacteria *S. aureus*.

Figura 6. Microplaca para determinar CMI y CBM

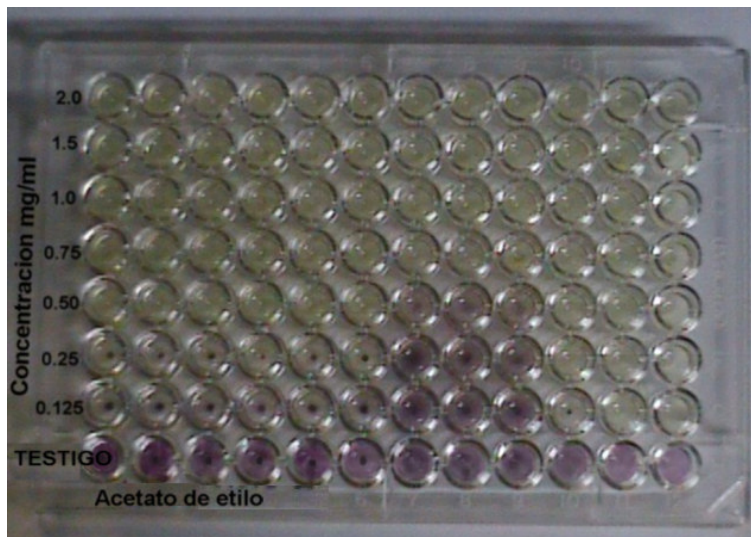
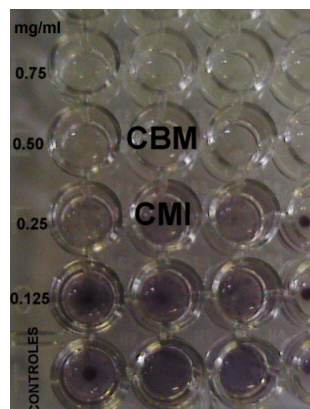


Figura 7. CMI y CBM del extracto de acetato de etilo sobre *S. aureus*



Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica

Se valoró la actividad antifúngica de los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico obtenidos de la raíz de *G. glutinosum* a una concentración de 2mg/disco. Los resultados se muestran en el cuadro 8. Se puede observar que el extracto hexánico mostró actividad sobre las cepas de *F. sporotrichum*, *R. solani* y *C. albicans*. Los extractos de acetato de etilo y metanol sólo fueron activos sobre *R. solani*, además el extracto de acetato de etilo mostró actividad sobre *C. albicans*.

Cuadro 8. Actividad antifúngica de los extractos de la raíz de *G. glutinosum*

Hongo	Hexánico	Acetato de etilo	Metanol	Control + (Ketoconazol 7µg)
<i>Candida albicans</i>	∩	∩	—	∩
<i>Aspergillus niger</i>	—	—	—	∩
<i>Trichopyton mentagrophytes</i>	—	—	—	∩
<i>Fusarium sporotrichum</i>	∩	—	—	∩
<i>Fusarium monoliforme</i>	—	—	—	∩
<i>Rhizoctonia solani</i>	∩	∩	∩	∩

Resultados obtenidos a partir de tres repeticiones.

— No activo ∩ Activo

En la Figura 8, 9 y 10 se puede observar la inhibición del crecimiento radial de *R. solani* por el extracto hexánico, de acetato de etilo y metanólico respectivamente.

En el caso del extracto de acetato de etilo y metanol la inhibición no es tan marcada como en el extracto hexánico, sin embargo se puede apreciar una disminución del crecimiento radial de *R. solani* cercano a los sensidiscos. En la Figura 11, se muestra la actividad del extracto hexánico sobre *F. sporotrichum*.

Figura 8. *R. solani* y sensidiscos de extracto hexánico



Figura 9. *R. solani* y sensidiscos de extracto de acetato de etilo

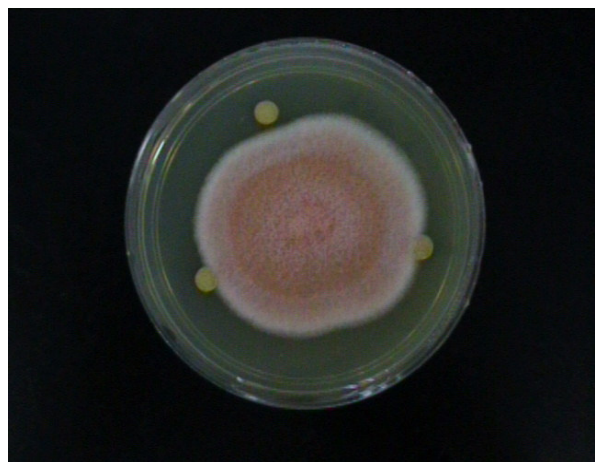


Figura 10. *R. solani* y sensidiscos de extracto metanólico

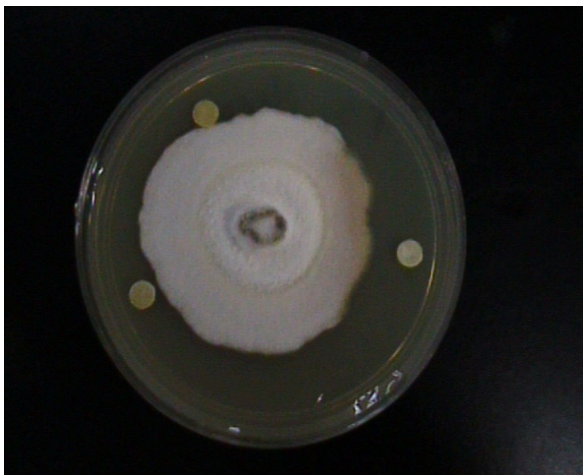
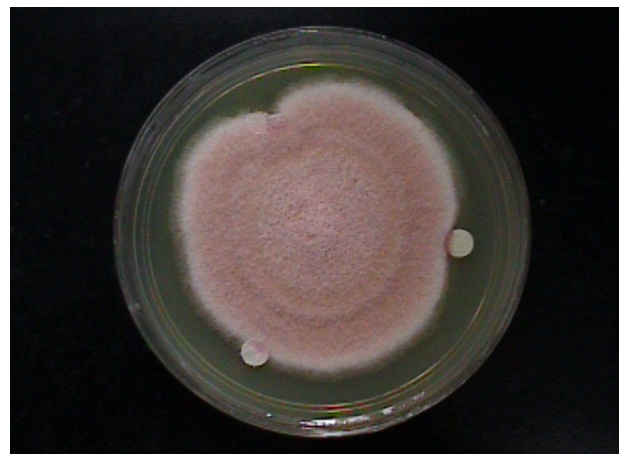


Figura 11. *F. sporotrichum* y sensidiscos de extracto hexánico



Aislamiento y caracterización de la fracción antibacteriana activa

A partir del extracto hexánico se realizó una cromatografía en columna (cc). Se eligió dicho extracto debido a la presencia de cristales, los bajos valores de CMI y CBM y a que del extracto hexánico obtenido de la parte aérea se han aislado compuestos activos.

A los cristales encontrados en el extracto hexánico se les midió el punto de fusión registrándose este entre los 65 y 75°C, este hecho evidenció la presencia de impurezas, lo anterior se corroboró al realizar una cromatografía en capa fina (ccf) donde se observaron 5 manchas, dado el bajo rendimiento de los cristales fue imposible purificarlos.

La cromatografía en columna se realizó con 303.7mg de extracto hexánico, se obtuvieron un total de 79 alícuotas de 10 ml, las cuales se sometieron a ccf con la finalidad de agrupar aquellas que fueran similares, por lo que se obtuvieron un total de 35 fracciones. En el cuadro 9 se muestra la cantidad de fracciones obtenidas con cada una de las mezclas de solventes de distinta polaridad usados como fase móvil.

Se valoró la actividad antibacteriana de las fracciones (no pudieron ser evaluadas todas debido al bajo rendimiento), a una concentración de 1mg/sensidisco contra la bacteria *V. cholerae* caso clínico debido a que resultó ser la más sensible. En las fracciones 19, 23, 25, 26 y 35, se presentó un precipitado no soluble, por lo cual se procedió a filtrarlos, rotulándolos como precipitado y solución. Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana de las fracciones se muestran en el Cuadro 10. Las fracciones activas fueron 25 solución, 25 precipitado, 26 solución y 35 solución.

