



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE SUELOS

Evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano y antifúngico de *Pinus hartwegii* Lindl. y *Abies religiosa* (H.B.K.) Cham. & Schlecht., del Parque Nacional Izta-Popo

T É S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA

BEJARANO SOLIS MARÍA DE LA LUZ

DIRECTORA DE TESIS: M. EN C. MARÍA DE JESÚS SÁNCHEZ COLÍN

MÉXICO D. F.

MAYO 2008





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Este trabajo esta dedicado principalmente a cuatro personas esenciales en mi vida; la primera de ellas eres tú mamita, juntas lo logramos... también es para ti papi. Son lo máximo, los admiro y los respeto.

Carlos y Bere, este trabajo también es suyo, son excelentes hermanos, los únicos y los mejores, sin ustedes mi vida no seria tan divertida.

*A Pedro, Rosario y Adolfo, Ernestina y Gabriel,
Lucina y Gildardo, mis tíos favoritos.*

Y por su puesto a todas las personas que siempre han creído en mi.

AGRADECIMIENTOS

Gracias familia, por apoyarme siempre y sin condiciones. Puedo decir mucho pero nunca seria suficiente para expresar todo lo que he recibido de ustedes y lo agradecida que les estoy.

A la M. en C. María de Jesús Sánchez Colín, por sus conocimientos transmitidos, pero sobre todo gracias por sus sabios consejos y su gran AMISTAD.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO por brindarme la oportunidad de concluir una etapa tan importante en mi vida.

A los sinodales: M. en C. Manuel Faustino Rico Bernal, M. en C. Carlos Castillejos Cruz, M. en C. Patricia Rivera García, Biól Elvia García Santos, y a la M. en C. María de Jesús Sánchez Colín, por contribuir con sus conocimientos a este trabajo.

A mis amigos tan apreciados: Diana, Kike, Cristian, Gabriel, Erik, Yas, Dana, Raquel, Osvaldito, Héctor (el chino), Armando, Alfredo, Mario, Lupita, Avisahí, Ivan, Cinthya, y Ricardo (sabes que eres muy importante), a todos gracias por brindarme su amistad; también a todos mis compañeros con los que en algún momento coincidimos en tiempo y espacio, gracias por hacer divertida la estancia en la facultad.

Carlos gracias por estar siempre pendiente de mi, Eleanne, Evelyn y Erika, trabajar con ustedes fue un placer.

Y no pueden faltar Lucerito, Benny, Abdi, Urbi, Felipe, Cesos y como no mencionarte Billy, gracias por compartir una parte de tu vida conmigo, agradezco cada minuto vivido a tu lado. Gracias familia GARRAPANTEPANTE por hacer inolvidable mi estancia en Chiapas.

Gracias Ingeniero, por escucharme, apoyar mis decisiones y por muchas otras cosas.

*Gracias bebe, lo mejor que me pudo pasar, es tenerte como hermano.
Lo único que me resta por decir es gracias.*

iii POR FIN... TERMINAMOS !!!

ÍNDICE

	Pág.
Figuras	V
Cuadros	VII
Resumen	1
Introducción	2

CAPITULO I PLANTAS MEDICINALES

Plantas medicinales	4
Principios activos	5
Factores que afectan la composición de los metabolitos secundario	8
Métodos de extracción de principio activos	10
Técnicas para la determinación de compuestos orgánicos	11

CAPITULO II

PINO Y OYAMEL

***Pinus hartwegii* Lindl.**

Bosques de <i>Pinus</i> (pino)	14
Descripción botánica	15
Composición química	16
Propiedades medicinales	16

***Abies religiosa* (H.B.K.) Cham. & Schlecht.**

Bosques de <i>Abies</i> (Oyamel)	17
Descripción botánica	18
Composición química	19
Propiedades medicinales	19

CAPITULO III SENSIBILIDAD MICROBIANA

Antibiogramas	22
Técnica de difusión en discos	23
Técnica de Kirby-Bauer	23
Técnica de Barry	24

CAPITULO IV MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Microorganismos patógenos del hombre	26
Grupos patógenos	27
❖ Bacterias	27
❖ Hongo	28

CAPITULO V HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis	31
Objetivo general	31
Objetivos particulares	32

CAPITULO VI FASE DE CAMPO

Sitio de muestreo	34
Recolecta de material vegetal	36
Muestreo de suelo	36

CAPITULO VII FASE DE LABORATORIO

Determinación de propiedades físicas y químicas del suelo	38
Proceso de extracción de los principios activos	39
Peso seco de los extractos vegetales	39

Preparación de las concentraciones	40
Impregnación de los sensidiscos	40
Cepas de microorganismos	40
Estandarización microbiológica del inóculo	41
Pruebas de sensibilidad antimicrobiana	42
Espectroscopia de infrarrojo	42

CAPITULO VIII

FASE DE GABINETE

Análisis estadístico	44
----------------------	----

CAPITULO IX

RESULTADOS Y DISCUSION

Pinus hartwegii Lindl.

Rendimiento	47
Propiedades físicas y químicas del suelo	48
Pruebas de sensibilidad antifúngicas	49
Pruebas de sensibilidad antibacterianas	50
Halos de inhibición de hoja	51
Halos de inhibición de rama	52
Halos de inhibición de corteza	53
Concentraciones mínimas inhibitorias	54
Análisis de espectroscopia de infrarrojo (IR)	56
Espectros de infrarrojo de hoja	57
Espectros de infrarrojo de rama	58
Espectros de infrarrojo de corteza	59

***Abies religiosa* (H.B.K.) Cham. & Schlecht.**

Rendimiento	62
Propiedades físicas y químicas del suelo	63
Pruebas de sensibilidad antifúngicas	64
Pruebas de sensibilidad antibacterianas	65
Halos de inhibición de hoja	66
Halos de inhibición de rama	67
Halos de inhibición de corteza	68
Concentraciones mínimas inhibitorias	69
Espectros de infrarrojo de hoja	71
Espectros de infrarrojo de rama	72
Espectros de infrarrojo de corteza	73

CAPÍTULO X

CONCLUSIONES	77
---------------------	-----------

APÉNDICE

Antibiogramas

I. *Pinus hartwegii* Lindl.

II. *Abies religiosa* (H.B.K.) Cham. & Schlecht.

LITERATURA CITADA	100
--------------------------	------------

FIGURAS

Número	Página
1. <i>Pinus hartwegii</i> Lindl.	15
2. <i>Abies religiosa</i> (h.b.k.) cham. & schlecht.	18
3. Colocación de sensidiscos	24
4. Sitio de muestreo	35
<i>Pinus hartwegii</i> Lindl.	
5. Resultados promedio de los halos de inhibición (mm) con las seis concentraciones de <i>pinus hartwegii</i> para las siete cepas de bacterias con hoja.	51
6. Resultados promedio de los halos de inhibición (mm) con las seis concentraciones de <i>Pinus hartwegii</i> para las siete cepas de bacterias con rama.	52
7. Resultados promedio de los halos de inhibición (mm) con las seis concentraciones de <i>Pinus hartwegii</i> para las siete cepas de bacterias con corteza.	53
8. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las tres estructuras frente a las cepas de bacterias que mostraron ser susceptibles a los principios activos de <i>Pinus hartwegii</i> .	54
9. Espectro infrarrojo del extracto de hoja.	57
10. Espectro infrarrojo del extracto de rama.	58
11. Espectro infrarrojo del extracto de corteza.	59
<i>Abies religiosa</i> (H.B.K.) Cham. & Schlecht.	
12. Resultados promedio de los halos de inhibición (mm) con las seis concentraciones de <i>Abies religiosa</i> para las siete cepas de bacterias con hoja.	66
13. Resultados promedio de los halos de inhibición (mm) con las seis concentraciones de <i>Abies religiosa</i> para las siete cepas de bacterias con rama.	67

14. Resultados promedio de los halos de inhibición (mm) con las seis concentraciones de <i>Abies religiosa</i> para las siete cepas de bacterias con corteza.	68
15. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de las tres estructuras frente a las cepas de bacterias que mostraron ser susceptibles a los principios activos de <i>Abies religiosa</i> .	69
16. Espectro infrarrojo del extracto de hoja.	71
17. Espectro infrarrojo del extracto de rama.	72
18. Espectro infrarrojo del extracto de corteza.	73

CUADROS

Número	Página
1. Escala de Mcfarland.	41
<i>Pinus hartwegii</i> Lindl.	
2. Rendimiento de peso seco.	47
3. Propiedades físicas y químicas del suelo.	48
4. Tamaño (mm) de los halos de inhibición (hongos).	49
5. Tamaño (mm) de los halos de inhibición (bacterias).	50
<i>Abies religiosa</i> (H.B.K.) Cham. & Schlecht.	
6. Rendimiento de peso seco.	62
7. Propiedades físicas y químicas del suelo.	63
8. Tamaño (mm) de los halos de inhibición (hongos).	64
9. Tamaño (mm) de los halos de inhibición (bacterias).	65

RESUMEN

Atendiendo las necesidades de encontrar nuevas sustancias que tengan efecto antibiótico sobre las cepas microbianas que día con día presentan mayor resistencia contra antibióticos comerciales, se plantea buscara antibióticos naturales a partir de dos especies de árboles, en este caso *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*, que han sido poco estudiadas desde el punto de vista medicinal, por lo cual uno de los objetivos de este trabajo es aportar información que permita la conservación de los bosques pero sobre todo comprobar su utilidad como plantas medicinales, para lo cual se evaluó *in vitro* el efecto antibacteriano y antifungico frente a siete tipos de bacterias y seis especies de hongos patógenos al hombre. Bacterias: *Corynebacterium xerosis*, *Mycobacterium phlei*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus β- hemolítico*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y hongos: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida estellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* y *Geotrichum sp*); Se separaron estructuras del árbol en hoja, rama y corteza, para obtener las tinturas, por medio del método galénico, después de una destilación se obtuvieron los extractos en peso seco, a partir de los cuales se prepararon las concentraciones de 30, 60, 90, 120, 150 y 200 mg mL⁻¹, consecutivamente se impregnaron sensibilizadores de 6 mm de diámetro. Se inocularon los medios de cultivo Muller-Hinton para bacterias y Sabouraud para hongos y se incubaron a 35-37 °C durante 18 horas y 48 horas respectivamente. Frente a los hongos no hubo respuesta inhibitoria en ninguna de las dos especies. Se observó que *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa* tienen efecto antibacteriano, las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) se encuentran en un rango de 30 a 120 mg mL⁻¹, la estructura con mayor efecto antibacteriano es la corteza, en ambas especie y *Abies religiosa* tiene mayor efecto antimicrobiano en comparación con *Pinus hartwegii*.

Palabras clave: *Abies religiosa*, *Pinus hartwegii*, Plantas medicinales, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Antifungico y Antibacteriano.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos el hombre hizo uso de las plantas con fines alimenticios y medicinales, aprendiendo primero del comportamiento de los animales y luego a través de su propio instinto, generado por el conocimiento empírico.

Es probable que se emplearan las plantas desde épocas remotas, ya que en los yacimientos arqueológicos de esa época en Shanidar, Irak, se ha encontrado polen de plantas consideradas como medicinales. Entre los documentos históricos de Babilonia, Egipto, India, China, Grecia y Roma sus fuentes más antiguas contienen numerosas referencias a las plantas medicinales, coexistiendo en muchos casos la medicina naturalista con la superstición y la metafísica. (Fundación Alfonso Martín Escudero, 1999).

En México, las culturas prehispánicas tenían conocimiento de las propiedades medicinales de varias especies de plantas que ahora son la base para que en México desde principios del siglo XIX hasta mitad del siglo XX se produjeran medicamentos a partir de sus extractos, pero debido a que la demanda superó a la oferta, las empresas farmacéuticas cambiaron sus estrategias de producción inclinándose por la fabricación de medicamentos sintéticos que probablemente pueden causar efectos secundarios; a diferencia de los medicamentos naturales que por sus constituyentes químicos son más fácil de asimilar y desechar (Martínez, 2000).

Otro de los problemas de varios sectores de la sociedad mexicana es la carencia de recursos económicos lo cual impide el acceso a los medicamentos de patente (por su elevado costo), es por esto que la medicina tradicional está teniendo de nueva cuenta un auge a nivel mundial entrando en las prácticas de desarrollo sustentable, pero el camino aun es largo y la aceptación de esta alternativa es gradual.

La importancia de este trabajo radica en proponer una alternativa de uso a algunas especies de coníferas que habitan en el bosque del Parque Nacional Izta-Popo y contribuir a la difusión de del uso de la medicina tradicional y los beneficios que acarrea; ya que además de resaltar la importancia que brinda como proveedor de servicios ambientales o de recursos maderables, también alberga una gran cantidad de especies vegetales con propiedades medicinales que no han sido suficientemente estudiadas y protegidas. Por ello en la presente investigación se evaluó *in vitro* el efecto antibacteriano y antifúngico sobre patógenos del hombre, de dos especies de coníferas *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii*.

CAPITULO

I

PLANTAS MEDICINALES

PLANTAS MEDICINALES

Las plantas medicinales son vegetales que elaboran sustancias activas que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre un organismo vivo. Su utilidad primordial, a veces específica es servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida; es decir, que tiende a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que representa una enfermedad. Constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes (Muñoz, 1987), sin embargo, en México existen dos niveles de difusión al respecto de la flora medicinal, el primero tiene lugar en el ámbito académico-científico y desafortunadamente es muy escaso, el segundo está en el público en general, pero la veracidad y sobre todo la calidad de esta información es dudosa. Con estas circunstancias, la información etnobotánica acerca del uso y propiedades medicinales que la población reconoce para diversas especies, cobra gran importancia, ya que permite valorar desde el punto de vista científico tales recursos, a la vez que la clasificación botánica promueve la información que existe en el mundo sobre aspectos de química y farmacología (Lozoya, 1999). Por otro lado, se ha dicho que en la actualidad está incrementando el uso de las plantas medicinales y que ha crecido el interés por las mismas; no es que se comiencen a usar de nuevo, pues en muchos lugares nunca se dejaron de utilizar, mientras que en otros se suspendió su uso por la influencia de la medicina institucional. Hoy en día un núcleo muy amplio de la población mexicana sigue empleando solo plantas medicinales y remedios caseros (Linares y col. 1990).

El bosque produce alimentos que complementan la dieta o generan a las comunidades campesinas pequeños ingresos, estos alimentos incluyen: hongos frutas, nueces, raíces, hojas; plantas medicinales y especies utilizadas tanto en forma doméstica o para venderse en los mercados locales; materiales para utensilios domésticos y para la construcción incluyendo: maderas para muebles y viviendas, materiales para techos y pisos, charolas y silos; combustible para cocinar y para empresas de pequeña escala; y extracción comercial de chicle y resinas en áreas limitadas de México (Linares y col. 1990); específicamente los árboles y arbustos proporcionan diversos productos, entre los que destacan la leña y el carbón, madera para construir viviendas y artículos de uso agrícola y doméstico, semillas, frutos y forraje, néctar ceras, grasas y aceites, taninos y sustancias medicinales, gomas, látex, resinas y colorantes, así como esencias y condimentos (Niembro, 1990). Los productos obtenidos de los pinos en general son de dos clases: los primarios o directos y secundarios o indirectos. Los primarios son madera, trementina y semillas, según las especies; y los secundarios: carbón, el aguarrás, la brea, el ácido piru-leñoso, el alquitrán, el alcohol metílico (Martínez, 1963).

PRINCIPIO ACTIVO

Los principios activos de las plantas son aquellas moléculas que, producidas por el metabolismo se encuentran dotadas de una actividad farmacológica. La molécula gana su calificación como principio activo cuando al, introducirse en un organismo vivo, genera en él modificaciones medibles, en una o más de sus células vivientes, como consecuencia de acciones químicas o fisicoquímicas (Pedretti, 1990). Así mismo las plantas, pueden contener principios activos antagónicos (es decir, con efectos contrarios) o principios activos sinérgicos (cuyo efecto al ser administrados conjuntamente se suma) (Kuklinski, 2003).

Una gran parte de los medicamentos actuales (hay quien lo cifra en el 50%) están basados en principios activos aislados de las plantas medicinales. Algunos de estos principios activos son agentes potencialmente tóxicos, como alcaloides y glucósidos cianogénicos, otras sustancias presentan un efecto mucho más suave o progresivo. Los taninos contenidos en muchas sustancias aumentan la resistencia a las infecciones y ejercen una acción astringente que puede ser de gran utilidad contra diarreas y para contrarrestar todo tipo de hemorragias y fluidos corporales. Los mucílagos protegen las mucosas y la piel de las posibles irritaciones, por su parte los flavonoides refuerzan las paredes de los capilares y facilitan una buena circulación sanguínea. Los principios amargos estimulan la secreción de las glándulas salivales y los digestivos mejorando la absorción de nutrientes. A las saponinas, entre otras facultades, se les atribuye una fuerte acción hormonal. Fenoles como el ácido salicílico mitiga el dolor. El contenido de sales minerales y vitaminas de muchas plantas compensan el déficit de estos agentes en nuestro organismo y nos ayuda a superar situaciones de debilidad, agotamiento y anemia (Cebrián y Guarga, 2002).

En un principio, los metabolitos primarios y los secundarios no se pueden diferenciar con base en su estructura química, molécula precursora u orígenes biosintéticos. En ausencia de una distinción válida entre ambos tipos de sustancias se toma en cuenta su función, de modo que serán metabolitos primarios aquellos que participan en la nutrición y procesos metabólicos esenciales para la planta, mientras que metabolitos secundarios serán los que permitan interacciones ecológicas de la planta con su entorno. Es decir, algunos metabolitos secundarios sólo están presentes en determinadas especies y cumplen una función ecológica específica, como por ejemplo atraer a los insectos para transferirles el polen, o a animales para que éstos consuman sus frutos y así poder diseminar sus semillas; también pueden actuar como pesticidas naturales contra herbívoros o microorganismos patógenos, incluso como agentes alelopáticos (sustancias que permiten la competencia entre especies vegetales), también se pueden sintetizar metabolitos secundarios en respuesta a daño en algún tejido de la planta, así como contra la luz UV y otros agentes físicos agresivos, incluso actuar como señales para la comunicación entre plantas con microorganismos simbiotes (Valle, 2007).

Existen diversos principios activos tales como:

Alcaloides

Es un compuesto orgánico de origen vegetal, nitrogenado, más o menos básico, de distribución limitada capaz, a bajas dosis, de marcadas propiedades farmacológicas. Su toxicidad puede actuar a diferentes niveles:

- Sistema nervioso central.
- Sistema simpático.
- Hígado (hepatotoxicidad).
- Aparato digestivo (Bruneton, 1999).