Cuadro 9. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto hexánico de la raíz de *G. glutinosum*

Solvente	Alícuota	Fracción
Hexano	1	1
	2	2
	3	3
	4	4
	5	5
Hexano-Cloroformo 95:15	6-14	6
	15	7
	16	8
Hexano-Cloroformo 9:1	17-20	8
	21-22	9
	23	10
Hexano-Cloroformo 85:15	24	10
	25-26	11
Hexano-Cloroformo 8:2	27-31	11
Hexano-Cloroformo 7:3	32-35	11
Hexano-Cloroformo 6:4	36	12
	37	13
	38	14
	39	15
Hexano-Cloroformo 1:1	40	16
	41-46	17
	47-49	18
	50-54	19
Hexano-Cloroformo 4:6	55	20
	56	21
	57-60	22
	61-62	23
Hexano-Cloroformo 3:7	66-68	24
	69	25
	70	26
Cloroformo	71	27
	72	28
Metanol	73	29
	74	30
	75	31
	76	32
	77	33
	78	34
	79	35

Cuadro 10. Actividad de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna del extracto hexánico

Fracción	Actividad
10	Na
11	Na
16	Na
17	Na
18	Na
19 P	Na
19 S	Na
23 P	Na
23 S	Na
25 P	Na
25 S	13 mm
26 P	5 mm
26 S	6 mm
35 P	9 mm
35 S	Na

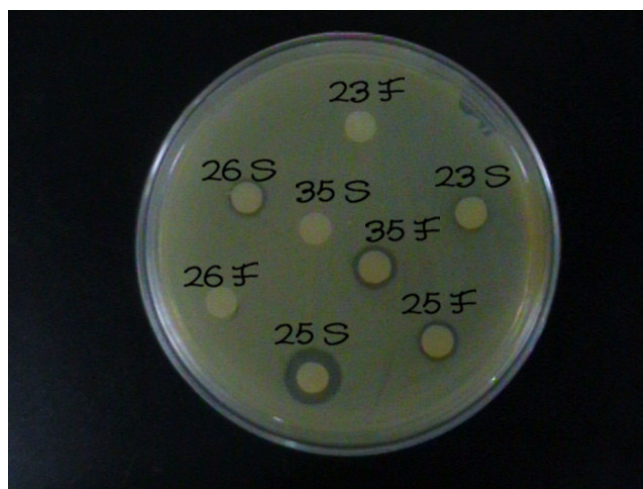
Na : No activo

P: Precipitado

S: Solución

La mayor actividad antibacteriana como se puede apreciar en la Figura 12. se obtuvo con la fracción 25 S, ya que presentó un halo de inhibición de 13mm, por lo que se procedió a caracterizarla.

Figura 12. Difusión en agar de las fracciones del extracto hexánico sobre *V. cholerae* caso clínico



La fracción 25S tuvo un rendimiento total de 58mg (a partir de 76.5g de raíz), al realizar una ccf usando como fase móvil Hexanos-Cloroformo 6:4, se produjeron 4 manchas que absorben a una longitud de onda de 254 nm, pero no a 366 nm, se revelaron con sulfato sérico y se obtuvieron r_f de 0.12, 0.217, 0.30, 0.385. Dicha cromatografía se corrió en paralelo con el compuesto ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico aislado por Serrano (2004), se pudo observar que este compuesto no está presente en la fracción activa 25S de la raíz de *G. glutinosum*

DISCUSIÓN

La planta *G. glutinosum* cuenta con información florística, etnobotánica y fitoquímica, dicha información sentó las bases del presente trabajo. Las raíces de *G. glutinosum* fueron colectadas en el municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla en el mes de agosto, que de acuerdo a la clasificación climática, corresponde a la época de lluvias, lo anterior debe ser tomado en cuenta como un hecho trascendental ya que los cambios medioambientales y el tipo de hábitat, entre otros factores (bióticos, ontogénicos y genéticos), influyen en la cantidad y tipo de metabolitos secundarios biosintetizados. (Vanhaelen, et al., 2000; Ma, et al., 2002; Chen, et al., 2003).

El rendimiento (contenido de sólidos) de los extractos obtenidos de la raíz de *G. glutinosum*, indica que el extracto metanólico presentó mayor rendimiento (Gráfico 1), por lo tanto, la mayor parte de los componentes de la raíz son de naturaleza polar. Lo anterior coincide con lo reportado para la parte aérea de *G. glutinosum* (Serrano 2004). De acuerdo a con Harsh (2004) y Yaniv & Bachrach (2002), los metabolitos secundarios deberían encontrarse en mayores cantidades en raíces, ya que constituyen el principal reservorio, sin embargo, esto no sucede en *G. glutinosum*. El bajo rendimiento de los extractos puede explicarse si se toma en cuenta que existen factores que alteran la composición de metabolitos secundarios en las plantas.

Tradicionalmente la parte aérea de *G. glutinosum* ha sido utilizada en diversos estados de la República Mexicana para tratar muchas enfermedades (Argueta, et al., 1994; Hernández, et al., 2003; Serrano, 2004; Canales, et al., en prensa) algunas de ellas causadas por bacterias y hongos, sin embargo no existen antecedentes etnobotánicos sobre el uso de las raíces de dicha planta. Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que las raíces de *G. glutinosum* poseen actividad antimicrobiana.

La gran diversidad de metabolitos secundarios debe su origen en parte al desarrollo de mejores mecanismos de defensa, la concentración de tales sustancias es relativamente alta en las raíces de la planta, debido a que estos metabolitos tóxicos y fisiológicamente activos protegen a la raíz de parásitos como insectos, otros animales, bacterias, hongos y virus causantes de enfermedades (Yaniv & Bachrach, 2002; Harsh, et al., 2004). La planta *G. glutinosum* se define como una maleza perenne, estas se caracterizan por ser en general efímeras y sucesionales, oportunistas, colonizan rápidamente un área y son de vida corta, por lo cual tienden a contar con todo tipo de defensas químicas tóxicas (Stepp y Moerman, 2001). Lo anterior explica la actividad antimicrobiana encontrada en las raíces de *G. glutinosum*.

Los extractos que presentaron actividad antibacteriana fueron el hexánico y de acetato de etilo. La actividad antibacteriana que mostró el extracto hexánico de la raíz de *G. glutinosum* (Cuadro 2), concuerda con lo reportado por Canales (en prensa), en donde se determinó que el extracto hexánico de la parte aérea de *G. glutinosum* presentó actividad contra 6 cepas bacterianas de 14 utilizadas, obteniendo halos de inhibición de hasta 19mm sobre *S. aureus*. Serrano (2004) hizo una partición de dicho extracto encontrando actividad en 11 de 14 cepas utilizadas, obteniendo halos de inhibición mayores. En el presente trabajo el extracto hexánico presentó actividad contra un menor número de cepas bacterianas, sin embargo el extracto de acetato de etilo fue activo contra 8 de las 12 cepas utilizadas, lo cual indica que la concentración y estructura química de los compuestos encontrados como activos en la parte aérea no corresponden del todo a los encontrados en las raíces.

La actividad antibacteriana de los extractos de la raíz de *G. glutinosum* depende de la cepa utilizada. Los extractos hexánico y de acetato de etilo exhiben actividad sobre bacterias gram positivas y gram negativas, lo cual sugiere que probablemente el mecanismo de acción de dichos extractos no está relacionado con alteraciones de la pared celular, dadas las diferencias estructurales entre ellas (Calderón, 1997).

Distintas especies de bacterias de importancia médica fueron utilizadas en la presente investigación. Las bacterias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis* ocasionan serias infecciones en pacientes inmunocomprometidos. *S. aureus* es característica de infecciones de tracto respiratorio. Además de ser agente causal del síndrome de la piel escaldada y síndrome de shock tóxico, esta especie junto con *S. epidermidis* son las principales causas de infecciones hospitalarias. *B. subtilis* al igual que *V. cholerae* ocasionan infecciones gastrointestinales, en el caso de *V. cholerae* la magnitud de la infección varía dependiendo de la cepa invasora (Mims, et al., 1999; Humphrey, 2002; Chart, 2002c).

Es de suma importancia que los extractos hexánico y de acetato de etilo mostraran actividad sobre las cepas bacterianas antes mencionadas ya que como consecuencia del abuso que se hace de los antibióticos se ha propiciado la aparición de cepas resistentes.