Flavonoides:

Los flavonoides están ampliamente distribuidos entre los vegetales y se encuentran en todas las plantas superiores, sobre todo en partes aéreas (hojas flores y frutos). Algunos son responsables del color amarillo en ciertos organos (Kuklinski, 2003).

Los flavonoides refuerzan las paredes de los capilares y facilitan una buena circulación sanguínea. Son principios amargos que actúan produciendo la secreción de las glándulas salivales y los digestivos mejorando la absorción de nutrientes (Reynaud, 2002).

Los flavonoides y los compuestos relacionados (antocianos, catequinas y leucoantocianidinas) proceden del metabolismo secundario de los vegetales a través de la ruta del ácido shikímico. También proceden de esta ruta fenoles sencillos, ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos, entre otros.) cumarinas, lignanos, flavonoides, antocianos y taninos (Kuklinski, 2003).

Heterosidos cardiotonicos (o cardiotoxicos):

Son moléculas que actúan sobre el corazón a diversos niveles: influyen en la fuerza y velocidad de contracción, frecuencia, conductibilidad, En dosis terapéuticas, regulan la función cardiaca, pero en dosis altas pueden matar. Los heterosidos cardiotonicos de origen vegetal son los principales medicamentos en los tratamientos de insuficiencia cardiaca. Se encuentran en pocas familias vegetales; sin embargo, dentro de algunas de estas familias, son numerosas las especies entre las cuáles estas moléculas son particularmente abundantes por ejemplo en Apocináceas y Asclepiadáceas. En los tratamientos terapéuticos se utilizan heterosidos extraídos de *Digitalis* y existe un riesgo de intoxicación por sobredosis que se manifiesta en nauseas, vómitos, visión en color amarillo, alteraciones nerviosas y cardiacas (Reynaud, 2002).

Heterosidos cianogenéticos (o cianógenos):

Son moléculas como prunaidin, amigdalidina que, en presencia de las enzimas correspondientes, liberan azúcares... y ácido cianhídrico es un potente veneno respiratorio. Las concentraciones en heterosidos cianogénicos nunca son muy elevadas para que haya intoxicación grave (Reynaud, 2002).

Saponinas (o saponocidos):

Heterosidos frecuentes entre los vegetales. Son sustancias complejas, muy tóxicas para los peces para el ser humano (propiedades hemolíticas, propiedades irritantes a nivel de aparato digestivo. Son antiinflamatorias y antiedematosas. Construyen una materia prima importante para la hemisíntesis de hormonas esteroideas (Reynaud, 2002). A las saponinas, entre otras facultades, se les atribuye una fuerte acción hormonal (Cebrián y Guarda, 2002).

Rafidios de oxalato de calcio:

Son cristales que provocan micro-desgarros en la piel, en caso de frotamiento o en las mucosas, en caso de ingestión. Su acción mecánica puede facilitar igualmente la penetración de otras sustancias (Reynaud, 2002). Se presentan en cerca del 1% de las plantas, localizadas en ciertos órganos, como el rizoma de ruibarbo, que puede sobrepasar el 20 % del peso seco, constituye, con frecuencia, un carácter de considerable importancia diagnóstica en taxonomía vegetal (Trease y Evans, 1991).

Existen otras sustancias químicas que se encuentran con menos frecuencia:

Lactosas:

Abundantes en las ranunculáceas y puede ser debido a la decencia de protoanemonina (Reynaud, 2002).

Oleorresinas:

Son mezclas de aceites esenciales y resinas, por ejemplo la trementina de los pinos o los bálsamos (Kuklinski, 2003). La mayor parte de las coníferas sintetizan oleorresinas que encierran a veces alcoholes tóxicos (tuyona, sabinol, entre otros) (Reynaud, 2002).

Taninos:

Los taninos no son tóxicos en general, pero consumir una planta con alta concentración de ellos puede causar desordenes a nivel del aparato digestivo (Reynaud, 2002). Los taninos contenidos en muchas plantas aumentan la resistencia a las infecciones y ejercen una acción astringente que puede ser de gran utilidad para tratar diarreas y para contrarrestar todo tipo de hemorragias y fluidos corporales (Cebrián, 2002). Están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina) Son agentes quelantes, con metales pesados (cobre, mercurio, plomo, estaño, cinc). Por ésta razón en

ocasiones se utiliza como antídoto en intoxicaciones causadas por estos metales (Kuklinski, 2003).

Algunos de estos principios activos son agentes potencialmente tóxicos, como alcaloides y glicoselidos cianogénicos, pero de ellos que se derivan medicamentos muy activos que deben ser aplicados con cautela y bajo estricto control médico. Otras sustancias presentan un efecto mucho más suave o progresivo (Cebrià, 2002).

El contenido en principios activos y la relación entre distintos constituyentes productores de drogas en un organismo no son valores estáticos, sino que varían durante la vida de la planta en relación a la interacción de factores internos o externos.

FACTORES QUE AFECTAN LA COMPOSICIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

EFFECTO DE LOS FACTORES GENÉTICOS O ENDÓGENOS

Los miembros de una especie raramente son homogéneos genéticamente. Cuando las diferencias genéticas son lo suficientemente grandes se habla de subespecies, variedades, tipos. Tales diferencias derivan de los genes, que pueden producir cambios morfológicos y en muchos casos también de diversidad bioquímica, es decir pueden dar diferencias en las características y el tipo de constituyentes producidos. Siempre que ocurren estas diferencias bioquímicas para cada tipo particular, es denominada "variedad fisiológica". Con lo cual la concentración, naturaleza y calidad de las sustancias puede variar (Acosta, 2003).

EFFECTOS ECOLÓGICOS O EXÓGENOS

El ambiente donde crecen las plantas, ejerce gran influencia en lo que respecta a los principios activos. La luz, temperatura y principalmente la precipitación, en conjunto determinan la presencia de estos compuestos en las plantas. También la velocidad del viento (factor poco estudiado), es determinante en muchos casos, se conoce que por su acción se incrementa la evaporación de aceite esenciales y que sin embargo en el caso de los alcaloides el aumento de la transpiración en las plantas hace que sea mayor el contenido de líquido que asciende desde las raíces, por lo que es muy probable, que por esta vía se incremente el contenido en las hojas en las especies productoras de alcaloides (Acosta, 2003).

La luz es el factor relacionado con la temperatura y varía con la estación del año y la hora del día; es menor en otoño e invierno a causa de la inclinación de los rayos solares y al alto grado de nubosidad y más intensa en horas del mediodía debido a la mayor elevación angular del sol. La luz favorece el crecimiento de los tejidos jóvenes etapa en la cual ocurre la acumulación de los principios activos.

La temperatura también juega un papel importante en la producción de metabolitos secundarios, influye en el crecimiento acelerado y en el equilibrio que existen entre el proceso fotosintético y el respiratorio; por consiguiente, en la producción de los principios activos.

Con relación a las precipitaciones, estas juegan un rol fundamental ya que regulan la temperatura; (en el caso de las plantas cultivadas también el riego es un elemento a considerar). Las lluvias, además, influyen sobre la distribución geográfica de las plantas, haciendo que muchas especies estén limitadas a las orillas húmedas de corrientes de agua, lagunas y pantanos, asimismo su distribución irregular da lugar a la división del año en estaciones secas y lluviosas lo que hace que la producción de los principios activos sea afectado por el exceso o falta de lluvia (Acosta, 2003).

En lo que se refiere a la influencia que ejerce en las especies productoras de aceites esenciales, se conoce que las respuestas son variadas; por lo general las altas temperaturas aumentan su volatilización, pero además pueden generar variaciones tanto en las cantidades del aceite así como en sus componentes.

Finalmente se puede establecer que se ha demostrado que algunos factores agroclimáticos resultan básicos para la producción de plantas medicinales y que el rendimiento de los cultivos está influenciado por el manejo del cultivo (incluye tanto su rango de adaptación, las técnicas y métodos culturales y los sistemas de producción agrícola) y del medio, fundamentalmente el clima, donde se desarrollan las especies (Acosta, 2003).

Las diferentes especies vegetales varían enormemente en cuanto a sus requerimientos de suelos y nutrimentos. Este aspecto ha sido objeto de considerable atención con respecto a las plantas medicinales. Y son tres las propiedades de los suelos consideradas como fundamentales: sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas, por ejemplo: el tamaño de las partículas influye en la capacidad de retención de agua, y ciertas plantas que producen mucílagos como producto que retiene agua, contienen menos mucílago cuando crecen sobre un suelo de alto contenido en humedad. Todas las plantas requieren calcio para su normal nutrición, aunque hay especies (por ejemplo, *Pinus pinaster* y *Digitalis purpurea*) conocidas como calcíforas que no pueden crecer sobre suelos alcalinos.

El efecto de los abonos con nitrógeno sobre la producción de alcaloides ha sido objeto de considerable estudio. Generalmente, los fertilizantes nitrogenados incrementan el tamaño de las plantas y las cantidades de alcaloides producidos. Los efectos del nitrógeno sobre los contenidos en heterósidos y en esencias parece variable; se supone, en estos casos, que el resultado final depende del efecto general del nitrógeno sobre el metabolismo de la planta. Durante algún tiempo se ha mantenido que trazas de manganeso son necesarias para la producción con éxito de *Digitalis purpurea*; más recientemente Letchamo (*Planta Med.*, 1986, 421 [K 13]), ha demostrado que un régimen de manganeso y molibdeno en el abono durante los dos años del desarrollo de *D. grandiflora* da lugar a un significativo incremento en el rendimiento en heterósidos (Trease y Evans, 1991).

Varios miles de sustancias han sido descritas hasta el día de hoy. La mayoría de estas moléculas tiene una actividad biológica muy poderosa y algunas son consideradas venenos poderosos y (por tanto) grandes medicamentos (atropina, colchicina, estroquina, entre otras).

MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS

A lo largo de la historia la Fitoterapia ha desarrollado diversos métodos de extracción para el mejor aprovechamiento de las virtudes terapéuticas de las plantas, los cuales son el propósito de este apartado.

El método de extracción utilizado depende del tipo de planta a emplear (caracteres organolépticos), de la concentración de principios activos y de sus propiedades farmacológicas (Kuklinski, 2003). Según la textura o los componentes de la planta, existen varios procedimientos:

Infusión: se vierte el agua hirviendo sobre la planta colocada en un recipiente de cierre bien ajustado, a fin de evitar la pérdida de principios activos, y se deja en reposo de 5 a 15 minutos, filtrándose y tomándose inmediatamente. Generalmente se utiliza para flores, hojas y tallos tiernos.

Decocción: consiste en echar la planta en agua hirviendo y dejarla hervir durante 5 ó 20 minutos, a una temperatura superior al punto de ebullición, en un recipiente cerrado para evitar la evaporación. Se utiliza para raíces, tallos fuertes y cortezas.

Maceración: la planta se introduce en agua o en un disolvente (alcohol) a temperatura ambiente durante varias horas (generalmente de 8 a 12 horas) el resultado de esta preparación son las tinturas tienen la ventaja de ser preparaciones muy simples y sin manipulaciones posteriores. Las tinturas, infusiones y cocimientos, tienen una concentración poco elevada de principios activos, no obstante entre ellas, las tinturas son más concentradas, debido a que el alcohol tiene una mayor capacidad extractiva que el agua.

Digestión: se trata de macerar la planta en agua a temperatura media, alrededor de 50° C, durante algún tiempo. Se utiliza sobre todo para el agotamiento de las drogas resinosas o cuando los disolventes empleados son grasos (preparación de aceites medicamentosos).

Percolación o lixiviación: en este caso el agua, alcohol u otro disolvente atravesaría una columna llena de planta pulverizada, arrastrando durante el proceso los principios activos.

Maceración-Decocción: se utiliza para ciertas tisanas, compuestas de partes vegetales duras y tiernas, en donde está indicado ponerlas en maceración antes de cocerlas.

TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS

En el siglo XIX y principios del XX el proceso de determinación de la estructura de los compuestos orgánicos era difícil y consumía mucho tiempo, pero en las últimas décadas, se han hecho avances extraordinarios. Hoy se dispone de técnicas que simplifican mucho la determinación de las estructuras tales como Espectrometría de Masas, Espectroscopia en el Infrarrojo (IR), Espectroscopia en el Ultravioleta (UV), la Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) (McMurry, 2004).

En el espectrómetro de masas se bombardean las moléculas con un haz de electrones energéticos que las ionizan y las rompen en muchos fragmentos, algunos de los cuales son positivos. Cada tipo de ion tiene una razón particular de masa o carga. El conjunto de iones se analiza de modo que se obtiene una señal para cada valor representado; la intensidad de cada señal refleja la abundancia relativa del ion que produce la señal. Un solo Espectro de Masas comprende docenas de propiedades físicas, pues muestra la abundancia relativa de fragmentos diferentes. El Espectro de Masa ayuda a establecer la estructura de sustancias nuevas de varias maneras diferentes: dar un peso molecular exacto; dar una fórmula molecular o, al menos, reducir las posibilidades a muy pocas. También puede indicar la presencia de ciertas unidades estructurales en una molécula (Morrison y Boyd, 1998).

El Espectro de Infrarrojo consta de una fuente emisora que origina un haz de luz compuesto de todas las frecuencias de la radiación infrarroja, cuya absorción se desea medir. Este haz se hace pasar a través de las muestras y luego en un monocromador, en el que se seleccionan las frecuencias de una en una, y se hacen pasar por el detector, sistema capaz de emitir una señal electrónica proporcional a la intensidad de la luz que recibe. En la práctica, el detector recibe dos haces –uno que ha sido pasado a través de la muestra, y otro de referencia

que solo ha atravesado el disolvente (si la muestra se halla disuelta). De otro modo, el espectrofotómetro puede medir directamente la fracción de luz absorbida (o transmitida) sólo por la muestra y a cualquier longitud de onda. Un registrador representa gráficamente de forma continua la cantidad de luz transmitida o absorbida para cada frecuencia; la grafica resultante se denomina espectro infrarrojo del compuesto (Wininger y Stermitz, 1998).

Los espectros para el ultravioleta miden la absorción de luz en la región visible y ultravioleta “cercana”, es decir, en el intervalo 200-750 nm. Esta luz es de frecuencia más elevada (y de mayor energía) que la infrarroja y, cuando es absorbida por una molécula, produce cambios en estados electrónicos que requieren más energía. En una transición a nivel electrónico más alto, una molécula puede ir desde cualquiera de varios subniveles: el resultado es la observación de bandas anchas de absorción ultravioleta. Mientras un espectro de infrarrojo muestra muchos picos muy marcados, un ultravioleta típico sólo indica algunas bandas anchas.

En contraposición con el espectro de infrarrojo, el ultravioleta no se emplea para demostrar la presencia de grupos funcionales individuales, si no más bien para establecer relaciones entre ellos, principalmente la conjugación entre dos o más dobles enlaces (o triples) carbono-carbono; entre dobles enlaces carbono-carbono y carbono-oxígeno; entre dobles enlaces y un anillo aromático, e incluso presencia de un anillo aromático. Además, puede revelar el número y ubicación de sustituyentes unidos a los carbonos del sistema conjugado (Morrison y Boyd, 1998).

La Espectroscopia de Resonancia Magnética nuclear (RMN) es la técnica espectroscópica más valiosa con que se cuenta para la determinación de estructuras químicas. La Espectrometría de Masas proporciona información sobre las formulas de una molécula y que la Espectroscopia de Infrarrojo da información sobre los grupos funcionales de una molécula. La Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear no reemplaza ninguna de esas técnicas; más bien la complementa al producir un “mapa” de las estructuras de carbonos e hidrógenos de una molécula orgánica. En conjunto la Resonancia Magnética Nuclear las Espectroscopias de Infrarrojo, UV y de Masa a menudo hace posible que se puedan determinar las estructuras completas de moléculas muy complejas (McMurry, 2004).

CAPÍTULO

II

PINO Y OYAMEL

Pinus hartwegii

BOSQUE DE PINUS

El género *Pinus*, comprende unas 100 especies; casi todas las ellas crecen en estado natural en el Hemisferio Norte, desde las zonas frías que rodean el mar Ártico por toda Europa, Asia y América del Norte, hasta los países cálidos y lluviosos subtropicales y tropicales, en las Indias Orientales, Archipiélago Filipino, las Antillas, Islas Bahamas, México, Guatemala, Honduras, Nicaragua, con una mayor área de distribución dentro de regiones templadas pero sin traspasar el Ecuador para dispersarse en el Hemisferio Sur, a excepción el *P. merkusii* que traspasa unos grados el Ecuador, en Indonesia, estos árboles han ido formando tipos de especial adaptación a las condiciones del medio en que viven naturalmente.

Los bosques de coníferas, tan frecuentes en las zonas de clima templado y frío del Hemisferio Boreal, también caracterizan muchos sectores del territorio de México, donde presenta una gran variedad florística y ecológica. Se les encuentra prácticamente desde el nivel del mar hasta el límite de la vegetación arbórea; prosperan en regiones de clima semiárido, semihúmedo y francamente húmedo y varios prosperan solo en condiciones edáficas especiales (Rzedowski, 1983).

Los pinares son comunidades vegetales muy características de México y ocupan vasta superficie de su territorio, ya que más del 50% de las especies de pinos que existen en el mundo habitan en la República Mexicana, con la posible excepción de la península de Yucatán, existen bosque de pino en todas las entidades federativas del país. Su distribución geográfica coincide a grandes rasgos con la de los elevados macizos montañosos (Rzedowski, 1983).

En algunas localidades de Chiapas, Oaxaca y Guerrero manchones dominados por *P. oocarpa* también penetran profundamente en áreas de clima caliente y se les ha registrado a 150 m. Sin embargo el grueso de la masa forestal de los pinos mexicanos se desarrolla a altitudes de 1 500 y 3 000 m. A elevaciones mayores los pinares también son frecuentes y constituyen el único tipo de bosques que alcanza el límite superior de la vegetación arbórea, situado en el norte de México a 3 650 m (Beaman y Andesen, 1966). En el centro y sur del país esta línea se ubica aproximadamente a unos 4000 m de altitud, pudiendo sobrepasar localmente la cota de 4 100 m (Beaman, 1962).

Cuando la altitud de la montaña excede los valores mencionados, el pinar limita en su parte superior con los zacatonales o con otro tipo de vegetación alpina. En muchas partes de México los cerros menos elevados (2 500 y 3 600 m) llevan el pinar en sus cumbres y laderas superiores.

Los bosques de *Pinus hartwegii* son los más tolerantes a las temperaturas bajas, pues se desarrollan entre 3 000 y 4 000 m de altitud prácticamente en todas las áreas montañosas de México que alcanzan tales elevaciones. Resisten frecuentes nevadas y su extremo superior establece el límite de la vegetación arbórea en los más prominentes picos montañosos. En sus partes más bajas los pinares de *Pinus hartwegii*, pueden formar asociaciones de estatura elevada (de 15 a 20 m de alto), pero hacia los 4 000 m de altitud con frecuencia constituyen un bosque achaparrado (de 5 a 8 m de alto) y más bien abierto. Las gramíneas rígidas y amacolladas de los géneros *Festuca*, *Calamagrostis* y *Muhlenbergia* son los componentes más característicos del estrato herbáceo; en condiciones de incendios frecuentes algunas especies de *Lupinus* también pueden abundar.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

El *Pinus hartwegii* es un árbol de 5 a 25 o hasta 30 m de altura; tronco con un diámetro hasta de 75 cm, corteza gruesa y áspera, de color café oscuro tornándose grisácea, dividida en placas irregulares o cuadrangulares, ramas extendidas; hojas 4 o 5 en cada fascículo, a veces 3 o 6, rígidas, de 6 a 18 cm de largo, de color verde claro casi glaucas, vainas persistentes; conos masculinos de 1 a 1.5 cm de largo, de color amarillento o violáceo, tornándose café; conos femeninos oblongos, de color azul-violáceo y dispuestos en grupos de 2 a 4, a veces 6, cortamente pedunculados; conos ovoideo-oblongos, levemente encorvados, de 7 a 14 cm de largo, por 5 a 8 cm de diámetro casi sésiles, de color café oscuro o casi negro, a veces con tinte rojizo, persistentes, dispuestos por pares o en grupos de 3 o 4; semillas de 5 a 8 mm de largo de color café, con el ala

de 12 a 20 mm de largo por 5 a 12 mm de ancho, de color café con líneas oscuras (Figura 1) (Rzedowski y Calderon, 2001).

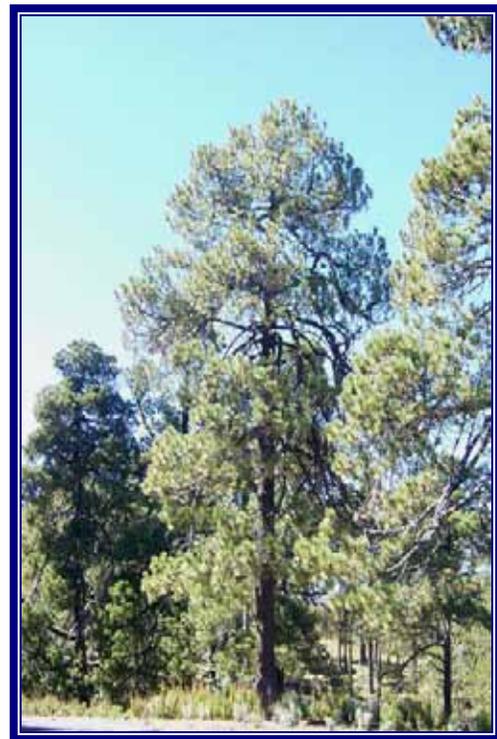


Fig. 1 *Pinus hartwegii*

COMPOSICIÓN QUÍMICA

Los pino contiene aceites esenciales con propiedades medicinales, estos aceites volátiles compuestos principalmente por alcoholes terpénicos, terciarios y secundarios; obtenidos por extracción y fraccionamiento o por destilación con vapor de la madera. El aceite contiene alrededor del 65% de alfa-terpenol, 10 % de métilchavicol y éteres fenólicos afines, 9 % Borneol y 8 % de alcohol Fonquílico y 4 % de Mentanoles. El extracto de pino es un líquido de color ámbar claro o incoloro, con un olor característico y fácilmente miscible con alcohol.

PROPIEDADES MEDICINALES

Aún cuando no hay registros para *Pinus hartwegii* si los hay para otras especies del mismo genero. Como planta medicinal, el *Pinus sylvestris* es el mas empleado, con las yemas secas se prepara una infusión para combatir la bronquitis, el asma y las dolores reumáticos. (Saldierna, 2000); también se utiliza contra catarros pulmonares, laringitis y la trementina se unta en las partes afectadas para combatir granos, acné, supuración de forúnculos y afecciones de la piel (García, 1995); El polen sirve para espolvorear los pruritos y entra también en la composición de remedios rejuvenecedores (Volak y Standali, 1988). También los extractos fluidos alcohólicos de las hojas de *Pinus caribaea* (pino macho) al 75 y 100 % presentan actividad antifúngica frente al *Microsporum canis* y *Trichophytum rubrum* (Rivero *et al.*, 1997).

Abies religiosa

BOSQUES DE ABIES

Aun cuando no cubren grandes superficies de terreno, los bosques de *Abies* sobresalen entre el conjunto de las comunidades vegetales dominadas por coníferas. Tal hecho se debe principalmente a las condiciones ecológicas en las que se desarrollan y de cuya existencia son indicadores. Debido a las similitudes florísticas, faunísticas, fisonómicas y ecológicas con las grandes masas que cubren las porciones septentrionales de Norteamérica y de Eurasia, son pruebas claras de que al menos un buen número de los elementos de los bosques mexicanos de *Abies* tuvo su origen a partir de biota que arribó por el lado norte, probablemente en épocas en que el clima favorecía su expansión y migración.

Las divergencias más sobresalientes entre los bosques de *Abies* de México y los de las altitudes superiores residen en las condiciones climáticas.

La consecuencia más notable de esta disparidad climática es la que se manifiesta a través del comportamiento de la comunidad, pues a diferencia de lo que sucede más al norte, donde durante muchos meses, toda la vida vegetal se mantiene latente debido a las bajas temperaturas y a la nieve, en México el bosque de *Abies* prácticamente no interrumpe sus actividades de fotosíntesis, absorción y transpiración, si acaso sufre una disminución durante los periodos más fríos y más secos del año. Siempre o casi siempre hay verdor en los niveles inferiores de la comunidad y el periodo de floración de muchas especies corresponde precisamente a los meses de diciembre, enero y febrero.

La distribución geográfica de los bosques de *Abies* en México es dispersa y localizada. En la mayor parte de los casos se presenta en forma de manchones aislados, muchas veces restringidos a un cerro, a una ladera o a una cañada. Las áreas continuas de mayor extensión se presentan en las serranías que circundan al Valle de México y les siguen en importancia las correspondientes a otras montañas sobresalientes del Eje Volcánico Transversal, como por ejemplo, el Pico de Orizaba, el Cofre de Perote, el Nevado de Toluca, el Tacíntaro, el Nevado de Colima y algunas otras más (Rzedowski, 1983).

En México, este tipo de vegetación está prácticamente confinado a sitios de alta montaña, por lo común entre 2 400 y 3 600 m de altitud. De la zona de Coapilla y Tapalapa, Chiapas, hay bosques de *Abies* a 1700 m y en las sierras costeras de Jalisco estos pueden descender hasta elevaciones de 1500 m, los abetos no alcanzan el límite altitudinal de la vegetación arbórea y generalmente forman un piso por debajo del pinar superior (Bosque de *Pinus hartwegii*).

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Abies religiosa es un árbol grueso, hasta de 40 (60) m de alto ; hojas alternas, de glaucas en el envés; conos masculinos oblongos, de 12 a 14 mm de largo por 5 mm de ancho, de color violáceo, al principio pretejidas por mucha resina; inflorescencias femeninas en forma de conillos subcilíndricos, de 7 cm, de largo con las brácteas rojizas de margen rasgado, los conos maduros son cilíndricos-oblongos, de 16 a 18 cm, color castaño brillante, el ala mide 22 a 25 mm de largo por 10 a 15 mm de ancho (Figura 2)(Rzedowski y Calderon, 2001).

Le fue aplicado el nombre de religiosa porque sus ramillas eran y son preferidas por los indígenas para adorno en algunas ceremonias religiosas. En la capital las puntas de las ramas se usan como árbol de Navidad, pero este uso está ahora muy restringido. Su nombre vulgar es oyamel, pero también le dicen pinabete en Michoacán y Jalisco. El nombre en náhuatl es Acxoyatl.



Fig. 2 *Abies religiosa*.

COMPOSICIÓN QUÍMICA

La madera es blanca, ligera y poco durable, y se emplea para hacer tejamaniles, viguetas, jirones, etcétera, y principalmente para la fabricación de papel. La trementina de los troncos jóvenes, llamada aceite de abeto, trementina de oyamel o aceite de palo, es viscosa, acre y aromática, semitransparente, parecida a la trementina de Venecia y se emplea en medicina como balsámico y en la fabricación de barnices. Según la Farmacopea Mexicana contiene ácido abiótico, ácido succínico, una sustancia particular llamada abietina.

PROPIEDADES MEDICINALES

Algunas especies de abetos reportada con propiedades medicinales son *Abies alba* Millar este abeto es originario de Europa Central y Meridional. Contiene resina y aceites esenciales que forman parte de la esencia de trementina que es una de las principales sustancias medicinales que presenta el abeto, en especial por vía externa como antiálgico y rubefaciente. Por vía externa es expectorante (Alonso, 2004); también se le reporta para aliviar bronquitis, asma, enfisemas, rinofaringitis, sinusitis y en general catarros bronquiales. También en infecciones urinarias como cistitis o pielonefritis (Pérez, 2001).

Algunas experiencias *in vitro* determinaron una acción bacteriostática y/o bactericida de las yemas del abeto debido a componentes de su aceite esencial. Dicha actividad también fue corroborada en *Picea abies* ó abeto rojo (Karting y col. 1991; Schales y col. 1993). La corteza también tiene acción antiséptica y astringente. Mediante la incisión en la madera se obtienen aceites de trementina y con la esencia se da aroma a productos de limpieza (Pérez, 2001).

CAPÍTULO

III

SENSIBILIDAD MICROBIANA

La susceptibilidad que diversos microorganismos presentan a la acción de los agentes antimicrobianos puede medirse *in vitro* utilizando los principios de difusión en agar. Resultados precisos pueden obtenerse con esta técnica siempre que todos los detalles y los procedimientos estén cuidadosamente estandarizados y controlados (Lennette, 1987)

Un agente antimicrobiano es activo contra los microorganismos y puede ser producido en forma natural por microorganismos o sintéticamente en el laboratorio, un agente quimioterápico ha sido empleado para referirse a agentes antimicrobianos sintéticos o no y también se refiere a agentes que actúan contra células humanas como inmunomoduladores y drogas antitumorales. Los términos agente antiviral y agente antifúngico son términos más específicos, incluidos dentro de la categoría más general de agentes antimicrobianos.

Ya que no se puede predecir la susceptibilidad de las bacterias, hongos y virus a los agentes antimicrobianos, con frecuencia es necesario estudiar la sensibilidad individual de cada patógeno a estas drogas, pudiéndose elegir entonces el agente apropiado (el más activo contra el patógeno, el menos tóxico para el huésped, con las características farmacológicas apropiadas y el más económico), que proporciona mayores posibilidades de una evolución favorable.

Un concepto importante sobre el que es necesario insistir es que no se pueden realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* con cultivos mixtos, sólo los cultivos puros proporcionarán resultados válidos sobre la eficacia de un agente antimicrobiano (Danival, 2003).

El principio de las pruebas de dilución es determinar la concentración más baja o mínima del agente antimicrobiano requerido para inhibir el crecimiento del microorganismo (Mendel y col. 1997).

ANTIBIOGRAMAS

El antibiograma es un método de laboratorio que sirve para determinar *in vitro* la susceptibilidad de una bacteria a los distintos agentes antimicrobianos (Tay, 1994). El primer objetivo del antibiograma es el de medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antimicrobianos. En efecto, la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico.

El antibiograma sirve, en primer lugar, para orientar las decisiones terapéuticas individuales. El segundo objetivo del antibiograma es seguir la evolución de las resistencias bacterianas. Gracias a este seguimiento epidemiológico, a escala de un servicio, un centro de atención médica, una región o un país, es como puede adaptarse la antibioterapia empírica, revisar regularmente los espectros clínicos de los antimicrobianos y adoptar ciertas decisiones sanitarias, como el establecimiento de programas de prevención en los hospitales (Danival, 2003).

En muchas infecciones, los resultados de las pruebas de sensibilidad son importantes en la elección del antibiótico. Es común reportar los resultados como la Concentración Inhibidora Mínima (CIM), (Levinson y Jawetz, 1992). La CIM se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. Es el valor fundamental de referencia que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas (Danival, 1993).

Los diámetros de zona de inhibición se interpretan como susceptibilidad significativa, susceptibilidad intermedia o resistencia a cada agente antimicrobiano investigado (NCCLS, 1993).

TÉCNICA DE DIFUSIÓN CON DISCOS

La técnica de difusión con discos recomendada actualmente por la *U. S. Food and Drugs Administration* y por el *Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1984), es una modificación de la descrita por Bauer y colaboradores, (Bauer y col. 1966)

Este método fue modificado en 1947, incorporando el agente antimicrobiano a discos de papel filtro. En 1966, después de los estudios realizados por Bauer, Kirby, Sherris y Turk, ensayando diferentes cepas bacterianas, el empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad fue estandarizado y correlacionado definitivamente con las CMI correspondientes (Danival, 2003). El método de difusión en disco se ha estandarizado con agar Mueller-Hinton. El medios sin suplementos favorece el crecimiento de casi todos los microorganismos para los que son más importantes las pruebas de susceptibilidad (Lennette, 1987).

TÉCNICA DE KIRBY-BAUER

Con el objeto de investigar las determinaciones de susceptibilidad a los antimicrobianos, se formó un comité de la Organización Mundial de la Salud cuyas deliberaciones proporcionaron los principios fundamentales que condujeron al desarrollo de las técnicas estándares de Anderson primero y de Kirby-Bauer después. Los diversos pasos estandarizados que se han incorporado a la técnica de Kirby-Bauer utilizan una escala turbidimétrica, en la que se numeran según la concentración de microorganismos que se requiera, varios tubos, el tubo número 1 se utiliza como patrón de referencia, e inóculo se ajusta al patrón de referencia por medio de comparación visual aproximada, o por espectrofotometría haciendo coincidir la absorbancia.

La escala utilizada y aceptada mundialmente es la de McFarland (cuadro No. 1) en la que se origina una turbidez debida a la reacción de ácido sulfúrico con cloruro bórico que forma un precipitado blanco de sulfato bórico (González, 1997; Koneman, 1988).

TÉCNICA DE BARRY

El microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar (Mueller-Hinton para bacterias y Agar dextrosa Sabouraud para hongos) previamente fundido a una temperatura de 45 a 50 °C. En un tubo, se adiciona el inóculo y se homogeneiza la muestra. Una vez constituida la muestra se vierte esta en la caja de Petri estéril y se deja solidificar, sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos. Se incuban las placas durante 16-24 horas a 35° C y al cabo de este tiempo se estudia el crecimiento del microorganismo. Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco. Con esta referencia podemos informar si el microorganismo es Sensible o Resistente a cada uno de los antimicrobianos ensayados en las placas (Figura 3).

Si el microorganismo estudiado es sensible, en torno al disco se observará un halo, en el cual no hay proliferación de bacterias. Si el microorganismo es resistente al antibiótico, crecerá uniformemente y no habrá ningún halo de inhibición en torno al disco de papel (Danival, 2003).

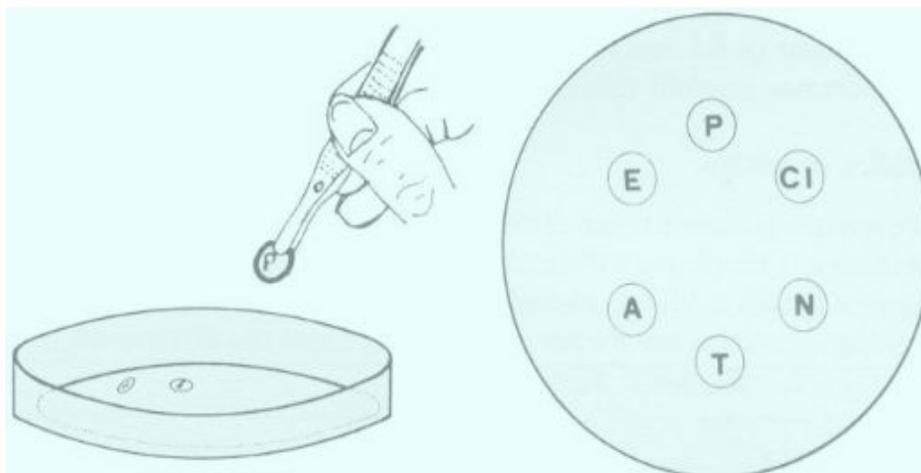


Fig. 3 Colocación de los sensidiscos en el medio de cultivo impregnados del antimicrobiano (Danival, 2003).

Una vez sembrada una placa de un medio de cultivo adecuado y colocados los distintos discos impregnados de antimicrobiano y una vez colocada a incubación en la estufa durante unas horas, se procede a la lectura de los resultados, que se puede hacer a intervalos periódicos, basada en la medición del halo de inhibición (Danival, 2003).

CAPÍTULO

IV

MICROORGANISMOS

PATÓGENOS

MICROORGANISMOS PATÓGENOS DEL HOMBRE

Durante los muchos milenios de evolución, los seres humanos han desarrollado una relación íntima y compleja con el mundo de los microorganismos. Desde el nacimiento hasta la muerte, el cuerpo es habitado por cientos de especies de bacterias y de hongos. Algunos hacen del cuerpo humano su hábitat permanente, otros residen en él solo temporalmente, aunque sean inocuos. En la mayoría de las personas sanas existen diez veces más células microbianas que células humanas. De hecho la buena salud se debe, en parte, a la relación con algunos microorganismos.

Todos nosotros tenemos un conocimiento intuitivo de lo que es la salud, pero la salud es un estado de equilibrio relativo, en el cual los diversos sistemas de órganos funcionan de manera adecuada. La salud es la condición estable en la que nos encontramos la mayor parte del tiempo. La enfermedad es un estado de equilibrio funcional que puede llevar a una recuperación o la muerte.