En el cuadro 6 se exhiben los valores de CMI y CBM de los extractos sobre las distintas cepas bacterianas, se puede observar que el extracto hexánico (a pesar de poseer un espectro de acción menor al del extracto de acetato de etilo) mostró una mayor actividad al registrar un efecto bacteriostático y bactericida a una concentración inferior de 0.125 mg/ml para el caso de *V. cholerae* caso clínico.

Además de evaluar la actividad antimicrobiana contra 12 especies de bacterias, la actividad de los extractos se valoró en 6 especies de hongos de importancia médica y agronómica.

El extracto hexánico exhibió actividad sobre las especies *F. sporotrichum*, *R. solani* y *C. albicans*, mientras el extracto de acetato de etilo fue activo contra *R. solani* y *C. albicans*, también el extracto metanólico presentó actividad contra *R. solani*.

Candida albicans es responsable de causar micosis superficiales y sistémicas, además de ocasionar un número importante de infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Myrvin & Weisner, 1991). Existen reportes que afirman que fármacos antifúngicos disponibles comercialmente inducen muchos tipos de toxicidad en los pacientes (Somchit, et al., 2003), por lo cual es de suma importancia que los extractos hexánico y de acetato de etilo mostraran actividad sobre este hongo.

Varias especies de *Fusarium* son responsables de importantes enfermedades en las plantas asociadas con pérdidas económicas, tales como pudriciones de la raíz en frijol, cacahuate, soya, espárragos y pastos para céspedes; pudriciones del tallo en clavel y crisantemo; pudriciones de bulbos, cormos y tubérculos en cebolla, iris, lirio y gladiola; pudrición de granos y leguminosas postcosecha (Agrios, 1996). El control de esta plaga se ve dificultado debido a la dispersión de las esporas por el viento, lo que permite que el hongo se establezca rápidamente en el suelo, El uso de fungicidas incrementa los costos de producción e incrementan la aparición de cepas resistentes. Además, se ha reportado que algunas especies de *Fusarium* son capaces de causar infecciones oportunistas en animales y el hombre (Matos, 1999).

La especie *Rhizoctonia solani* provoca ahogamiento de plántulas, pudrición de la raíz en orquídeas, cancrisis del tallo (mal del talluelo) en diversas especies de importancia agrícola, pudrición de frutos almacenados como el café, tizones o manchas del follaje, pudrición radicular, mal de almacigo (Agrios, 1996, Fich & Fich 1974). Las enfermedades ocasionadas por especies de *Rhizoctonia* son frecuentemente difíciles de controlar. Las medidas de control incluyen la aplicación de fungicidas, el desarrollo de cultivares resistentes, la rotación de cultivos, el control biológico y la desinfección del suelo, sin embargo no pueden ser usadas en todas circunstancias. Los métodos de control, aunque efectivos, pueden afectar adversamente a organismos benéficos para la planta e incrementar la incidencia de la enfermedad (Katan, 1996).

Dada la relevancia económica y social de las enfermedades ocasionadas por *Fusarium* y *Rhizoctonia*, es importante detectar nuevos compuestos fungicidas ante los cuales las cepas existentes no posean resistencia. Las raíces son una excelente fuente de compuestos antifúngicos, debido a que los compuestos exudados protegen a la raíz de invasores (Yaniv & Bachrach, 2002; Vanhaelen, et al. 2000; Harsh, et al., 2004), lo anterior justifica que el extracto hexánico obtenido de la raíz de *G. glutinosum* mostrará actividad contra la especie *F. sporotrichum*., y que los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico resultaran activos contra *R. solani*. Dichos extractos podrían usarse para el control biológico de hongos fitopatógenos. Los extractos obtenidos de la raíz de *G. glutinosum* deberían ser considerados como un potencial fungicida en el control de enfermedades ocasionadas por *F. sporotrichum* y *R. solani*.

Si se toma en cuenta que los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico tuvieron actividad contra *R. solani*, se puede sugerir que los compuestos que exhiben actividad antifúngica poseen distinta naturaleza polar y que actúan en grupo o existen fenómenos de sinergia entre ellos (Challis & Hopwood , 2003).

Se eligió fraccionar el extracto hexánico y valorar su actividad antibacteriana debido a la presencia de cristales, los antecedentes fitoquímicos y a que presento los valores más bajos de CMI y CBM. De la cromatografía en columna se obtuvieron un total de 35 fracciones, de las cuales 4 exhibieron actividad (Fig. 11), se eligió caracterizar la fracción 25S por presentar un halo de inhibición mayor. El hecho de que las fracciones 26S, 26P y 35 presentaran actividad puede indicar que el compuesto activo de la fracción 25S esta también presente en ellas o que existen fenómenos de sinergia entre los distintos compuestos.

Al comparar mediante cromatografía en capa fina el diterpeno ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico aislado por Serrano (2004) con la fracción 25S obtenida en el presente trabajo, usando como fase móvil Hexano-Cloroformo 6:4 se observó que el diterpeno permaneció en el punto de aplicación, mientras en la fracción 25S se observaron 4 manchas, ninguna de ellas en el punto de aplicación, por lo cual se puede afirmar que la actividad encontrada en la fracción 25S aislada de la raíz de *G. glutinosum* no se debe a la presencia del diterpeno ácido (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico.

Las cuatro manchas observadas en la cromatografía en capa fina, pueden indicar la cantidad de compuestos encontrados en la fracción, Ribeiro y colaboradores (2003) mencionan que los exudados de las raíces son mezclas relativamente puras, en comparación con los extractos obtenidos de la parte aérea. El bajo rendimiento de la fracción 25S impidió el aislamiento del compuesto activo.

Es necesario que en investigaciones posteriores se utilice una mayor cantidad de raíz de *G. glutinosum*, con la finalidad de incrementar el rendimiento y poder realizar el aislamiento del o los compuestos activos.

CONCLUSIONES

La mayoría de componentes de la raíz de *G. glutinosum* son de naturaleza polar

La raíz de *G. glutinosum* presenta actividad antibacteriana y antifúngica.

El extracto que presentó un espectro más amplio de actividad antibacteriana fue el de acetato de etilo, sin embargo el extracto hexánico presentó los valores más bajos de CMI y CBM.

El extracto hexánico fue el que presentó mayor actividad antifúngica

La raíz de *G. glutinosum* contiene más de un compuesto activo

Existen diferencias entre los compuestos activos de la parte aérea y las raíces de *G. glutinosum*

APÉNDICE I

Antibióticos

Los antibióticos son productos naturales que matan selectivamente o al menos inhiben el crecimiento de microorganismos.

Antibacterianos

Las bacterias son microorganismos unicelulares, procariontes, carecen de membrana nuclear, mitocondrias, sistema retículo endoplásmico y aparato de Golgi. Su material genético está constituido por ADN, contienen dentro del citoplasma ribosomas y sistemas enzimáticos necesarios para su metabolismo. Las bacterias se caracterizan por presentar una envoltura externa constituida principalmente por peptidoglicano (Calderón, 1997).

Para combatir a las bacterias patógenas, se han desarrollado distintos fármacos. El primer antibacteriano que se descubrió data del año 1900, como resultado de la observación de que *Pseudomonas aeruginosa* no permite el crecimiento bacteriano en su alrededor, debido a que la bacteria produce el compuesto denominado piocianina. Posteriormente en 1929 Alexander Fleming descubrió el efecto antibacteriano del hongo *Penicillium notatum* sobre el estafilococo dorado, desde entonces las investigaciones para el desarrollo de nuevos antibacterianos es constante hasta nuestros tiempos (Kumate, 1981).

Los antimicrobianos actúan alterando algún constituyente de las bacterias que permite y facilita la fagocitosis y la lisis bacteriana. Se considera un antimicrobiano como bactericida cuando este altera las estructuras vitales de los microorganismos y como bacteriostático cuando su acción conduce a la detención de la actividad en la reproducción o síntesis de constituyentes de los microorganismos, así la asociación de dos fármacos bactericidas deberían potencializar y ampliar su espectro antimicrobiano, además existe un antagonismo entre un bacteriostático y un bactericida, puesto que el

primero impide que el microorganismo esté en síntesis, por lo cual el segundo no actuará (Calderón, 1997).