Los microorganismos que mantienen esta condición estable con los seres humanos constituyen la biota normal. Estos microorganismos crecen y se multiplican debido a que están adaptados a vivir en el cuerpo humano. En la mayoría de los casos no causan enfermedades. Las superficies corporales externas que poseen una biota normal de microorganismo, incluyen la piel y la cubierta externa del ojo. La biota normal las superficies internas de la nariz, la boca, el tracto intestinal, la vagina y la uretra: los microorganismos que se encuentran en cualquier otro tejido del cuerpo, como el cerebro, el corazón, el músculo o el hueso, no forman parte de la biota normal y pueden provocar enfermedades (Ingraham y col. 1998).

Las infecciones del ser humano son producidas por una gran variedad de organismos. Los microorganismos de importancia médica se encuentran reunidos en cinco grupos: 1) rickettsias y clamidas, 2) virus, 3) protozoarios, 4) hongos y 5) bacterias (Duerden y col. 1993).

GRUPOS PATÓGENOS

A continuación se citan algunas características de los patógenos que se pondrán a prueba frente a los principios activos de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*

BACTERIAS

❖ *Corynebacterium xerosis*

Forman pequeñas colonias. Pueden ser aerobios o anaerobios facultativos. Son comunes en suelo y agua y residen en piel y mucosa. No forma endosporas, su reproducción es por división.

❖ *Enterococcus faecalis*

Son anaerobios facultativos, fermentan la glucosa y transforman los nitratos a nitritos. Se encuentra en la flora oral, el intestino grueso, vías urinarias.

❖ *Escherichia coli*

Forman colonias grandes de 1-2 mm en 24 h. Son anaerobios facultativos. A pesar de que es miembro de la flora normal y no es muy patógena, tiene gran importancia médica por la frecuencia y la naturaleza grave de las infecciones que provoca. El organismo vive en el colon sin provocar trastorno manifiesto. Sin embargo, dada su presencia en las heces con frecuencia alcanza y afecta otras áreas del cuerpo, en especial vías urinarias y peritoneo (Myrvik y Weiser, 1991).

❖ *Staphylococcus aureus*

Produce colonias “enanas”. Pueden envenenar los alimentos almacenados con enterotoxinas causa infecciones en cualquier sitio del organismo.

Los *Staphylococcus* crecen aeróbicamente en la superficie de la piel y anaeróbicamente en los poros exentos de aire. Pueden soportar las condiciones severas de la piel, incluida la baja humedad, la alta salinidad y las temperaturas extremas. De cualquier forma, se encuentran abundantemente en áreas con una relativa humedad, como es la zona bajo los brazos, alrededor de la nariz y en la cercanía del ano (Ingraham y col. 1998).

La mayor parte de los trabajadores de hospitales tienen una abundante microbiota transeúnte, debido a que están expuestos diariamente a un elevado número de patógenos. En particular, suelen tener *Staphylococcus aureus* patógenos. Estos patógenos son inocuos a menos que sean transferidos a un paciente cuya resistencia este disminuida debido a una enfermedad o a una herida abierta (Ingraham y col. 1998).

❖ *Streptococcus*

Los *Streptococcus* forman una amplia gama de especies de cocos grampositivos que suelen disponerse en cadenas o parejas (Murray y col. 1992):

- *Streptococcus β-hemolítico*

Se desarrollan en la superficie del agar y forman colonias en cadenas largas. Son habitantes normales de la mucosa oral, respiratorias y gastrointestinales.

- *Streptococcus mutans*

Aerobios y anaerobios facultativos. Desarrolla colonias pequeñas. Pueden causar fiebre, faringitis, participa en la formación de la patogenia de la caries dental.

❖ *Mycobacterium phlei*

Se encuentra en el heno, pasto, suelo y polvo. Anaerobios, son cepas saprofitas que elaboran *micobactina*, son acidorresistentes. Se encuentra en casi todos los tejidos y órganos.

ASPECTOS GENERALES DE LOS HONGOS

Los hongos constituyen un complejo grupo de organismos, tan grande que se calcula entre 100 a 300 000 especies; viven en los medios más variados y solo 100 son necesariamente patógenos para mamíferos, pero también hay patógenos de vegetales, insectos (entomógenos) o de otros hongos (microparásitos), unos pocos cientos de hongos son oportunistas (Arenas, 2003).

La mayoría de los hongos patógenos no están restringidos al huésped en su crecimiento porque su hábitat primario es el suelo; son meramente invasores oportunistas de individuos con una resistencia disminuida a la infección. Las enfermedades fúngicas del hombre, denominadas micosis, pueden dividirse en dos grupos principales:

- 1) Micosis sistémicas o generalizadas, en las que el patógeno está muy diseminado, desarrollándose en varios órganos y tejidos.
- 2) Micosis superficiales, que comprenden infecciones de la piel, pelo y uñas. (Brock, 1978).

A continuación se citan algunas características de los patógenos que se utilizaron para probar los principios activos de *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii*:

Candidiasis

Micosis primaria o secundaria ocasionada por levaduras endógenas y oportunistas del género *Candida*, especialmente *C. albicans*. Las manifestaciones clínicas son localizadas diseminadas o sistémicas; pueden afectar piel, mucosas, estructuras profundas y órganos internos. Las alteraciones histopatológicas varían desde inflamación mínima hasta supuración o granuloma. La evolución es aguda, subaguda o crónica (Arenas, 2003).

❖ *Candida albicans*

Son levaduras, las clamidosporas pueden ser numerosas, individuales o en cúmulos. Forman pseudo-hifas. Son oportunistas, produce candidiasis cutánea e invasión sistémica.

❖ *Candida stellotoidea*

Levaduras oportunistas, produce candidiasis cutánea e invasión sistémica.

❖ *Candida tropicalis*

Son levaduras, presentan blastoconidios, individuales o en pequeños cúmulos, presenta pseudohifas, sin clamidosporas. Son oportunistas, produce candidiasis cutánea e invasión sistémica y endocarditis.

❖ *Candida krusei*

Son levaduras, produce hifas con blastoconidios oportunistas, produce candidiasis cutánea e invasión sistémica.

❖ *Cryptococcus neoformans*

Es una levadura, se encuentra principalmente en las excretas de las aves como las palomas. Provoca meningitis criptocócica muy a menudo afecta a personas inmunosuprimidas. Micosis oportunista causado por una levadura encapsulada: *Cryptococcus neoformans*, de origen exógeno; se adquiere por vía respiratoria y es pulmonar en un 90%; puede afectar cualquier visera, músculo, hueso, piel y mucosas, pero tiene afinidad particular por el sistema nervioso central. La evolución es aguda, subaguda o crónica. La diseminación ocurre en personas debilitadas o con inmunodeficiencia (Arenas, 2003).

❖ ***Geotrichum sp.***

Produce la geotricosis que es una enfermedad por lo regular crónica y poco frecuente, es un habitante micótico común de la parte superior del aparato respiratorio.

CAPÍTULO

V

HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Dados los conocimientos que se tienen acerca de los usos medicinales de diversas especies de pinos y abetos, tales como *Pinus silvestris*, *Pinus caribae* y *Abies alba* a los cuales se les atribuyen efectos antisépticos, astringentes, antifúngicos y diuréticos (entre otras propiedades); se espera que *Abies religiosa* y *Pinus hartwegii*; presenten efecto antibacteriano y antifúngico frente a siete tipos de bacterias y seis especies de hongos patógenos al hombre, y se espera que este efecto sea más marcado en las hojas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano y antifúngico de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*, del Parque Nacional Izta-Popo, sobre seis especies de hongos patógenos y siete tipos de bacterias.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener los extractos de hoja, rama y corteza de *Pinus hartwegii*. y *Abies religiosa*, así como determinar su rendimiento en peso seco.
- Probar el efecto inhibitorio del principio activo de *Pinus hartwegii* , y *Abies religiosa* , en las concentraciones de 30, 60, 90, 120, 150 y 200 mg·mL⁻¹ en los siguientes organismos patógenos:

BACTERIAS

Corynebacterium xerosis
Mycobacterium phlei
Streptococcus mutans
Streptococcus β- hemolítico
Enterococcus faecalis
Escherichia coli
Staphylococcus aureus

HONGOS

Candida albicans
Candida krusei
Candida estellatoidea
Candida tropicalis
Cryptococcus neoformans
Geotrichum sp

- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) requerida para inhibir el crecimiento de los hongos y bacterias.
- Evaluar los parámetros físicos y químicos del suelo donde crecen los pinos y abetos bajo estudio, como son: pH, contenido de materia orgánica, textura, color, densidad aparente y real.

CAPÍTULO

VI

FASE DE CAMPO

SITIOS DE MUESTREO

Localizado en los límites de los estados de México, Puebla y Morelos, el Parque Nacional Izta-Popo queda comprendido dentro del macizo montañoso denominado Sierra Nevada. Forma parte de la provincia fisiográfica conocida como Sistema o Eje Volcánico. Presenta importantes elevaciones entre las cuales se destacan el Iztaccíhuatl y el Popocatepetl, con alturas máximas de 5,280 m y 5,482

mrespectivamente, constituyen dos de las cumbres más elevadas del país. La conservación de la cubierta vegetal (predominante la integran los bosques de coníferas y encinos que contienen una gran cantidad endemismos) y el sustrato edáfico es de importancia trascendental para regular la infiltración de agua al subsuelo y la intensidad de los escurrimientos (CONANP, 2004).

Se realizaron tres visitas mensuales al Parque Nacional Izta-Popo durante un período comprendido entre septiembre – noviembre del 2004.

El sitio de muestreo se ubica geográficamente entre las coordenadas 19° 05' 04" de latitud norte y 98° 37' 8.15" de longitud oeste, a una altitud de 3700 m *Pinus hartwegii* y en cuanto a *Abies religiosa* las coordenadas son 19° 05' 8" latitud norte y 98° 40' 8 " de longitud oeste a una altitud de 3373 msnm (Figura 4).

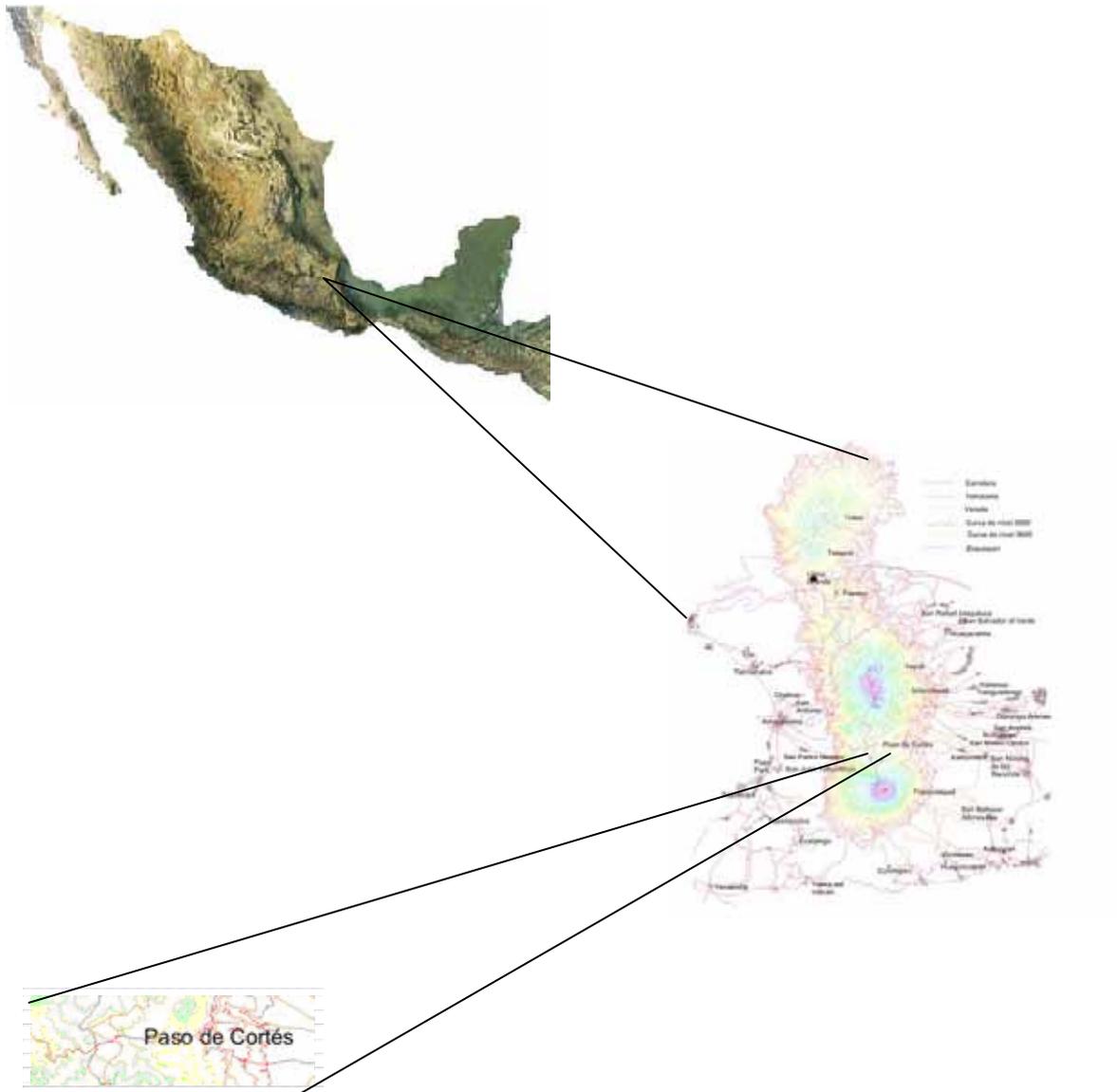


Fig. 4 Sitio de muestreo

RECOLECTA DE MATERIAL VEGETAL

Para llevar a cabo la recolecta del material vegetal se consideraron la fecha, las condiciones meteorológicas y la hora del día con el fin de evitar que se pudriera el tejido que se eligió para el estudio. Se escogió un día seco, (donde no llovió el día anterior y mucho mejor si no ha llovido durante muchos días antes), pues en ausencia de agua los principios activos se encuentran mucho más concentrados, con preferencia durante la mañana o al atardecer.

Se seleccionaron los árboles de más de tres años. El muestreo se llevó a cabo en cinco ejemplares de tamaño mediano, las muestras se tomaron de la parte media en los cuatro puntos cardinales, se colectaron hojas ramas y corteza las cuales se guardaron en bolsas de papel de estraza para evitar la formación de humedad que propicia la actividad de microorganismos que producen la pudrición, una bolsa distinta para cada especie y cada estructura (Forés, 1997).

MUESTREO DE SUELO

El ambiente donde crecen las plantas ejerce influencia en la cantidad y calidad del principio activo, por ello es necesario conocer las características generales donde crecen estos árboles por lo tanto se recolectaron muestras de suelo en 12 sitios distintos, distribuidos en zig zag, considerando una profundidad de 0-20 cm, cada suministro tuvo un peso de 1 K, con el total de suministro se formó una muestra compuesta de la cual se tomaron dos kilogramos que fueron transportados al laboratorio en una bolsa de plástico.

CAPÍTULO

VII

FASE DE LABORATORIO

DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO

Se determinaron las propiedades físicas y químicas de acuerdo a los siguientes métodos:

- ❖ Propiedades físicas: Chapman y Prat., 1988
 - Color : comparación con tablas Munsell
 - Textura: Método de Bouyocus
 - Densidades real y aparente: Método de probeta y picnómetro
 - Humedad: Método gravimétrico
- ❖ Propiedades químicas: Jackson y Beltrán, 1964; Chapman y Prat, 1988
 - Determinación de la concentración de materia orgánica : Walkley and Black
 - pH : potenciómetro

PROCESO DE EXTRACCIÓN DE LOS PRINCIPIOS ACTIVOS

Para ambas especies se secó el material vegetal a temperatura ambiente por un periodo de 7-10 días; una vez pasado este tiempo se separaron las estructuras (hoja, rama y corteza), pesando por separado cada una de ellas; posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio 1:100 para desinfectar el material vegetal (Sincholle y col. 1987; Alfaro y col. 2000).

Para finalizar, las muestras vegetales se sometieron a un proceso de extracción de la mezcla cruda de principios activos, empleando una maceración alcohólica (método Galénico) utilizando alcohol etílico al 96% (el necesario para cubrir por completo las muestras) (Domínguez, 1992) en frascos de color ámbar, durante 15 días; procurando homogenizar constantemente la solución. La cantidad de alcohol empleado para la extracción dependió del peso y la masa del material vegetal.

Una vez transcurrido el tiempo requerido se filtró la solución (tintura) y se midió la cantidad obtenida de esta, para volver a almacenarla en frascos de color ámbar.

PESO SECO DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

Se obtuvo el extracto seco de las estructuras por medio de una destilación *in vacuo* de las tinturas previamente obtenidas, haciendo uso de un rota-vapor con un baño maría que no excedió los 50° C de temperatura (Richard, 2002) y con una presión de vacío de 4 a 10 bar. Los sustratos obtenidos se almacenaron de nuevo en recipientes estériles y color ámbar.

PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES

Se fraccionó cada extracto en seis dosis por estructura vegetal, diluyendo el extracto seco en alcohol al 96% en concentraciones de 30 mg mL⁻¹, 60 mg mL⁻¹, 90 mg mL⁻¹, 120 mg mL⁻¹, 150 mg mL⁻¹ y 200 mg mL⁻¹.

IMPREGNACIÓN DE LOS SENSIDISCOS

A la par se elaboraron sensidiscos de 6 mm de diámetro (Collins y Lyne, 1989), con papel filtro No. 41, los cuales se esterilizaron en autoclave; posteriormente se impregnaron con las concentraciones anteriormente realizadas.

CEPAS DE MICROORGANISMOS

Todas las cepas de microorganismos, tanto hongos como bacterias, se obtuvieron del banco de cepas del laboratorio de microbiología general de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (Campus I), de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ESTANDARIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL INÓCULO

Se realizó una estandarización del inóculo microbiológico mediante el método de Kirby-Bauer y hasta alcanzar una densidad del estándar del tubo número uno de la escala de McFarland (Cuadro 1), (Finegold y Martín, 1983), la densidad de la población de bacterias es aproximadamente de 10^6 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro (Koneman y col. 1992).

No. De tubo	BaCl ₂ 1.0% MI	H ₂ SO ₄ 1.0% MI	No. aprox. De bacterias representadas X10 ⁶ /mL
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1,200
5	0.5	9.5	1,500
6	0.6	9.4	1,800
7	0.7	9.3	2,100
8	0.8	9.2	2,400
9	0.9	9.1	2,700
10	1.0	9.0	3,000

Cuadro 1. Escala de McFarland (Montiel y Guzmán, 1997)

Se inocularon los microorganismos, para cada una de las especies a estudiar, haciendo uso del método de Kirby-Bauer y la técnica de Barry (para el cultivo de bacterias se utilizó el Agar Mueller-Hinton y para los hongos el Agar dextrosa Sabuoraud) en cajas petri, se tomó como referencia el tubo número uno de la escala de McFarland, a la par se colocaron dos testigos: uno con el papel filtro seco y otro impregnado con alcohol etílico al 96 %. (Danival, 2003).

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

Se evaluó el efecto inhibitorio de los extractos con cada una de las concentraciones elaboradas con anterioridad, aplicando una prueba de sensibilidad por medio del Método de Difusión de Agar, para lo cual se efectuaron series de ocho repeticiones por ensayo (Allen y Baker, 1976; Cacho, 1997). Se colocaron en cada caja los sensidiscos ya impregnados con las diferentes concentraciones, colocados en dirección de las manecillas del reloj, para después incubarlos a 35-37 °C durante 18 h para bacterias y 48 h para los hongos. Se incluyó un testigo y un blanco negativo impregnado solo con alcohol al 96%.

Transcurrido el tiempo requerido se midieron los halos de inhibición (no se incluyó el área del sensidisco), hasta entonces se pudo observar en cual de las estructuras vegetales los extractos presentan los mayores efectos inhibitorios así como la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los microorganismos: hongos, *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida estellatoidea*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Geotrichum* sp, y las bacterias *Corynebacterium xerosis*, *Mycobacterium phlei*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus β- hemolítico*.

ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

Para concluir, se examinó la composición química de los extractos vegetales (bajo la técnica de la pastilla de bromuro) obteniendo para cada muestra un espectro con los grupos funcionales que la componen utilizando el espectrofotómetro, el infrarrojo con transformados de Fourier, de la marca PERKIN ELMER, modelo 1600.

CAPÍTULO

VIII

FASE DE GABINETE

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A fin de obtener un panorama general de los resultados, los datos promedio se integraron en un cuadro a modo de resumen, a la par se obtuvieron los histogramas.

Los resultados se examinaron mediante un análisis de varianza de dos factores: estructura y concentración, en un diseño aleatorio de tipo factorial completo (Marques, 1988).

Los tratamientos en los cuales se dividieron cada una de los factores fueron los siguientes:

A: ESTRUCTURA

HOJA
RAMA
CORTEZA

B: CONCENTRACIÓN

30 mg mL⁻¹
60 mg mL⁻¹
90 mg mL⁻¹
120 mg mL⁻¹
150 mg mL⁻¹
200 mg mL⁻¹

Una vez conocida la diferencia estadística entre resultados, mediante un análisis de varianza, se aplicó una prueba de diferencia significativa mínima de Tukey, a fin de conocer cual de los pares de medias causaba la diferencia. Esta prueba se aplicó para ambos factores (estructura y concentración).

El nivel de confianza aplicado fue del 95% con un alfa $\alpha = 0.5$ con lo cual el margen de error se minimiza.

CAPÍTULO

IX

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pinus hartwegii

RENDIMIENTO

En este apartado se analizan los resultados emanados de los análisis elaborados para *Pinus hartwegii*.

En el cuadro número 2, se presenta la información del rendimiento en peso seco del principio activo obtenido de hoja, rama y corteza de *Pinus hartwegii* se encontró un mayor rendimiento en hoja con un 16%, seguido de la corteza con un 10.27% y por último la rama con un 8.58%. Esto permite conocer la cantidad de material vegetal a utilizar para obtener el principio activo que se requiere, así como conocer la dosificación adecuada para tener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y no tener posibles problemas de toxicidad.

ESTRUCTURA	PESO DE LA ESTRUCTURA (g)	PESO SECO DEL EXTRACTO (g)	RENDIMIENTO (%)
Hoja	287	46.02	16.0
Rama	480	41.20	8.5
corteza	461	47.37	10.2

Cuadro 2. Rendimiento de peso seco de *Pinus hartwegii*.

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO

En el cuadro 3 se encuentran los resultados del análisis de las propiedades físicas y químicas del suelo donde crece *Pinus hartwegii*. El pH indica que se trata de un suelo moderadamente ácido esto según la Norma Oficial Mexicana NOM-21-RECNAT-2000; esta acidez es conferida al suelo por la cantidad de materia orgánica es media alta (4.43%), (Siebe y col. 1996). Este grado de acidez esta relacionado con el origen volcánico del suelo, además de que la acumulación de materia orgánica la cual es mayor en condiciones ácidas que en condiciones neutras. El color oscuro que presenta está determinado, en gran parte, por la cantidad de ácidos húmicos y fúlvicos (Jackson y Beltrán, 1964). Según la literatura, esto indica que en esta clase de suelos, forma un complejo estable con alófono (FitzPatrick, 1985). La distribución de los tamaños de las partículas que lo constituyen nos indican que se trata de un suelo franco-arenoso. La densidad aparente (0.67 g/cc) de la muestra de suelo indica que es un suelo poroso, con lo cual se puede deducir una buena circulación de gases además de contribuir para que el crecimiento radicular de las plantas sea favorecido por el espacio poroso (Siebe y col. 1996). Dados los resultados de los análisis de suelo del cuadro se puede decir que se trata de un suelo de clase Andosol (FitzPatrick, 1985).

PROPIEDAD	RESULTADO
pH real	5.2
pH potencial	4.07
Materia orgánica	4.43 %
Color seco	10YR3/1(gris oscuro)
Color húmedo	10YR2/1(negro)
Clasificación textural	Franco-arenosa
• Porcentaje arena	65
• Porcentaje limo	20
• Porcentaje arcilla	15
Densidad real	2.08 g/cc
Densidad aparente	0.67 g/cc
Porcentaje de porosidad	67.78

Cuadro 3. Resultados de las propiedades físicas y químicas del suelo de *Pinus hartwegii*.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICAS

Los resultados de las pruebas de sensibilidad que se obtuvieron para evaluar si hay efecto antifúngico.

En el cuadro número cuatro se presentan los resultados de los antibiogramas que se obtuvieron al poner a prueba las seis cepas de hongos con hoja, rama y corteza y las seis concentraciones (30, 60, 90, 120, 150 y 200 mg mL⁻¹), se observa que no hubo respuesta positiva o formación de halos de inhibición en ninguna de las cepas de hongos probadas, se puede decir que el extracto de *Pinus hartwegii* no tiene efecto antimicótico.

MICROORGANISMOS	HOJA						RAMA						CORTEZA					
	30	60	90	120	150	200	30	60	90	120	150	200	30	60	90	120	150	200
<i>C. albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. stellatoidea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. neoformans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Geotrichum sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 4. Tamaño (mm) de los halos de inhibición para las cepas de hongos probadas en *Pinus hartwegii*.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANAS

A continuación se muestra el tamaño de los halos de inhibición que resultaron de las pruebas de sensibilidad obtenidas para demostrar si hay o no efecto antibacteriano (Cuadro 5).

A diferencia del efecto negativo que se obtuvo de las pruebas como antifúngico, aquí tenemos que sólo *Corynebacterium xerosis* es la bacterias que muestra una resistencia total a los principios activos de *Pinus hartwegii* ya que no hay respuesta con ninguna de las tres estructuras. Posteriormente se tiene a *Streptococcus mutans* que solo mostró efecto antibacteriano con hoja y rama y por último tenemos a *Staphylococcus aureus* que sólo mostró resistencia con los principios activos de rama y hoja.

Se tiene entonces, que la estructura más eficaz es la corteza ya que se obtuvieron los halos de inhibición de mayor tamaño, además de que los principios activos que contiene esta estructura inhibieron el crecimiento de la mayoría de las bacterias. Posteriormente se encuentra la hoja y por último la rama.

MICROORGANISMOS	HOJA						RAMA						CORTEZA					
	30	60	90	120	150	200	30	60	90	120	150	200	30	60	90	120	150	200
<i>C. xerosis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. phlei</i>	0	0	1.8	2	2.8	3.8	0	0	0	2	2.7	3.8	1.8	2.8	3.8	3.8	4.7	5.7
<i>S. mutans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.8	3.1	3.7	4.7
<i>E. coli</i>	0	1.2	1.6	2.7	3.2	4.8	0	1.6	3.2	3.5	4.5	5	1.2	1.7	2.6	2.7	4.7	5
<i>S. aureus</i>	0	0	1.2	1.8	2	2.8	0	0	0	0	0	0	2.2	3.6	4.2	4.2	4.7	5.2
<i>E. faecalis</i>	1.2	2.2	3.5	3.8	3.8	4.6	2.6	4.3	4.6	5.3	6.5	7.3	3	3.5	4.2	4.7	6.7	7.2
<i>S. β-hemolítico</i>	0	0	1.2	1.8	2.2	2.7	2.3	2.6	2.8	3	3.5	4.2	1.8	2.5	2.8	3.6	4.7	5.5

Cuadro 5. Tamaño (mm) de los halos de inhibición para las cepas de las bacterias probadas en *Pinus hartwegii*.

En la Figura 5 podemos observar el tamaño de los halos de inhibición para cada bacteria donde se obtuvo efecto inhibitorio, las cuales se pusieron a prueba con las seis concentraciones, para la estructura de hoja de pino.

En el gráfico podemos observar que hay respuesta inhibitoria para todas las cepas de bacterias pero no para todas las concentraciones; en primer lugar tenemos a *Enterococcus faecalis* es el único caso donde hay respuesta bajo todas las concentraciones y se hace evidente que el efecto como antibacteriano a 120 y 150 mg mL⁻¹ es muy similar; sin embargo estadísticamente si hay diferencia significativa (Apéndice 1.9). Posteriormente se encuentra *Escherichia coli* donde hay respuesta inhibitoria con cinco concentraciones y es notoria la diferencia en cuanto al tamaño de los halos de inhibición; por ultimo tenemos a *Streptococcus β-hemolítico* y *Staphylococcus aureus* donde se muestra que los halos de inhibición son de tamaños afines; por último esta *Mycobacterium phlei* donde sólo se obtuvo respuesta con cuatro concentraciones.

En cuanto a las CMI tenemos que para *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus β-hemolítico* es de 90 mg mL⁻¹; para *Escherichia coli* es de 60 mg mL⁻¹ y por ultimo *Enterococcus faecalis* tiene una concentración mínima inhibitoria de 30 mg mL⁻¹.

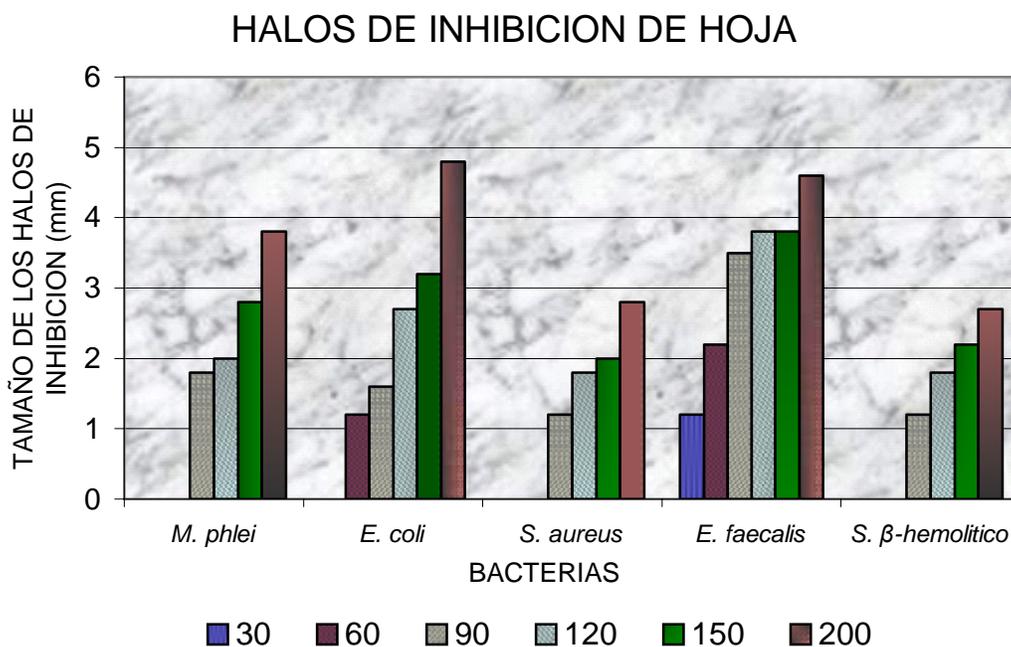


Fig. 5 Resultados promedio de los halos de inhibición (mm) con las seis concentraciones de *Pinus hartwegii* para las siete cepas de bacterias con hoja.

La Figura 6 muestra la respuesta inhibitoria de las siete cepas de bacterias con las seis concentraciones que se prepararon con los extractos de rama de *Pinus hartwegii*.

La gráfico muestra que hay respuesta inhibitoria para cuatro de las seis cepas de bacterias que se utilizaron, *Enterococcus faecalis* es la bacteria más sensible ya que aún cuando *Streptococcus β-hemolítico* también dio positivo para las seis concentraciones, los halos de inhibición son de menor tamaño que los de *Enterococcus faecalis*; posteriormente se encuentra *Escherichia coli* donde se observa respuesta para cinco concentraciones y por último esta *Mycobacterium phlei* donde solo se obtuvo respuesta con tres concentraciones.

La CMI para *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus β-hemolítico* es de 30 mg mL⁻¹ para *Escherichia coli* es de 60 mg mL⁻¹ y para *Mycobacterium phlei* es de 120 mg mL⁻¹

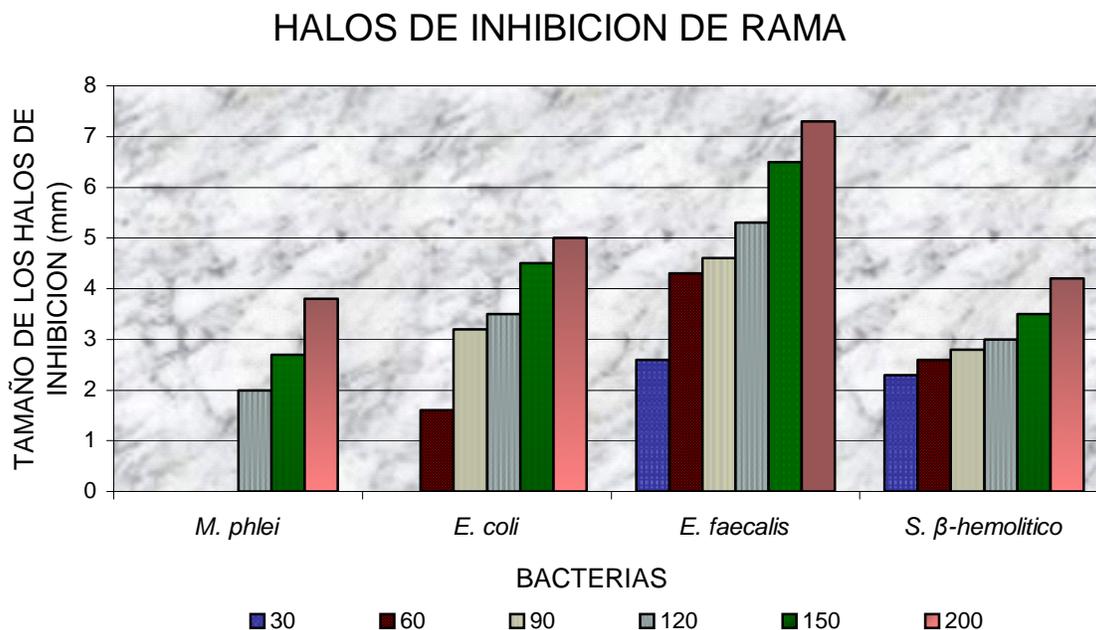


Fig. 6 Resultados promedio de los halos de inhibición (mm) con las seis concentraciones de *Pinus hartwegii* para las siete cepas de bacterias con rama.

La Figura 7 muestra el tamaño de los halos de inhibición que se obtuvieron como resultado de los antibiogramas realizados para cada bacteria en corteza.

A diferencia de los resultados obtenidos con la hoja y la rama, la corteza presenta un mayor efecto como antibacteriano ya que logro inhibir el crecimiento en seis de las siete cepas probadas.

La bacteria más sensible es de nuevo *Enterococcus faecalis* ya que tiene los halos de inhibición de mayor tamaño y , en este caso, se hace evidente que cuanto más se aumenta la concentración los halos incrementan su tamaño; sin embargo ese efecto no se muestra igual para *Staphylococcus aureus* donde las concentraciones de 90 y 120 mg mL⁻¹ muestran que el tamaño de los halos es muy similar; *Mycobacterium phlei* es la bacteria que sigue en cuanto a resistencia se refiere ya que presenta halos muy similares a 90 y 120 mg mL⁻¹ pero en esta ocasión los halos ya disminuyen en tamaño; *Streptococcus β-hemolítico* también muestra efecto inhibitorio pero esta vez ya se observa que los halos son todos de diferente tamaño, este decrece en comparación con el tamaño de los halos de las bacterias antes citadas; *Escherichia coli* es la ultima bacterias que muestra efecto como antibacteriano bajo todas las concentraciones pero los halos son los más pequeños; *Streptococcus mutans* tiene efecto solo con cuatro de las seis concentraciones y por lo tanto esto la hace ser la más resistente a los principios activos de corteza de *Pinus hartwegii*.

La CMI para *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus β-hemolítico* es de 30 mg mL⁻¹ y para *Streptococcus mutans* la CMI es de 90 mg mL⁻¹.