Las características ideales que cualquier antimicrobiano debería poseer son una toxicidad 100% selectiva, inhibiendo o destruyendo a los microorganismos, pero sin dañar al huésped, impedir la selección de cepas resistentes, ser activo contra un amplio espectro de microorganismos, no ser alergénico, no mostrar efectos adversos cuando se administra a dosis elevadas, permanecer activo en diversos fluidos orgánicos y exudados, ser hidrosoluble, entre otros. Sin embargo no existe un antimicrobiano que posea todas estas características (Calderón, 1997).

Clasificación

Debido al alto número de agentes antibacterianos su clasificación se basa en el mecanismo de acción, ya sea interfiriendo en la síntesis de la pared celular, membrana citoplásmica, síntesis de proteínas, ácidos nucleicos o por antagonismo.

(Inhibición de la síntesis de pared celular

Ya que la mayor parte de las bacterias poseen una pared celular rígida (compuesta por peptidoglicano esencial para su supervivencia y viabilidad) no presente en células de mamíferos, esta estructura es el principal blanco para agentes que exponen toxicidad selectiva (la capacidad de inhibir o destruir el microbio sin dañar al huésped). Los inhibidores de la síntesis de pared celular bacteriana actúan sobre la formación de la capa peptidoglicano. Las bacterias que no poseen pared celular como los mycoplasmas, son resistente a estos agentes (Calderón, 1997; Greenwood & Ogilvie, 2002).

Agentes β -lactámicos.

Penicilinas y cefalosporinas. Poseen en su estructura química un anillo tiazolidínico para las penicilinas y en cefalosporinas un anillo dihidrotiazina unido a un anillo betalactámico, a los que se les unen cadenas laterales que pueden alterar el comportamiento farmacológico de la molécula y algunas veces su actividad antibacteriana. Todos los derivados β -lactámicos tienen su acción en la fase final de la polimerización de la estructura de la pared celular, se unen a las enzimas denominadas proteínas enlazadoras de penicilina o PBPs implicadas en la fase final de la formación de la pared. La resistencia a los β -lactámicos puede ser consecuencia de la ruptura del anillo betalactámico o de alteraciones en los sitios blanco (proteínas fijadoras de penicilina), además las bacterias cuenta con enzimas β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico, transformando la penicilina en ácido peniciloico. Estas enzimas son extracelulares, inducibles y con alta afinidad por sustratos en bacterias gram-positivas y pequeñas, constitutivas y con menor afinidad por sustratos en gram-negativas. Los antibióticos pueden penetrar la membrana externa de las bacterias gram-negativas a través de las porinas (familia de proteínas de membrana externas), por lo que la resistencia puede ser causada por la disminución o deficiencia de dichas proteínas (Petrosino & Paizkill, 1996; Doménech, et al., 1999).

Monobactam es un compuesto monocíclico con un espectro que esta restringido a bacterias aeróbicas gram-negativas (Greenwood & Ogilvie, 2002).

Carbapenos tienen un excepcionalmente amplio espectro de actividad, sobre bacterias anaerobias gram-positivas y negativas (Greenwood & Ogilvie, 2002).

Clavam, ácido clavulánico, exhibe una pobre actividad antibacteriana, pero ha demostrado ser útil como un inhibidor de beta-lactamasas cuando es usado en combinación con compuestos susceptibles a beta lactamasas (Greenwood & Ogilvie, 2002).

Sulfonas, sulbactame y tazobactame, también actúan como inhibidores de β -lactamasas y son administradas en combinación con ampicilina y piperacilina (Greenwood & Ogilvie, 2002).

Glicopéptidos. Se denominan así porque contienen residuos de azúcar y aminoácidos. Vancomicina y ristocetina son moléculas grandes que son incapaces de penetrar en la membrana de bacterias gram-negativas, por lo que su espectro queda restringido a bacterias gram-positivas. Su importancia reside en la acción que presentan contra cocos gram-positivos con múltiple resistencia a otros medicamentos. Tienen acción a nivel de membrana citoplasmática impidiendo que los precursores del disacárido N-acetil glucosamina y ácido N-acetil murámico se unan y sean transportados al exterior. Este efecto solo puede ocurrir cuando el microorganismo posee un precursor de peptidoglicano con un dipéptido terminal D-ala-D-ala (ya que la transpeptidización ocurre cuando uno de los dos residuos de D-alanina presentes en el microorganismo se pierde y el penúltimo se une a otro precursor del peptidoglicano). La resistencia ocurre cuando la bacteria codifica proteínas que cambian la ruta de síntesis de peptidoglicano o sintetizan un precursor de peptidoglicano diferente, impidiendo la unión del antibiótico a los componentes de la pared celular (Billot-Klein, et al., 1997).

Cicloserina. Inhibe competitivamente las primeras reacciones citoplásmicas en la síntesis del disacárido de N-acetilglucosamina y ácido N-acetil murámico (Greenwood & Ogilvie, 2002).

Fosfomicina. Inhibe la síntesis de N-acetilglucosamina y ácido N-acetil murámico, al impedir la condensación del ácido fosfoenolpirúvico con la N-acetil glucosamina (Greenwood & Ogilvie, 2002).

Bacitracina. Impide que un fosfolípido localizado en la membrana citoplasmática actué como un intermediario en el transporte a través de ella durante el segundo paso de la síntesis de la pared celular (Greenwood & Ogilvie, 2002).

(*Alteración de la membrana citoplásmica*

Polimixinas. Son lipopéptidos cíclicos, anfipáticos; dada su afinidad por las superficies cargadas negativamente se unen a la superficie externa de la membrana citoplásmica, alterando su estructura y propiedades osmóticas, acción que se realiza posiblemente por el desplazamiento del magnesio y del calcio, llevando a un desarreglo de los componentes fosfolípidos y lipopolisacáridos. Modificaciones en los LPS o en las concentraciones de Mg y Ca confieren resistencia a polimixinas (Groisman, et al.,1997).

Polienos. Tales como la anfotericina, inhiben el crecimiento de organismos cuyas membranas contienen esteroides, alterando la permeabilidad al unirse a esterol-espolienos, por lo que altera la arquitectura membranal (Calderón, 1997).

(*Alteración en la síntesis de proteínas*

Inhibidores de la transcripción

Actinomicinas. Son oligopéptidos que forman complejos con el ADN alterando su estructura por lo cual impiden la acción de la ARN polimerasa (Calderón,1997).

Rifamicinas. Compuestos por anillos aromáticos adyacentes a los que se une un radical alifático, la más utilizada es la rifampicina, que interactúa con una de las subunidades de la polimerasa de ARN impidiendo la acción catalítica de esta (Calderón, 1997).

Inhibidores de la traducción

Aminoglucósidos. Inhiben la formación del complejo de iniciación ribosomal y también causan la lectura incorrecta del ARN mensajero. Primero se unen a la superficie bacteriana y entran por difusión hasta alcanzar una concentración idónea para unirse a todos los ribosomas que participan en la síntesis de proteínas. Las bacterias pueden hidrolizar en uno o varios sitios la molécula de los aminoglucósidos propiciado así la resistencia (Calderón, 1997).

Tetraciclinas. Su toxicidad selectiva se debe a que las bacterias las acumulan, penetran gracias a las porinas que permiten el paso sobre la membrana externa de las bacterias gram-negativas y a un sistema de transporte dependiente de energía que penetra la membrana interna, una vez en el interior, su unión a la subunidad 30s interfiere con la unión de ARN de transferencia con el ribosoma, por lo que el complejo aminoacil- tARN-GTP-factor de elongación Tu no se forma por lo cual no se dispone de aminoácido para el ARN mensajero y no crece la cadena polipeptídica, con lo que se inhibe la síntesis de proteínas. La resistencia puede originarse en la disminución de la bomba de influjo o la adquisición de un plásmido que codifique para una bomba de eflujo (Thanassi, et al.,1995).

Cloramfenicol. Su acción inhibitoria se origina por su fijación a la subunidad 50S, lo que inhibe la síntesis proteica. Como mecanismo de resistencia las bacterias adquieren un plásmido que codifica para cloramfenicol acetiltransferasa o cierra su mecanismo de influjo (Widdowson, et al.,2000).

Macrólidos. Entre ellos se incluye la eritromicina que actúa uniéndose a la subunidad 50s del ribosoma inhibiendo la síntesis de proteínas al impedir la transpeptidización y translocación, además poseen un prolongado efecto postantibiótico que impide la formación de la subunidad ribosomal 50s. La reducción de la permeabilidad, el eflujo activo, la digestión enzimática y las mutaciones cromosomales que alteran la proteína o el ARN en el sitio de unión ribosomal son los mecanismos de resistencia que presentan las bacterias ante los macrólidos (Garza, et al.,2001).

Linconcinamidas. Al igual que el cloramfenicol impide la unión del aminoácido- ARN de transferencia al ribosoma (Calderón,1997).

Ácido fusídico. Posee una naturaleza esteroide e impide la reacción de translocación que debe llevarse a cabo después de la formación del enlace peptídico para que se libere el ARN de transferencia, ya sin la unión al aminoácido (Greenwood & Ogilvie, 2002).

Oxazolidinonas. Estos compuestos prevén la formación de el complejo de iniciación ribosomal (Greenwood & Ogilvie, 2002).

Streptograminas. Este es el nombre colectivo que se le asigna a la familia de antibióticos que existen naturalmente como dos componentes sinérgicos (por ejemplo pristinamicina/virginiamicina), se unen a la subunidad 50s del ribosoma e inhiben la síntesis proteica en dos diferentes estados. La resistencia puede deberse a una degradación intracelular o a mecanismos de eflujo (Bozdogan & Leclercq, 1999; Seoane, 2000).

Mupirocina. Antibiótico producido por *Pseudomonas fluorescens*, bloquea la incorporación de isoleucina a proteínas (Greenwood & Ogilvie, 2002).

(Alteraciones del ADN

Se conocen varios antimicrobianos que afectan la estructura y función del ADN, pero poseen una alta toxicidad y son agentes teratogénicos potenciales.

Mitomicina. Se transforma en hidroquinona a través de un mecanismo enzimático, es altamente reactiva y funciona como agente quelante lo que conlleva a entrecruzamiento covalentes entre las cadenas complementarias del ARN (Calderón, 1997).

Quinolonas. Químicamente relacionadas con el ácido nalidíxico. Inhibe la síntesis de DNA por medio de la inhibición de dos topoisomerasas la DNA girasa encargada del superenrollamiento del cromosoma y la topoisomerasa IV que ayuda a replicar y dividir a los cromosomas. El mecanismo de resistencia involucra mutaciones cromosomales que afectan la permeabilidad a la droga incrementando el eflujo o su sensibilidad al alterar alguna de las subunidades de la DNA girasa (Kitamura, et al., 1995; Yamagishi, et al., 1996).

(Antagonismo

Agentes antifolatos. Incluyen sulfonamidas y trimetropina, son análogos del ácido para-amino-benzoico, precursor del ácido fólico, por lo que interfieren en su síntesis, impidiendo que la bacteria sintetice purinas, pirimidinas y aminoácidos. La resistencia esta mediada por la adquisición de genes que mutan la enzima dihidroterato sintetasa (DHPS) la cual es el sitio activo del antibiótico (Fermér, et al., 1995).

Isoniacida. Hidracida del ácido isonicotínico, especifica para *Mycobacterium tuberculosis*, se sugiere que es antagónico de la niacina y el piridoxal (Calderón, 1997).

Antifúngicos

Los hongos, tanto filamentosos como las levaduras son células eucarióticas, por lo que las diferencias con las células del huésped son mínimas, ésta radica en la pared celular, cuya estructura es multilaminada, formada por fibrillas diversamente orientadas, sus principales constituyentes químicos son polisacáridos (80-90%) incluyendo celulosa, glucanos, quitina, manosa y galactosa. En los hongos miceliales la pared está formada principalmente por quitina-glucano mientras que en las levaduras existe un incremento de manosa. Exhiben dimorfismo (habilidad de cambiar de hábito micelial a levadura), este cambio es acompañado por cambios en las cantidades de manosa y quitina de la pared celular. Se ha observado que la composición química no es la misma en todos los hongos ni en todas las circunstancias, el estado de madurez, el pH o la temperatura influyen profundamente en dicha variación (Dowes & Sutherland, 1976; Alexopoulos & Mims, 1985; Calderón, 1997).

A pesar de que los hongos causen una amplia variedad de infecciones en el hombre y las plantas, pocos agentes están disponibles para su tratamiento, sobre todo para tratar micosis sistémicas severas, algunos de los disponibles actualmente se enlistan a continuación agrupados por su mecanismo de acción (Dowes & Sutherland, 1976; Alexopoulos & Mims, 1985; Calderón, 1997):

(Inhibición de la función de la membrana celular

Anfotericina B. Se sitúa dentro del grupo de los polienos y actúa uniéndose al lípido ergosterol de las membranas citoplásmicas de los hongos, por lo que se alteran las propiedades de permeabilidad con la pérdida de potasio y otros componentes celulares, lo que conduce a lisis celular. (Calderón, 1997; Mims, et al.,1999; Greenwood & Ogilvie, 2002)

(Inhibición de la síntesis de pared celular

Imidazoles. Entre ellos se ubica el miconazol, ketoconazol, intraconazol y fluconazol, activos contra dermatofitos, algas, hongos dimórficos, actinomicetos y algunas bacterias gram-positivas. Inhiben la lanosterol C14 dimetilasa que es una enzima importante en la biosíntesis de esterol, con lo cual se afecta la permeabilidad de la membrana por la salida de muchos componentes celulares. La inhibición de la enzima mitótica de forma preferente frente a la humana es la clave de la toxicidad selectiva. El miconazol además se une al citocromo C, peroxidasa y catalasa elevando la concentración de peróxidos y la consecuente lisis celular. (Calderón, 1997; Mims, 1999)

Caspofungina. Es un miembro de la clase de los agentes equinocandina, interfieren con la síntesis β -glucano en la pared celular del hongo. (Greenwood & Ogilvie, 2002)

(Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos

Flucitosina. Penetra al hongo en forma de 5-fluocitosina por medio de la citosina permeasa, en el citoplasma la citosina desaminasa la transforma de 5 fluoracilo, que puede dar ARN defectuoso o impedir la síntesis de ADN. (Calderón, 1997; Mims, et al.,1999)

Griseofulvina. Inhibe el ensamblaje de los microtúbulos, puede también inhibir la síntesis de quitina en la pared celular. (Mims, et al., 1999)

Bacillus subtilis

- ‖ Intoxicación por alimentos (toxina termolabil causante de diarrea y toxina termoestable provoca vómitos)
- ‖ Bacteriemia en huéspedes inmunodeprimidos
- ‖ Infecciones en ojos, oídos, tracto urinario y respiratorio (Mims, et al., 1999).

BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Escherichia coli.

- ‖ Infecciones de vías urinarias
- ‖ Meningitis neonatal
- ‖ Septicemia
- ‖ Enfermedades gastrointestinales asociadas a un serotipo específico
 1. *E. coli* entero patogénica: Causa enteritis infantil, especialmente en países tropicales
 2. *E. coli* entero toxigénica: Causa diarrea, produce una toxina termolábil similar a la del cólera. Se presenta en zonas de poca saneación, se conoce comúnmente como diarrea del viajero
 3. *E. coli* enteroinvasiva: Ocasiona enfermedades similares a la disentería en pacientes de edad avanzada
 4. *E. coli* productora de verotoxina. Provoca diarrea acuosa severa con grandes cantidades de sangre en la evacuación (colitis hemorrágica). Complicaciones importantes como el síndrome hemolítica uremico se presentan en niños.
 5. *E. coli* enteroagregativa. Diarrea crónica (Chart, 2002a)

Shigella boydii

- } Causa infecciones cuyos síntomas son similares a los de la disentería, invade las células epiteliales provocando que las células de la lamina propia y la submucosa del intestina desarrollen una reacción inflamatoria con trombosis capilar (Chart, 2002b)

Salmonella typhi

- } Fiebre tifoidea (Myrvin & Weiser, 1991)

Vibrio cholerae

- } Cólera caracterizado por vomito súbito y diarrea acuosa con lo cual se produce una rápida deshidratación y shock hipovolemico puede provocar la muerte en 12-24 horas. (Chart, 2002c)

Yersinia enterocolitica

- } Enteritis
- } Linfadenitis mesentérica
- } Ileritis Terminal
- } Septicemia
- } Complicaciones post operatorias (poliartritis, tiroiditis, síndrome de Reiter)
- } En niños causa fiebre, diarrea, dolor abdominal y vomito (Myrvin & Weiser, 1991)