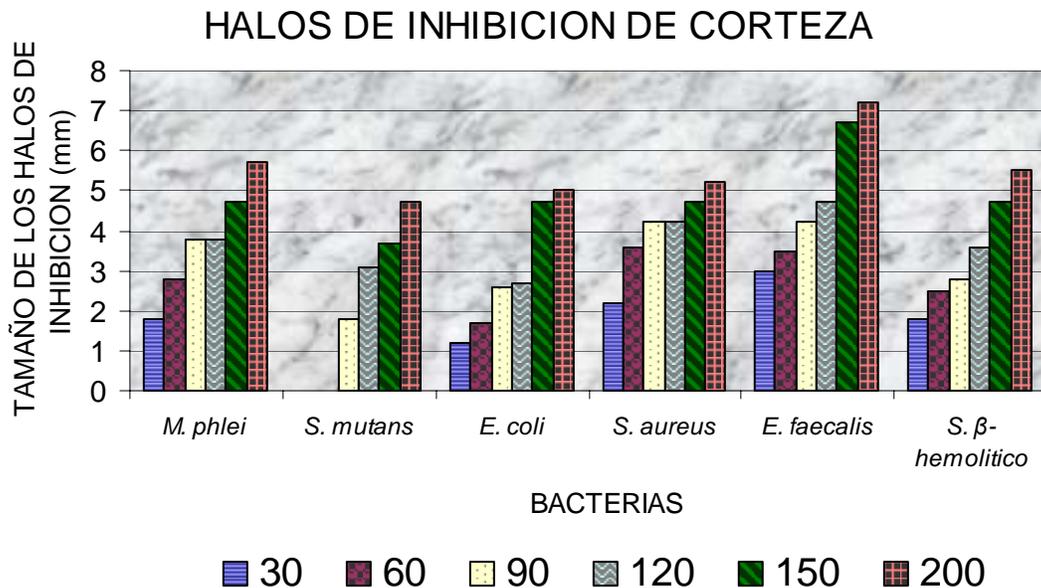


Fig. 7 Resultados promedio de los halos de inhibición (mm) con las seis concentraciones de *Pinus hartwegii* para las siete cepas de bacterias con corteza.

En la Figura 8 se observa el comportamiento de las tres estructuras de *Pinus hartwegii*. De manera general se observa las CMI para las tres estructuras de *Pinus hartwegii*.

El extracto de hoja no tiene respuesta inhibitoria con dos de las siete cepas de bacterias (*Corynebacterium xerosis* y *Streptococcus mutans*); en cuanto a las bacterias restantes la CMI para *Mycobacterium phlei*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus β-hemolítico* la CMI es de 90 mg mL⁻¹, para *Escherichia coli* la CMI es de 60 mg mL⁻¹ y por último la CMI para *Enterococcus faecalis* es de 30 mg mL⁻¹, esta última resulta ser la bacteria más sensible al extracto de hoja.

Los metabolitos secundarios de rama no tienen efecto inhibitorio frente a *Corynebacterium xerosis*, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*, mientras que para *Mycobacterium phlei* la CMI es de 120 mg mL⁻¹ para *Escherichia coli* es de 60 mg mL⁻¹ y las bacterias más sensibles son *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus β-hemolítico* ya que la CMI 30 mg·mL⁻¹.

Corynebacterium xerosis no tiene respuesta inhibitoria con el extracto de corteza sin embargo con *Streptococcus mutans* la CMI es de 90 mg mL⁻¹ y para *Mycobacterium phlei*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus β-hemolítico* la CMI es de 30 mg mL⁻¹.

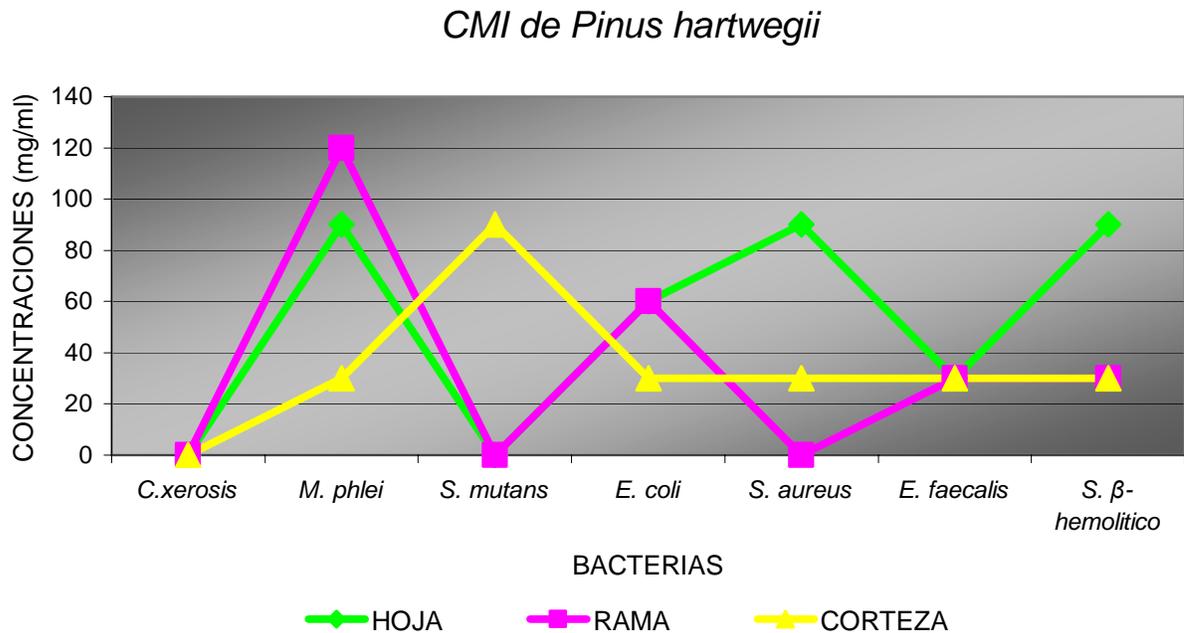


Fig. 8 Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de las tres estructuras frente a las cepas de bacterias que mostraron ser susceptibles a los principios activos de *Pinus hartwegii*.

La corteza resultó ser la estructura que tiene mayor efecto antibacteriano ya que inhibió el crecimiento de la mayoría de las cepas, le sigue en eficacia la hoja y por último la rama.

La bacteria más sensible es *Enterococcus faecalis* dado que presentó los halos más grandes y para las tres estructuras la CMI fue de $30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; la bacteria más resistente fue *Streptococcus mutans* ya que los principios activos de corteza fueron los únicos que lograron inhibir el crecimiento de esta cepa.

Estos grupos son: rama-corteza para *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus β -hemolítico* (Apéndice 1.6, 2.0 y 2.2); hoja-rama para *Mycobacterium phlei* y *Streptococcus mutans* (Apéndice 1.2 y 1.4) y para *Staphylococcus aureus* cada estructura proporciona resultados diferentes (Apéndice 1.2).

En cuanto a bacterias el análisis estadístico muestra que hay cuatro grupos homogéneos y solo hay diferencia estadística entre *Mycobacterium phlei*-*Streptococcus β -hemolítico*, *Mycobacterium phlei*-*Escherichia coli* y *Streptococcus β -hemolítico* -*Escherichia coli* (Apéndice 2.3).

ANÁLISIS DE LA ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO (IR)

Las plantas medicinales tienen una serie de metabolitos secundarios, muchos de ellos son propios y característicos de cada planta, uno de estos componentes son las sustancias químicas, que pueden ser orgánica e inorgánica; procedentes del metabolismo primario o secundario del vegetal. Se hallan contenidas en células y tejidos de la planta (Kuklinski, 2003).

Las siguientes figuras 9, 10 Y 11 representan los espectros infrarrojos de los extractos de hoja, rama y corteza respectivamente donde se muestra los grupos funcionales de los compuestos químicos que contiene el extracto analizado mediante la técnica de la pastilla de bromuro.

ESPECTRO IR DEL EXTRACTO DE HOJA

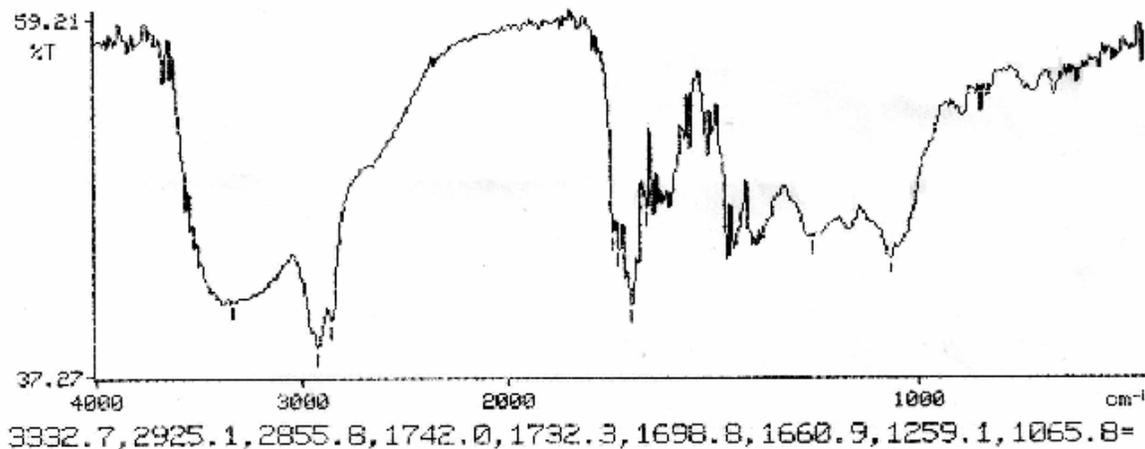


Fig. 9 Espectro infrarrojo del extracto de hoja

Según la longitud de onda registrada los grupos funcionales de dicho extracto es la siguiente:

- ♣ 3332.7 → alcohol, fenol, ácido de carbono(C-OH), polímeros, ácido carboxílico, amida
- ♣ 2925.1 → ácidos carboxílicos, NH₃⁺ (α -aminoácido), alcanos, grupos alquilo
- ♣ 2855.8 → ácidos carboxílicos, NH₃⁺ (α -aminoácido), alcanos, grupos alquilo
- ♣ 1732.3 → α-aminoácido, compuestos de carbonilo, aromáticos
- ♣ 17.32.3 → α-aminoácido, hidroclouros, compuestos de carbonilo, aromáticos
- ♣ 1698.8 → α -aminoácido, compuestos de carbonilo, aromáticos
- ♣ 1660.9 → α -aminoácido
- ♣ 1259.1 → amina sin valor práctico, aromáticos
- ♣ 1065.8 → compuestos con C, H, S (C=S), éter (C-O-C), =C-O-C

ESPECTRO IR DEL EXTRACTO DE RAMA

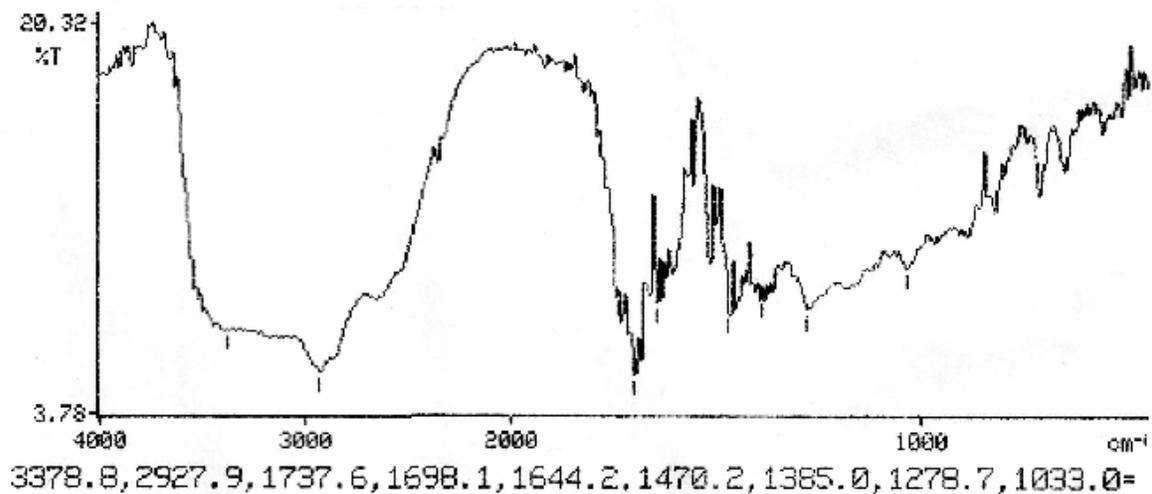


Fig. 10 Espectro infrarrojo del extracto de rama

Según la longitud de onda registrada la composición química de dicho extracto es la siguiente:

- ♣ 3378.8 → alcohol con puentes de hidrogeno, fenoles, amina N-H
- ♣ 2927.9 → ácidos carboxílicos-NH₃⁺ (α -aminoácido), alcanos, grupos alquilo
- ♣ 1737.6 → aromáticos (huella de benceno), cetona, α-halógeno, α,α,-dihalogenocetonas
- ♣ 1698.1 → aromáticos, aldehído α,β-insaturado
- ♣ 1644.2 → cetona(o amina) β-dicetonas enolizadas
- ♣ 1470.2 → alcohol, fenol, ácidos (C-OH), valor deformado
- ♣ 1385 → =CH (alqueno) sin valor práctico, compuestos nitro
- ♣ 1278.7 → aminas C-N
- ♣ 1033 → éter (C-OC) sin valor práctico, aminas C-N

ESPECTRO IR DEL EXTRACTO DE CORTEZA

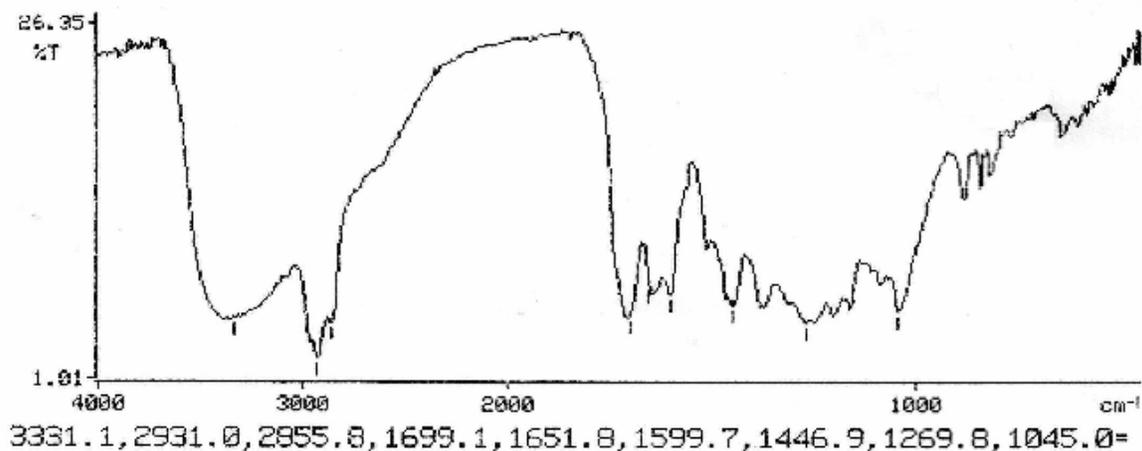


Fig. 11 Espectro infrarrojo del extracto de corteza

Según la longitud de onda registrada la composición química de dicho extracto es la siguiente:

- ♣3331.1 → aminas N-H, alcoholes con puentes de hidrogeno, fenoles
- ♣2931 → alcoholes, fenoles, ácidos carboxílicos
- ♣2855.8 → alcano
- ♣1699.6 → alqueno (C=C)
- ♣1651.8 → alqueno
- ♣1599.7 → alqueno
- ♣1446.9 → aromáticos
- ♣1269.8 → éter C-O-C
- ♣1045 → éter C-O-C y Ar-O-C

Los espectros de IR de los extractos de los tres estructuras de *Pinus hartwegii* Lindl indican la presencia grupos funcionales como los alcoholes, fenoles, aminas, ácidos carboxílicos, grupos aromáticos cetonas, oxígeno, ésteres, éteres, alquenos, alcanos y compuestos con azufre. Estos grupos funcionales pueden estar formando parte de metabolitos secundarios como las oleorresinas las cuales están constituidas por alcoholes aromáticos, alcoholes terpénicos, ésteres (Kuklinski, 2003), por otra parte los aceites esenciales por lo general tienen varios componentes químicos, usualmente derivados de de los terpenos o compuestos aromáticos contienen alcoholes, cetonas, aldehídos, esterres, ésteres de ácidos carboxílicos otro compuestos así como nitrógeno y azufre y fenoles; (Mulet, 1997; William, 1980); estos últimos son sustancias que en un anillo aromático llevan un grupo hidroxilo o un derivado funcional de este; los fenoles sencillos están formados por un anillo aromático que lleva uno o más grupos hidroxilo, los ácidos fenolcarbonados; los fenoles sencillos que llevan un grupo carboxilo como constituyente; los derivados del fenilpropano tiene un sistema aromático; los derivados del flavano son característicos por su esqueleto de flavano. Consta de un anillo aromático y un heterociclo intermedio que contiene oxígeno. Según el estado de oxidación de este heterósido se diferencian varios grupos derivados del flavano o flavonoides por ejemplo la flaona, flavonoles, antocianidinas y 3,4-diol-flavano, etc., todas estas sustancias están presente como glucosidos o esterres de azúcares, que son cedidos a las vacuolas (Hess, 1980). Las quinonas también pueden estar presentes dado que son compuestos aromáticos con dos grupos cetonas, son dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles (Kuklinski, 2003). Los alcaloides que según su biosíntesis influyen aminoácidos, cuyos grupos amino incorporan el N de los alcaloides (Bruneton, 1991).

Las oleorresinas frecuentemente se encuentran en la trementina de los pinos (Kuklinski, 2003), algunos de los cuales son utilizados como plantas medicinales tal es el caso de *Pinus sylvestris* que según los reportes de Saldierna en el 2000 también combate la bronquitis asma y dolores reumáticos; además la resina es también utilizada para combatir afecciones de la piel. También los extractos de *Pinus caribae* presentan actividad antifúngica frente a *Micosporum canis* y *Trycophitum rubrum* (Rivero y col. 1997). Los alcaloides poseen nitrógeno en su composición; todos contienen C, H y N algunos tienen oxígeno y pocos azufre (Kuklinski, 2003).

En cuanto al papel que desempeñan los metabolitos secundarios antes mencionados se reporta que de los fenoles se conoce muy poco del papel fisiológico y/o ecológico. Su interés terapéutico es limitado: algunos se utilizan tradicionalmente por sus propiedades que se conocen desde hace mucho tiempo, pero sin embargo no se han realizado ensayos muy escasos, para corroborar esas propiedades (Bruneton, 1991).

Abies religiosa

En el cuadro 6, se presenta el rendimiento en peso seco del principio activo obtenido de hoja, rama y corteza de *Abies religiosa* se encontró que las estructuras que presentan mayor rendimiento son hoja con un 4.43% y corteza con 4.45%, seguido de la rama con un 1.41% y. Esto nos permite conocer la cantidad de material vegetal a utilizar para obtener el principio activo que se requiere.