HONGOS

Tricophyton mentagrophytes

- } Hongo dermatofito causa tiña así como el comúnmente llamado pie de atleta. (Myrvin & Weiser, 1991)

Candida albicans

- } Micosis sistémicas
- } Candidiasis superficial y profunda
- } Algodoncillo (Myrvin & Weiser, 1991)

Aspergillus niger

- } Aspergilosis
- } Trombosis e infarto cuando invaden vasos sanguíneos
- } Bloqueo parcial de la vía aérea por masas micóticas
- } Reacciones broncopulmonares y alergias (Myrvin & Weiser, 1991)
- } Invasión de embriones de las semillas
- } Pudrición de la fibra del algodón
- } Pudrición negra de la cebolla
- } Pudrición del grano de maíz (Fich & Finch, 1974)

Fusarium moniliforme

- } Tizón en las plantas de algodón
- } Pudrición basal en la caña de azúcar
- } Necrosis foliar en el maíz
- } Produce además la micotoxina T2, tóxica para el cerdo (Agrios, 1996; Fich & Fich 1974)

Rhizoctonia solani

- ‖ Ahogamiento de plántulas
- ‖ Pudrición de la raíz en orquídeas
- ‖ Cancrosis del tallo (mal del talluelo) en melon, crisantemo, frijol, mani, aguacate, ajonjolí, apio, camote, cebolla, rabano, tabaco, tomate y citricos
- ‖ Pudricion de frutos almacenados, como el café
- ‖ Tizones o manchas del follaje
- ‖ Pudricion radicular en arveja, gladiola
- ‖ Mal de almacigo en chile, pepino, sandia y zanahoria (Agrios, 1996, Fich & Fich 1974)

APÉNDICE III
MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR DE KIRBY-BAÜER
(Konneman, et al., 1985)

El método empleado para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos fue el siguiente:

MEDIO DE CULTIVO

Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-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 produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

INÓCULO

Con un asa estéril de poliéster se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en un tubo con 10 ml de caldo Müller-Hinton y se descarga el material. El tubo de cultivo se incuba a 37°C de 18 a 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml. El estándar 0.5 de MacFarland se prepara añadiendo 0.5 ml de sulfato de bario a 99.5 ml de H₂SO₄ 0.36N. 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 más turbia que el estándar, se añade solución salina (NaCl 0.8%) hasta igualarla. Una vez logrado esto, se sumerge un 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 inocula la superficie de una placa de agar Müller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance la temperatura ambiente.

Finalmente, se siembra mediante estría en al menos tres direcciones, girando la placa en ángulos de 60° después de cada estría. Se permite que la capa de bacterias se adhiera a la superficie de agar durante un periodo de 5 minutos, después se aplican los sensidiscos con las muestras a las cuales se les evaluará su actividad antibacteriana. 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.

APLICACIÓN DE SUSTANCIAS

Para este caso se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman No.5. En todos los casos se hacen diluciones para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto. Se utilizan 2 mg de los extractos disueltos en 10µl del disolvente correspondiente a cada extracto. Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril y 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 sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración de cada extracto a evaluar. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo.

CONTROLES NEGATIVOS

Discos a los que se les agrega 10 μl del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

CONTROLES POSITIVOS

Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 25 μg de cloramfenicol.

INCUBACIÓN

Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad, se les colocan en una incubadora a 37°C sin mayor tensión de CO_2 . Es preciso evitar presión de CO_2 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 incuba siempre placas con discos sin sustancias a evaluar como control negativo.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio en milímetros.

MÉTODO CUALITATIVO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL

(Wang & Bun, 2002)

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas petri (100 x 15mm) que contienen 10 ml de agar de papa dextrosa, en el cual se inoculan las esporas del hongo. Después que el micelio se ha desarrollado, se colocan discos previamente impregnados con el compuesto activo a concentraciones crecientes (la preparación de los discos es igual a la técnica de difusión en agar). Si es el primer ensayo con un extracto crudo, se recomienda usar concentraciones grandes de activo (1-2 mg por disco). Alternativamente si el activo es soluble en agua se pueden colocar los discos sobre el agar y posteriormente agregar el compuesto disuelto en agua a la concentración deseada. Los discos se colocan a una distancia de 5mm del límite micelial.

INCUBACIÓN

Las placas son incubadas a 23°C durante 72 h hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

CONTROLES NEGATIVOS

Discos a los que se les agregará 10 µl del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

CONTROLES POSITIVOS

Se evaluará la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 7 µg/disco de ketoconazol.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En el caso de existir zonas de inhibición se reportará el extracto como activo, en todos los casos esta prueba se hará por triplicado.

APÉNDICE IV

MICROTÉCNICA DE DILUCIÓN EN CALDO (Koneman, et al., 1985)

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM).

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 utilizarán placas con 96 concavidades.

La microplaca se prepara colocando 50 microlitros de caldo de Müller-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 Müller-Hinton (Bioxon 260) y se incuba a 35°C durante 24 horas obteniendo una concentración bacteriana de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml. Se hace una dilución en solución isotónica de NaCl 0.8% para obtener una concentración de 1.5×10^5 bacterias/ml, en cada una de las 96 concavidades se colocan 50 microlitros de ésta dilución.

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 utilizaron 50µl del solvente del extracto y cloranfenicol como control positivo.

Después del tiempo de incubación, se añade a cada cavidad 50 μ l 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.

BIBLIOGRAFIA

1. Agrios, G.N. 1996. **Fitopatología**. 2ª edición. Ed. Limusa. México. pp 444-470.
2. Alexopoulos, J.C., Mims, C. W. 1985. **Introducción a la Micología**. Ed. Ediciones Omega. Barcelona, España. pp. 10-11.
3. Argueta, V.A., Cano, L. A., Rodarte, 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.
4. Billot-Klein, Legrand, R. D., Schoot B., Van Heijenoort, J., Gutman, L. 1997. **Peptidoglycan structure of *Lactobacillus casei*, a species highly resistant to glycopeptide antibiotics**. Journal of Bacteriology. 179:6208-6212.
5. Binns, S.E., Purgina, B., Bergeron, C., Smith, M.L., Ball, L., Baum, B.R., Arnason, J.T. 2000. **Light-mediated antifungal activity of *Echinacea* extracts**. Planta Med. 66(3):241-4.
6. Bozdogan, B., Leclerc R. 1999. **Effects of genes encoding resistance to streptogramins A and B on the activity of quinupristin-dalfopristin against *Enterococcus faecium***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43: 2720-2725.
7. Calderón – García, A. 1956. **Bosquejo geológico de la región de San Juan Raya, Puebla**. In: Maldonado K.M. Congreso Geológico Internacional. Excursión A-11. Estratigrafía del Mesozoico y Tectónica del Sur del Estado de Puebla. Presa de Valsequillo, Sifón de Huexotitlanapa y problemas hidrológicos de Puebla. México.
8. Calderón, S.J., Segura-Correa, R., Céspedes, L.C., Toscano, R.A. 2001. **Crystal and Molecular Structure of (-)-17-hidroxi-neo-clerod-3-en-15-oico Acid from *Gymnosperma glutinosum***. Analytical sciences 17: 1467-1468.
9. Calderón, J.E. 1997. **Aplicación clínica de antibióticos y quimioterapicos**. 7ª edición. Ed. Méndez editores. México. pp. 7-47.
10. Canales, M.M. 2000. **Actividad antibacteriana de la planta *Alternanthera caracasana* HBK (Tianguis)**. Tesis de Maestría en Ciencias. FES- Iztacala. UNAM. México.
11. Canales, M.M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Durán, A., Lira, R. **Informant consensus factor and antibacterial activity of the**

- medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México.**
Journal of Ethnopharmacology. (En prensa).
12. Cantrel, C.L., Abate, L., Fronczec, F.R., Franzblau, S.G., Quijano L., Fisher, N.H. 1999. **Antimycobacterial eudesmanolidos from *Inula helenium* y *Rudbeckia subtomentosa*.** Planta Med. 65: 351-355
 13. Challis, L.G., Hopwood, A. D. 2003. **Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species.** Proc National Academic Science U S A. 100(Suppl 2): 14555–14561.
 14. Chart, H. 2002a. ***Escherichia*.** In: Greenwood, D., Slack C.B.R. & Peutherer F.J In: A guide to microbial infections: Medical microbiology pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control.. 16^a edición. Editorial Churchill Livingstone. pp 265-267.
 15. Chart, H. 2002b. ***Shigella*.** In: Greenwood, D., Slack C.B.R. & Peutherer F.J. A guide to microbial infections: Medical microbiology pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control.. 16^a edición. Editorial Churchill Livingstone. pp 260-263
 16. Chart, H. 2002c. ***Vibrio, mobiluncus, gardnerella y spirillum*.** In: Greenwood, D., Slack C.B.R. & Peutherer F.J In: A guide to microbial infections: Medical microbiology pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control.. 16^a edición. Editorial Churchill Livingstone. pp 296-299.
 17. Chen, Z., Sun, Y., Dong, T., Zhan, H., Cui, X. 2003. **Comparison of amino acid contents in *Panax notoginseng* from different habitats.** Zhong Yao Cai. 26(2):86-8.
 18. Cordell, G.A. 2000. **Biodiversity and drug discovery—a symbiotic relationship.** Phytochemistry 55: 463-480.
 19. Cordero, C. 1996. **La industria farmacéutica en busca de nuevos elementos: explorar la biodiversidad.** Biodiversitas. Año2. No. 10. CONABIO.
 20. Cronquist, A. 1981. **Introducción a la botánica.** 2^a edición. Editorial Continental. México.