Este tipo de información es muy valiosa toda vez que sirve de base para conocer el rendimiento de los extractos que se obtendrán a partir de una cantidad determinada de material fresco, con ello se evitaría, en ensayos posteriores el desperdicio del mismo, así como conocer la dosificación adecuada para tener la concentración mínima inhibitoria y no tener posibles problemas de toxicidad.

Los porcentajes de rendimiento son muy bajos en *Abies religiosa* en comparación con *Pinus hartwegii*.

ESTRUCTURA	PESO DE LA ESTRUCTURA (g)	PESO SECO DEL EXTRACTO (g)	RENDIMIENTO (%)
Hoja	1400	62.03	4.4
Rama	1254	17.71	1.4
corteza	1145	51.03	4.4

Cuadro 6. Rendimiento de peso seco de *Abies religiosa*.

PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO

En el cuadro 7 se encuentran los resultados del análisis de las propiedades físicas y químicas del suelo donde crece *Abies religiosa*. El pH nos indica que se trata de un suelo ligeramente ácido, la cantidad de materia orgánica es media, encontrándose en 3.73% (Siebe *et al.*, 1996). El color oscuro que presenta está determinada, por la mezcla de sustancias húmicas, este grado de acidez esta relacionado con el origen volcánico del suelo (Jackson y Beltrán, 1964) Según la literatura, esto indica que en esta clase de suelos, aún que el material parece estar en un estado de descomposición bastante avanzado y formar un complejo estable con alófono (FitzPatrick, 1985). La distribución de los tamaños de las partículas que lo constituyen nos indican que se trata de un suelo franco-arenoso. La densidad aparente (0.72 g/cc) de la muestra de suelo nos indica que se trata de un suelo poroso, con lo cual se puede deducir una buena circulación de gases además de contribuir para que el crecimiento radical de las plantas sea favorecido por el espacio poroso (Siebe y col.1996).

PROPIEDAD	RESULTADO
pH real	6.01
pH potencial	5.36
Materia orgánica	3.73 %
Color seco	5YR 2.1/1(gris)
Color húmedo	7.5YR3/1(negro)
Clasificación textural	Franco-arenosa
• Porcentaje de arena	63
• Porcentaje de limo	22
• Porcentaje de arcilla	26
Densidad real	2.13 g/cc
Densidad aparente	0.72 g/cc
Porcentaje de porosidad	66.19

Cuadro 7. Resultados de las propiedades físicas y químicas donde crece *Abies religiosa*.

Con base en los resultados podemos decir que se trata de un andosol, la formación de estos suelos es un mediante un proceso muy rápido resultante de la gran área superficial de la ceniza volcánica que es el material parental. Los andosoles tienen reputación de ser muy infértiles bajo cultivo, pero responden bien al mejoramiento y pueden hacerse muy productivos. El fósforo es de gran importancia debido a que en estos suelos el alófono tiene una capacidad elevada

para adsorber y fijar el elemento, esta clase de suelos tiene una elevada capacidad para la retención del agua (FitzPatrick, 1985).

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIFÚNGICAS

A continuación se presentan los resultados de las pruebas de sensibilidad que se obtuvieron para corroborar si el extracto de las diferentes estructuras de *Abies religiosa* tienen efecto antifúngico y antibacteriano.

En el cuadro número ocho se muestran los resultados de los antibiogramas sobre las seis cepas de hongos al aplicar extractos provenientes de hoja, rama y corteza con seis concentraciones (30, 60, 90, 120, 150 y 200 mg mL⁻¹). Se observa que no hubo respuesta o formación de halos de inhibición en ninguna de las cepas de hongos probadas, por ello se pueden decir que el principio activo de *Abies religiosa* no tiene efecto antimicótico. Cabe señalar que este mismo fenómeno ocurrió con *Pinus hartwegii*.

MICROORGANISMOS	HOJA						RAMA						CORTEZA					
	30	60	90	120	150	200	30	60	90	120	150	200	30	60	90	120	150	200
<i>C. albicans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. stellatoidea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. tropicalis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. neoformans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Geotrichum sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cuadro 8. Tamaño (mm) de los halos de inhibición para las cepas de hongos probadas en *Abies religiosa*.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD ANTIBACTERIANAS

A continuación se muestran las medidas del tamaño de los halos de inhibición que resultaron de las pruebas de sensibilidad obtenidas para demostrar que *Abies religiosa* muestra efecto antibacteriano.

A diferencia del efecto negativo que se obtuvo de las pruebas como antifúngico, aquí se tiene que sólo *Corynebacterium xerosis* muestra cierto grado de resistencia a los principios activos de *Abies religiosa* ya que no hay respuesta con hoja. Posteriormente *Mycobacterium phlei* que mostró resistencia a las primeras tres concentraciones de hoja; *Streptococcus mutans* mostró ser susceptible a las últimas tres concentraciones de rama solamente.

De lo anterior se concluye que la estructura más eficaz es la corteza ya que se obtuvieron los halos de inhibición de mayor tamaño, además de que los principios activos que contiene esta estructura inhibieron el crecimiento de todas las cepas bacterianas, posteriormente se encuentra la rama y por último la hoja (Cuadro 9).

MICROORGANISMOS	HOJA						RAMA						CORTEZA					
	30	60	90	120	150	200	30	60	90	120	150	200	30	60	90	120	150	200
<i>C. xerosis</i>	0	0	0	0	0	0	1.8	2	2.2	2.3	3.1	5.7	2.1	3.1	4.6	4.2	5.6	7.6
<i>M. phlei</i>	0	0	0	1	1.1	1.8	1.2	1.8	2.5	2.3	2.7	3.3	1.6	1.8	2.2	3.1	3.7	4.2
<i>S. mutans</i>	1.1	1.8	2.2	3.2	3.7	4.7	0	0	0	1.1	1.2	1.8	3.1	5.2	6.7	6.8	7.8	9
<i>E. coli</i>	0	1.8	1.8	2.6	4.5	4.6	3	3.1	4.1	4.7	5	5.8	3.1	3.8	4.2	4.7	5.8	6.7
<i>S. aureus</i>	1.7	2.8	3.2	4.1	5.7	6.7	1.3	1.7	2	2.1	2.8	3.8	3.7	5.1	6.7	8	8.2	9
<i>E. faecalis</i>	1	1.8	2.8	3	3.5	5.1	1.8	2.7	3.1	4.7	5.7	8.1	2.2	4.1	5.7	6	6.7	7.7
<i>S. β-hemolítico</i>	1.1	1.7	2.1	2.8	3.7	4.8	3.6	4.2	4.3	5.1	5.7	6.8	1.8	2.2	2.7	3	4.1	6.8

Cuadro 9. Tamaño (mm) de los halos de inhibición para las cepas de bacterias probadas en *Abies religiosa*.

En la Figura 12 se observan los resultados de los tamaños de los halos de inhibición para cada bacteria donde se obtuvo efecto inhibitorio.

Es factible observar que hay respuesta inhibitoria para todas las cepas de bacterias y para la mayoría de las concentraciones; en primer lugar se tiene a *Staphylococcus aureus* como la bacteria más sensible ya que presenta los halos de mayor tamaño; *Enterococcus faecalis* también hay respuesta con todas las estructuras sin embargo los halos de inhibición son de menor tamaño; para *Streptococcus β-hemolítico* y *Streptococcus mutans* los halos son de tamaños muy parecidos, esto nos indica que su efecto como antimicrobiano puede ser muy similar; *Mycobacterium phlei* es la bacteria más resistente para esta estructura puesto que el efecto inhibitorio se hizo evidente hasta las últimas tres concentraciones (120, 150 y 200 mg·mL⁻¹) que son las más elevadas.

En cuanto a las CMI tenemos que para, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus β-hemolítico* y *Streptococcus mutans* es de 30 mg·mL⁻¹; para *Escherichia coli* es de 60 mg·mL⁻¹ y por ultimo *Mycobacterium phlei* tiene una concentración mínima inhibitoria de 120 mg·mL⁻¹.

HALOS DE INHIBICION DE HOJA

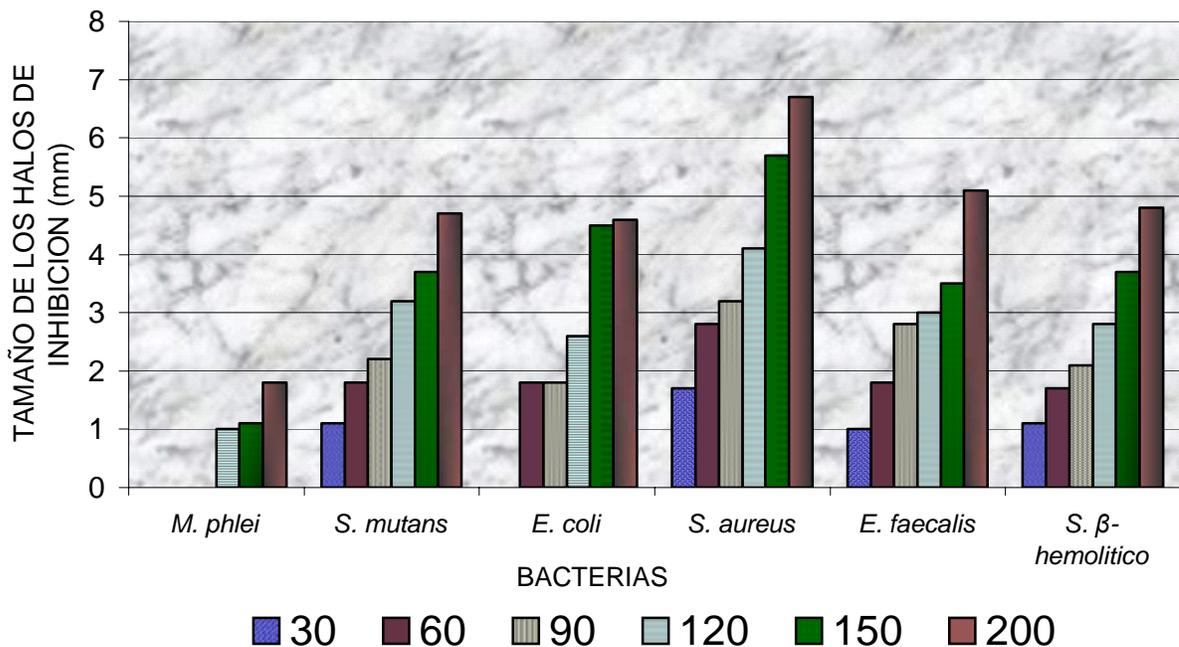


Fig. 12 Resultados promedio de los halos de inhibición (mm) con las seis concentraciones de *Abies religiosa* para las siete cepas de bacterias en hoja.

En la figura 13 se muestran los datos de los halos de inhibición para las siete cepas de bacterias con las seis concentraciones con los extractos de rama de *Abies religiosa*.

Los resultados indican que hay respuesta inhibitoria para las siete cepas de bacterias que se utilizaron. La bacteria más sensible fue *Streptococcus β-hemolítico* ya que aún cuando *Enterococcus faecalis* muestra halos más grandes en la última concentración *Streptococcus β-hemolítico* muestra halos de mayor tamaño desde los 30 mg mL⁻¹, también para *Escherichia coli* se observa el mismo fenómeno, a pesar de que la concentración aumento los halos van creciendo pero no de manera significativa, como sucede para *Corynebacterium xerosis*, *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium phlei* donde es evidente el aumento en el tamaño de los halos conforme aumenta la concentración; por último *Streptococcus mutans* resultó ser la bacteria más resistente ya que sólo tiene efecto antimicrobiano con las tres últimas concentraciones.

La CMI para *Corynebacterium xerosis*, *Mycobacterium phlei*, *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus β-hemolítico* es de 30 mg mL⁻¹ y para *Streptococcus mutans* es de 120 mg mL⁻¹.

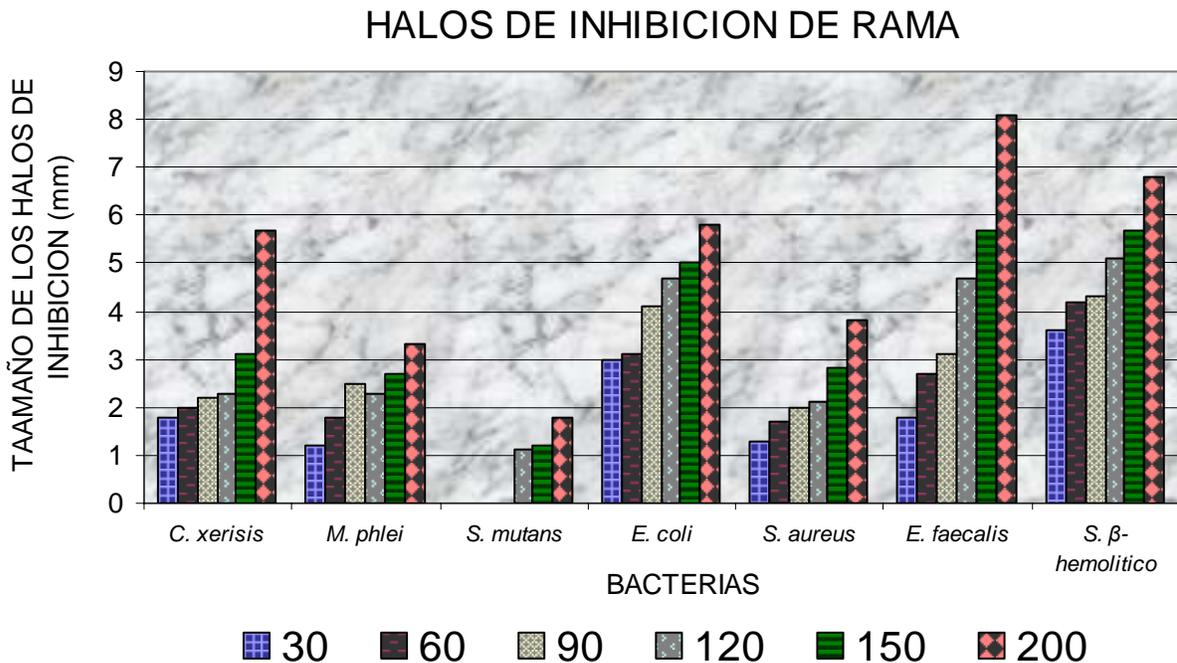


Fig. 13 Resultados promedio de los halos de inhibición (mm) con las seis concentraciones de *Abies religiosa* para las siete cepas de bacterias con rama.

A diferencia de los resultados obtenidos con la hoja y la rama, en la corteza existe un mayor grado de efecto como antibacteriano ya que logró inhibir el crecimiento de todas las cepas bacterianas.

La bacteria más sensible es *Staphylococcus aureus* ya que es donde se muestran los halos de inhibición de mayor tamaño a $30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pero el mismo efecto sucede con *Streptococcus mutans* sin embargo estadísticamente si hay diferencia significativa (Anexo 6) entre estas dos bacterias; *Corynebacterium xerosis* y *Escherichia coli* también coinciden en cuanto al tamaño de los halos de inhibición pero también hay diferencia significativa estadística (Anexo 6); para *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus β -hemolítico* los halos aunque de menor tamaño que los mostrados en las bacterias anteriores aún siguen siendo de un tamaño considerable; sin embargo no ocurre lo mismo para *Mycobacterium phlei* ya que los halos disminuyeron su tamaño considerablemente, por lo tanto esto indica que la bacteria más resistente es *Mycobacterium phlei*.

La CMI para *Corynebacterium xerosis*, *Mycobacterium phlei*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus β -hemolítico* es de $30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

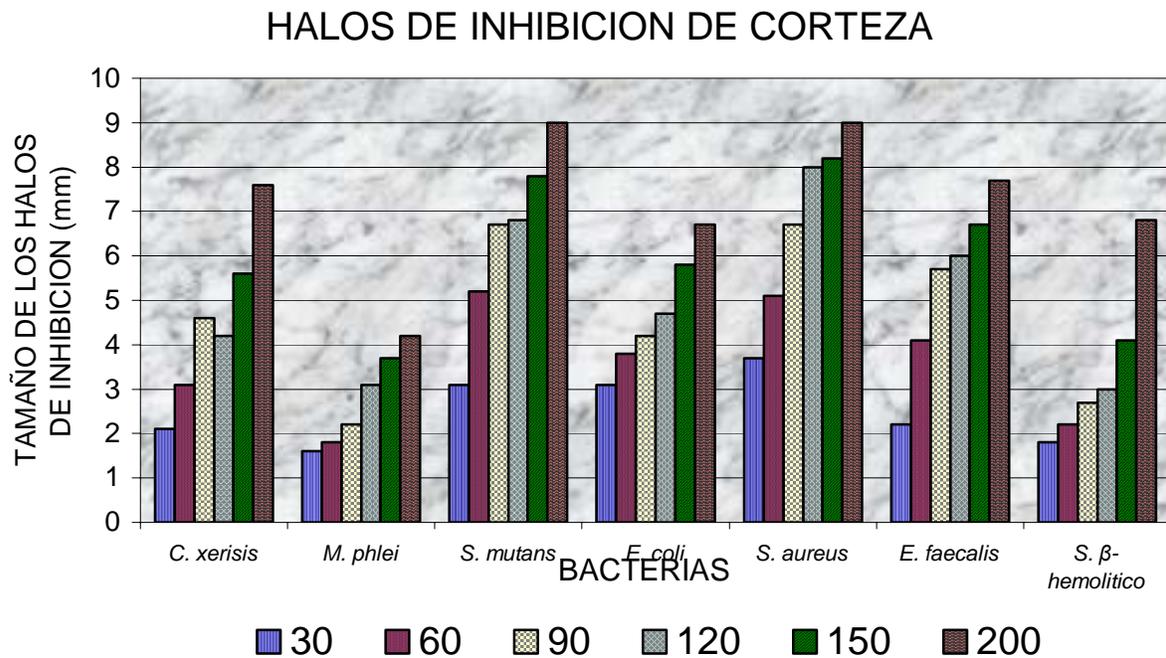


Fig. 14 Resultados promedio de los halos de inhibición (mm) con las seis

Concentraciones de *Abies religiosa* para las siete cepas de bacterias con corteza.

En la Figura 15 se observa el comportamiento de las tres estructuras hoja, rama y corteza de *Abies religiosa*.

El extracto de hoja logró formar halos de inhibición en seis de las siete cepas de bacterias, la única bacteria que no mostró respuesta fue *Corynebacterium xerosis*; la CMI de 120 mg mL⁻¹ corresponde a *Mycobacterium phlei*; para *Escherichia coli* la CMI es de 60 mg mL⁻¹; la CMI para *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus β-hemolítico* es de 30 mg mL⁻¹.