21. Dávila, P., Arizmendi, M. del C., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J.L., Casas, A., Lira, R. 2002. **Biological diversity in Tehuacán–Cuicatlán valley.** México. *Biodiversity and Conservation* 11: 421-442.
22. Davis, J. 1994. **Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes.** *Science* 264: 375-382.
23. Doménech, S.A., Hernández, A.S., Martínez, M.L., Benedi, V., Alberti, S. 1999. **Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in β -Lactam antibiotic resistance.** *Journal of Bacteriology*. 181: 2726-2732.
24. Domínguez, X.A. 1973. **Métodos de Investigación Fitoquímica.** Ed. Limusa. México. pp. 13-15.
25. Domingo, D., López-Brea, M. 2003. **Plantas con acción antimicrobiana.** *Revista Española de Quimioterapia*. 16 (4): 385-393.
26. Doves, W.I., Sutherland W.I. 1976. **Microbial physiology.** Ed. Blackwell Scientific Publications. Londres, Inglaterra. pp 17-18.
27. Esquenazi, D., Wigg, M.D., Miranda, M.M.F.S., Rodríguez, H.M., Tostes, J.B.F., Rozental, S., Silva, A.J.R., Alviano, C.S. 2002. **Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract.** *Res Microbiol* 153: 647-652.
28. Estrada, L.E.I.J. 1989. **El código Florentino. Su información etnobotánica.** Ed. Colegio de Postgraduados. México. pp 32,33.
29. Fermér, C., Kristiansen, B., Skold, O., Swedberg, G. 1995. **Sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* as defined by site-directed mutagenesis could have its origin in other species.** *Journal of Bacteriology*. 177: 4669-4675.
30. Fich, H.C., Fich A.N. 1974. **Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina.** Editorial Trillas. México. pp 58.
31. García, E. 1981. **Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen.** CETENAL. México.
32. Garduño-Ramírez, M.L, Trejo, A., Navarro, V., Bye, R., Linares, E., Delgado, G. 2001. **New modified eremophilanes from the roots of *Psacalium radulifolium*.** *Journal of Natural Products*. 64(4):432-5.

33. Garza, G., Xiong, L., Zhong, P., Mankin, A. 2001. **Binding site of macrolide antibiotic on the ribosome: new resistance mutation identifies a specific interaction of ketolides with rRNA.** Journal of Bacteriology. 183: 6898-6907.
34. Gleba, D., Borisjuk, V. N., Borisjuk, G. L., Kneer R., Poulev, Skarzhinskaya, M., Dushenkov, S., Logendra, S., Gleba Y.Y., Raskin I. 1999. **Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming.** National Academy of Sciences. 96(11): 5973-5977.
35. Gómez, C.J.L. 1990. **Páginas de la historia de la farmacia.** Sociedad Nestlé A.E.P.A., Madrid, España. pp 229.
36. Greenwood, D., Ogilvie M.M. 2002. **Antimicrobial agents.** In: Greenwood D., Slack C.B.R., Peutherer F.J. A guide to microbial infections: Medical microbiology pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control. 16^a edición. Ed. Churchill Livingstone. pp 46-55.
37. Groisman, E., Kayser, J., Soncini, F. 1997. **Regulation of Polymyxin resistance and adaptation to low-Mg⁺² environments.** Journal of Bacteriology . 179: 7040-7045
38. Gros, G.E., Polilio, A.B., Seldes, M.A., Burton, G. 1985. **Introducción al estudio de los productos naturales.** Ed. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Estados Unidos. 145 p.
39. Hamburger, M., Hostettmann, K. 1991. **Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine.** Phytochemistry 30(12):3864-3874.
40. Harsh, P.B., Sang-Wook, P., Tiffany, L.W., Ragan, M.C., Vivanco, J.M. 2004. **How plants communicate using the underground information superhighway.** Trends in Plant Science. 9 (1): 26-32.
41. Harvey, A. 2000. **Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products.** Drug Discovery Today 5(7):294-300.
42. Heinrich, M., Robles M., West, E.J., Ortiz de Montellano, R.B., Rodríguez E. 1998. **Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae).** Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 38:539-565.
43. Hernández, D.C.T. 1999. **Actividad antimicrobiana de la planta *Tegetes lucida* Cav. (Pericón).** Tesis de Maestría en Ciencias. FES- Iztacala. UNAM. México.

44. Hernández, T., Canales, M., Avila, J.G., Duran, A., Caballero, J., Romo de Vivar, 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.
45. Hopkins, G.W. 1995. **Introduction to Plant Physiology**. Ed. John Wiley & Sons Inc. E.U. pp 267-284.
46. Horie ,T., Ohtsuru, Y., Shibata, K., Yamachita, Y.K., Tsukayama, M., Kawamura, Y. 1998. **¹³C NMR sprectral assignment of the a-ring of polyoxygenated flavones**. Phytochemistry. 47 (5): 865-874.
47. Huerta, C. 1997. **La herbolaria: Mito o Realidad**. Biodiversitas. Año 3. No. 12. CONABIO.
48. Humphrey, H. 2002. **Staphylococcus**. In: Greenwood, D., Slack C.B.R. & Peutherer F.J In: A guide to microbial infections: Medical microbiology pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control.. 16^a edición. Editorial Churchill Livingstone. pp 46-55.
49. INEGI. 2000. **Puebla, resultados definitivos, tabulados básicos**. Censo General de Población y Vivienda.
50. INEGI. 2001. **Estadística de las defunciones por países seleccionados según principales causas de mortalidad general**. Dirección General de Estadística Demográfica y Social. México.
51. Katan, J. 1996. **Soil solarization for the control of diseases caused by *Rhizoctonia* spp**. In: Sneh, B., Jabaji, H., Neate, S., Dijst. *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Ed. Klower Academic Publishers. Pp 423-429.
52. Kaufman, B.P., Leland, J. C., Warber, S., Duke, A.J., Brielmann, L.H. 1999. **Natural Products from Plants**. Ed. CRC Press. USA. pp 124.
53. Kitamura, A., Hocino, K., Kimura, Y., Hayakawa, I., Sato, K. 1995. **Contribution of the C-8 substituent of DU6859, a new potent fluoroquinolone, to its activity against DNA gyrase mutants of *Pseudomonas aeruginosa***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 39: 1467-1471.

54. Koneman, E.W., Allen D. S., Dowell, V.R., Sommers, H.M. 1985. **Diagnóstico microbiológico**. Ed. Médica Panamericana. México. Pp 386-393.
55. Kubo, I., Taniguchi, M.1988. **Polygodial, an antifungal potentiator**. Journal of Natural Products. 51(1):22-9.
56. Kumate, J. 1981. **Antibióticos y quimioterápicos**. 2ª edición. Ed. Francisco Mendez Cervantes. México. pp.7.
57. Lara, O. F., Marquez, C. A. 1996. **Plantas medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica**. UNAM. México, D.F. 137 p.
58. Lee, S., Shin, D. S., Kim, J.S., Kang, S.S. 2003. **Antibacterial coumarins from *Angelica gigas* roots**. Arch Pharm Res. 26(6):449-52.
59. Lozoya, X., Aguilar, A., Camacho, J.R. 1987. **Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana**. Revista Medica del IMSS. 25: 283-291.
60. Ma, X.Q., Shi, Q., Duan, J.A., Dong, T.T., Tsim, K.W. 2002. **Chemical analysis of *Radix Astragali* (Huangqi) in China: a comparison with its adulterants and seasonal variations**. Journal of Agriculture Food Chemistry. 50(17):4861-6.
61. Maldonado, E., Segura-Correa R., Ortega, A., Calderón, S.J., Fronczek, F.R. 1994. **Ent-labdane and neo-clerodane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum***. Phytochemistry. 35 (3): 721-724.
62. Mann, J. 1987. **Secondary Metabolism**. 2ª edición. Ed. Oxford Sciene Publications. E.U. pp 7.
63. Martínez, R., Calderón S. J., Toscano, A.R., Valle- Aguilera, L., Mendoza – Candelaria, M. H. 1994. **Ent-neoclerodane diterpenes from *Gymnosperma glutinosum***. Phytochemistry. 35 (6): 1503-1507.
64. Matos, O.C., Baeta, J., Silva, M.J., Pinto, C.P.R. 1999. **Sensivity of *Fusarium* strains to *Chelidonium majus* L. extracts**. Journal of Etnopharmacology. 66: 151-158.
65. Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Mihajlovic, B., Matavulj, M. 2003 **Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils**. Planta Med. 69(5):413-419.

66. Mims, C., Playfair J., Roitt I., Wakelin D., Williams, R. 1999. **Microbiología médica**. Ed. Harcourt. Barcelona, España. pp. 430-540.
67. Mori, A., Nishino, C., Enoki, M., Tawata, S. 1987. **Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus***. *Phytochemistry*. 26 (8): 2231-2234.
68. Murphy, C.M. 1999. **Plant Products as antimicrobial Agents**. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology. 12 (4): 564-582.
69. Myrvin, Q.N., Weisner, R.S. 1991. **Bacteriología y Micología médicas**. Ed. Interamericana McGrawhill. México. pp 362-370, 650-658.
70. Neri, G.D. 2000. **Caracterización hidrológica de la subcuenca baja del río Zapotitlán, Puebla**. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala. UNAM. México.
71. Ortiz – Bermúdez, E., Villaseñor, J.L., Téllez O. 1993. **La familia Asteraceae en el estado de Nayarit (México)**. *Acta Botánica Mexicana*. 44: 25-57
72. Osorio- Beristain, O.A., Valiente-Banuet, A., Dávila, P., Medina, R. 1996. **Tipos de vegetación y diversidad en el Valle de Zapotitlan de las Salinas, Puebla, México**. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 59:35-58
73. Petrosino, J.F., Palzkill T. 1996. **Systematic Mutagenesis of the Active Site Omega Loop of TEM - β - Lactamase**. *Journal of Bacteriology*. 178: 1821-1828
74. Ribeiro de Paiva, S., Figueiredo, R.F. Aragão, T.V., Coelho, K. M A. 2003. **Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98(7).
75. Rivas, R.A. 2003. **Levantamiento edafológico de la porcion norte del valle de Zapotitlán, Puebla**. Tesis de Licenciatura en Biología. FES-Iztacala. UNAM. México.
76. Romo de Vivar, A. 1985. **Productos naturales de la flora mexicana**. Ed. Limusa. México. pp 70.
77. Rzedowski, J., Equihua, M. 1987. **Atlas cultural de México**. Ed. Secretaría de Educación Pública, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Grupo Editorial Planeta. México. pp. 14-16.

78. Rzedowski, J., C de Rzedowski G. 1985. **Flora Fanerogámica del Valle de México**. Vol. II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN. México. Pp. 501-581.
79. Rzedowski, J. 1978. **Vegetación de México**. Limusa. México. pp 501.
80. Sanggong, Y., Fang, N., Mabry, T.J. 1988. **Flavonoids from *Gymnosperma glutinosum***. Phytochemistry. 27 (1): 171-177.
81. Scalbert, A. 1991. **Antimicrobial properties of tannins**. Phytochemistry. 30 (12): 3875-3883.
82. Secretaría de Gobierno. Gobierno del Estado de Puebla. 1988. **Los municipios de Puebla**. En: Enciclopedia de los municipios de México. Puebla, México.
83. SEMARNAT. 2004. www.semarnat.gob.mx/pfnm/GymnospermaGlutinosum.html
84. Seoane, A., García, J. 2000. **Identification of a streptogramin A acetyltransferase gene in the chromosome of *Yersinia enterocolitica***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44: 905-909.
85. Serrano, P.R. 2004. **Estudio comparativo de la actividad antibacteriana de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. de dos localidades: San Rafael Coxcatlan, Puebla y Tepeji del Río, Hidalgo**. Tesis de licenciatura en Biología. FES- Iztacala. UNAM. México.
86. Soberón, M. J., Llorente, J. B. 1993. **La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad de México (CONABIO)**. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. Vol. Esp. (XLIV) : 3-17.
87. Somchit, M.N., Reezal, I., Nur, E., Mutalib, A.R. 2003. **In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata***. Journal of Ethnopharmacology. 84: 1-4.
88. SSA. 2002. Boletín de Información Estadística. Daños a la salud. Volumen II. Núm. 20 y 22. México, D.F.
89. Stepp, R.J., Moerman E.D. 2001. **The importance of weeds in ethnopharmacology**. Journal of ethnopharmacology. 75: 19-23.
90. Summer, J. 2001. **The natural history of medicinal plants**. Ed. Timber Press. Portland Oregón, USA. pp 15-31, 89-99.
91. Tanaka, H., Sato, M., Fujiwara, S., Hirata, M., Etoh, H., Takeuchi, H. 2002 **Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata***

- against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.** Lett Appl Microbiol. 35(6):494-8.
92. Thanassi, D., Shuh, G., Nikaido, H. 1995. **Role of outer membrane in efflux mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*.** Journal of Bacteriology. 177:998-1007.
93. Valiente-Banuet, A., Flores-Hernández, N., Verdú, M., Dávila, P. 1998. **The chaparral vegetation in Mexico under non-mediterranean climate: the convergence and Madrean-Tethyan hypotheses reconsidered.** American Journal of Botany. 85:1398-1408.
94. Vanhaelen, M., Lejoly, J., Hanocq, M., Molle L. 2000. **Climatic and geographical aspects of medicinal plant constituents.** In: Wijeseler, R. The medicinal plant industry. Ed. CRC Press. E.U. pp. 59-73.
95. Vivanco, M.J. 2001. **Andean roots as chemical factories: ribosome inactivating proteins in *Mirabilis expansa*.** www.redbio.org/portal/encuentros/enc2001/.
96. Vivanco, M.J., R. Guimaraes L. & H. E. Flores. 2002. **Underground Plant Metabolism; The biosynthetic Potential of Roots.** In: Maisel, Y., Eshel, A., Kafkaf U. Plant roots the hidden half. 3^a edición. Ed. Marcel Dekker Inc. E.U. pp 1045-1064.
97. Wang, H., Bun, T.N. 2002. **Isolation of an antifungal thaumatin -like protein from kiwi fruits.** Phytochemistry 61: 1-6.
98. Widdowson, C., Adrian, P., Klugman, K. 2000. **Acquisition of chloramphenicol resistance by the linearization and integration of the entire staphylococcal plasmid pC194 into the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44: 393-395.
99. Yamagishi, J., Kojima, T., Oyamada, Y., Fujimoto, K., Hattori, H., Nakamura, S., Inoue, M. 1996. **Alteration in the DNA topoisomerase IV *grlA* gene responsible for quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40 : 11576-1163.
100. Yaniv, Z. Bachrach, U. 2002. **Roots as a Source of Metabolites with Medicinal Activity.** In: Maisel, Y., Eshel, A., Kafkaf U. Plant roots the hidden half. 3^a edición. Ed. Marcel Dekker Inc. E.U. pp 1071-1084.

101. Zamilpa, A., Tortoriello, J., Navarro, V., Delgado, G., Alvarez, L. 2002. **Antispasmodic and antimicrobial diterpenic acids from *Viguiera hypargyrea* roots.** *Planta Med.* 68(3):281-3.
102. Zavala, H.A. 1982. Estudios ecológicos en el Valle de Zapotitlán, Puebla. *Biótica.* 7 (1): 88-117.