En cuanto a los extractos de rama y corteza la CMI para *Corynebacterium xerosis*, *Mycobacterium phlei*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus β-hemolítico* es de 30 mg mL⁻¹, la única excepción es *Streptococcus mutans* ya que la CMI es de 120 mg mL⁻¹.

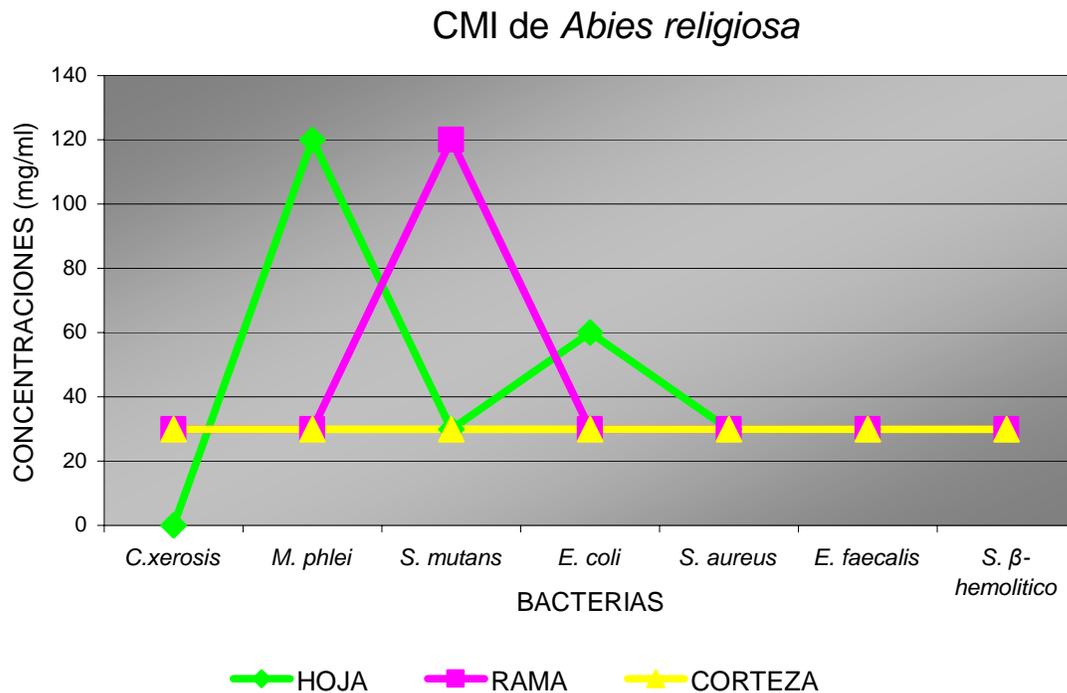


Fig. 15 Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de las tres estructuras frente a las cepas de bacterias que mostraron ser susceptibles a los principios activos de *Abies religiosa*.

El extracto de corteza resultó ser la estructura que tiene mayor efecto antibacteriano ya que inhibió el crecimiento de todas las cepas y los halos de inhibición también resultaron ser de tamaño mayor con una diferencia estadística significativa en comparación con los que presentaron la hoja y la rama.

La bacteria más sensible es *Enterococcus faecalis* dado que presentó los halos más grandes y para las tres estructuras; la bacteria más resistente fue *Corynebacterium xerosis* ya que los principios activos de hoja no mostraron inhibir el crecimiento de esta cepa bajo ninguna concentración

Estadísticamente se puede concluir que hay diferencia para casi todas las estructuras, la única excepción es corteza-rama con *Escherichia coli* donde muestra una diferencia significativa (Apéndice 3.1).

En el apéndice 4.2 queda demostrado estadísticamente que efectivamente el comportamiento de *Enterococcus faecalis* es muy semejante tanto para *Pinus hartwegii* como para *Abies religiosa*, ya que no hay diferencia estadística significativa.

En este capítulo se muestran los espectros que se obtuvieron los cuales indican que grupos funcionales que se encuentran en los extractos de *Abies religiosa*.

En las siguientes figuras 17, 18 y 19 representan espectros infrarrojos de los extractos de hoja, rama y corteza donde se muestran los grupos funcionales que contiene (análisis mediante la técnica de la pastilla de bromuro).

ESPECTRO IR DEL EXTRACTO DE HOJA

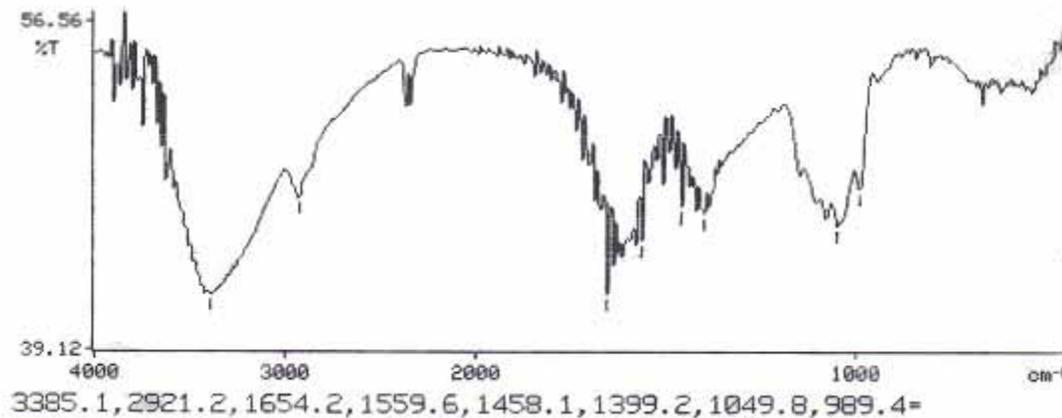


Fig.16 Espectro infrarrojo del extracto de hoja

Según la longitud de onda registrada la composición química de dicho extracto es la siguiente:

- ♣ 3385.1 → OH asociado, amida (NH), polímero
- ♣ 2921.2 → alcano (C-C), O-H, O=C (cetona)
- ♣ 1654.2 → C=O, éster
- ♣ 1559.6 → amina (H-N) primaria, (C-N=O nitroso), aromático
- ♣ 1458.1 → alcano, aromático
- ♣ 1399.2 → sin valor práctico (OH), aldehído
- ♣ 1049.8 → éter (=C-O-C; -O-C)
- ♣ 989.4 → alqueno (=CH) fuera de plano, aromático

ESPECTRO IR DEL EXTRACTO DE RAMA

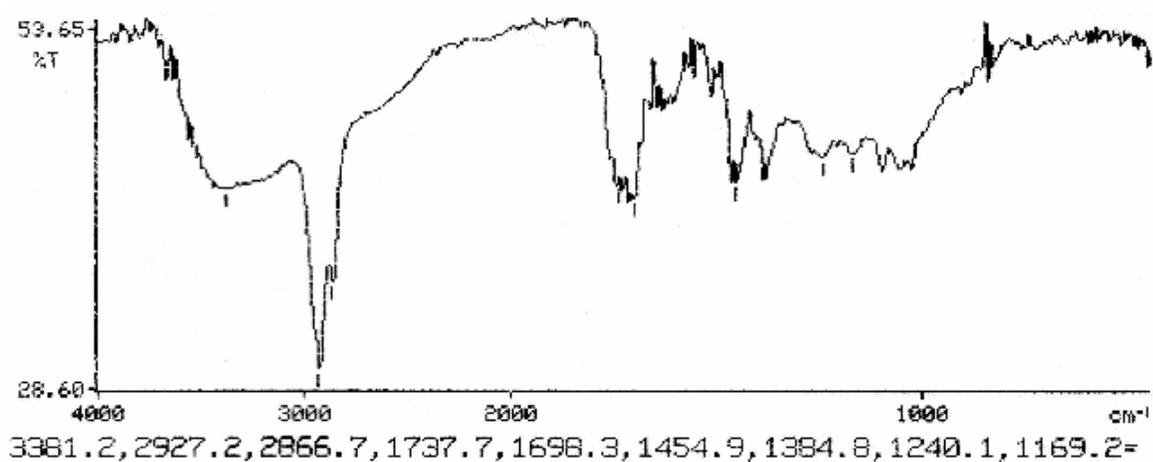


Fig.17 Espectro infrarrojo del extracto de rama

Según la longitud de onda registrada la composición química de dicho extracto es la siguiente:

- ♣3381.2 → OH asociado, amida (NH), polímero
- ♣2927.2 → NH₃⁺ (α -aminoácido)-CH₂ (alcano)
- ♣2866.7 → OH asociado (cetona), aldehído
- ♣1737.7 → C=O
- ♣1698.3 → amida primaria, aldehído, insaturado
- ♣1454.9 → aromático
- ♣1384.8 → compuestos con S y O
- ♣1240 → acetato (éster) CH₃COO
- ♣1169.2 → SO₂, S=O

ESPECTRO IR DEL EXTRACTO DE CORTEZA

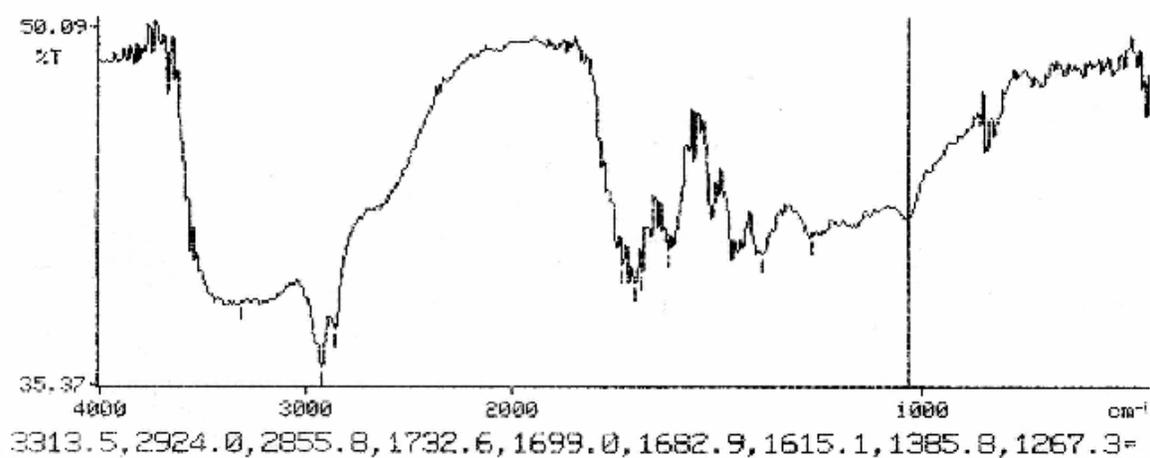


Fig.18 Espectro infrarrojo del extracto de corteza

Según la longitud de onda registrada la composición química de dicho extracto es la siguiente:

- ♣3313.5 → OH asociado, ácidos carboxílicos
- ♣2924 → ácido (OH)
- ♣2855.8 → ácido (OH)
- ♣1732.6 → aldehído (C=H)
- ♣1699 → aromático, ácido
- ♣1682.9 → aromáticos, ácido
- ♣1615.1 → cetona, α β -insaturado
- ♣1385.8 → sin valor práctico (aldehído) C, H, O
- ♣1267.8 → éster

Al igual que para los espectros de *Pinus hartwegii*, en *Abies religiosa* se encontraron diversos grupos funcionales tales como las aminas. Sin embargo en la planta no lo liberan, son transportadas a otras partes, en especial a los meristemas (James, 1967; Rojas, 1980; Deiter, 1980; Devlin, 1982; Salisbury, 2000).

Los grupos funcionales que se registraron en los espectros de IR de *Abies religiosa* son ácidos carboxílicos, aldehídos, grupos aromáticos, cetonas, ésteres, amidas, aminoácidos, alcanos, alquenos y compuestos con azufre.

Según los grupos funcionales reportados, los metabolitos secundarios presentes pueden ser ceras ya que son ésteres de ácidos grasos con alcoholes, las ceras se acumulan en tallos y hojas (Romo, 1985), químicamente, las ceras son mezclas de hidrocarburos, ésteres, ácidos libres, alcoholes de cadena larga, aldehídos y cetonas (Bruneton, 1991). En los espectros también hay ésteres presentes los cuales pueden estar formando partes de terpenoides ya que en la biosíntesis general de estos últimos hay formación de acetatos los cuales contienen ésteres (Hess, 1980); los aceites esenciales son mezclas complejas y muy variables de constituyente que pertenecen de forma casi exclusiva a dos series, caracterizadas por orígenes biosintéticos distintos: la serie terpénica y la serie mucho menos frecuente, de los compuestos arénicos derivados del fenil propano. De manera general los principales constituyentes son hidrocarburos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos o policíclicos. Van acompañados de sus derivados oxigenados: alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, etc. Los flavonoides se encuentran en helechos y Gimnospermas, pero su variedad estructural es pequeña, en la biosíntesis encontramos grupos funcionales como grupos aromáticos, éter y oxígeno (Bruneton, 1991). Cabe señalar que los aldehídos y cetonas se encuentran entre los compuestos comunes en la naturaleza (McMurry, 2000), esto hace más difícil poder determinar de que metabolito secundario pueden estar formando parte.

Las ceras se acumulan para impedir la evaporación del agua que se ha almacenado; las funciones de los aceites esenciales constituyen un medio de defensa frente a depredadores (microorganismos, hongos, insectos, herbívoros) y a veces parecen tener una acción tóxica sobre la germinación de otras plantas; la complejidad de la composición permite los “mensajes” complejos y selectivos, los terpenos tienen numerosas aplicaciones en la industria perfumera, los aíslan para fabricar perfumes de alta valor comercial (Romo, 1985). A los flavonoides se les atribuyen propiedades como acción diurética, acción antiespasmódica, acción anti-edematosa (protectores el tejido conjuntivo) (Bruneton, 1991).

En cuanto a los aceites esenciales Algunas especies de abetos reportadas con propiedades medicinales son *Abies alba* Millar el cual contiene resina y aceites esenciales que forman parte de la esencia de trementina que es una de las principales sustancias medicinales que presenta el abeto, en especial por vía externa como antiálgico y rubefaciente. Por vía externa es expectorante (Alonso, 2004); también se le reporta para aliviar bronquitis, asma, enfisemas, rinofaringitis, sinusitis y en general catarros bronquiales. También en infecciones urinarias como cistitis o pielonefritis (Pérez, 2001).

Algunas experiencias *in vitro* determinaron una acción bacteriostática y/o bactericida de las yemas del abeto debido a componentes de su aceite esencial. Dicha actividad también fue corroborada en *Picea abies* ó abeto rojo (Karting y col.1991; Schales C. y col.1993). La corteza también tiene acción antiséptica y astringente. Mediante la incisión en la madera se obtienen aceites de trementina y con la esencia se da aroma a productos de limpieza (Pérez, 2001).

CAPÍTULO

X

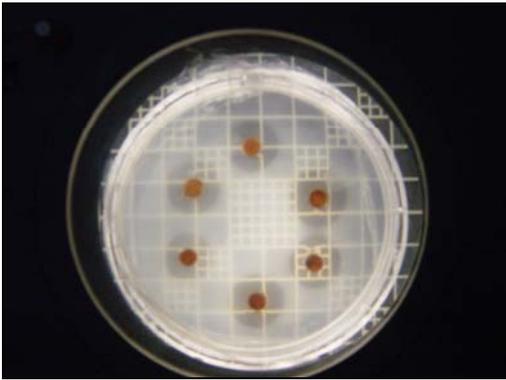
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

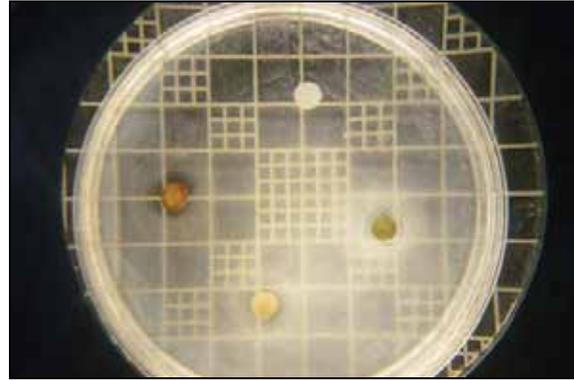
- La hipótesis se cumplió parcialmente ya que si se obtuvo efecto antibacteriano en las dos especies y el efecto inhibitorio fue más marcado en la corteza y no en las hojas como se esperaba y como antifúngico no funciona.
- En cuanto a porcentajes de rendimiento de *Pinus hartwegii* la rama es la que tiene mayor rendimiento. Para el caso de *Abies religiosa* el mayor rendimiento se encuentra en hoja y corteza.
- Ninguno de las especies tienen efecto como antifúngico ya que no producen halos de inhibición bajo ninguna de las concentraciones empleadas.
- Tanto *Pinus hartwegii* como *Abies religiosa* tienen efecto antibacteriano.
- *Enterococcus faecalis* es la bacteria con mayor grado de susceptibilidad y *Corynebacterium xerosis* es la bacteria mas resistente a los principios activos de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa*
- Las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) se encuentran en un rango de 30 a 120 mg·mL⁻¹ para ambas especies.
- La corteza de *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa* presentan mayor efecto inhibitorio, para el caso de *Abies* el efecto es mayor.
- La especie con mayor efecto antimicrobiano es *Abies religiosa*
- Los grupos funcionales reportados en los espectros de IR son aminas, ácidos carboxílicos, fenoles, alcoholes, amidas, compuestos aromáticos, éteres, esteres, cetonas, aldehídos y compuestos con azufre.
- El suelo donde se desarrolla *Pinus hartwegii* y *Abies religiosa* es ácido, ligero y rico en materia orgánica, característica que corresponden a un Andosol

APÉNDICE

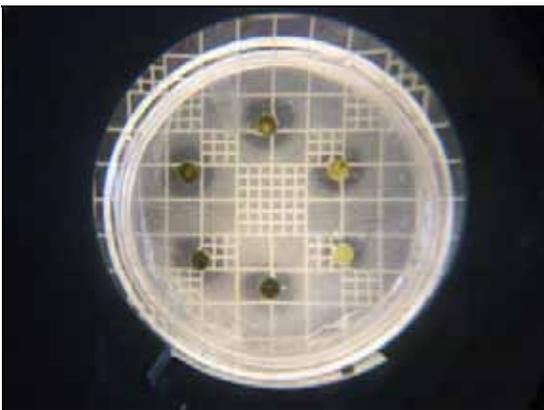
ANTIBIOGRAMAS



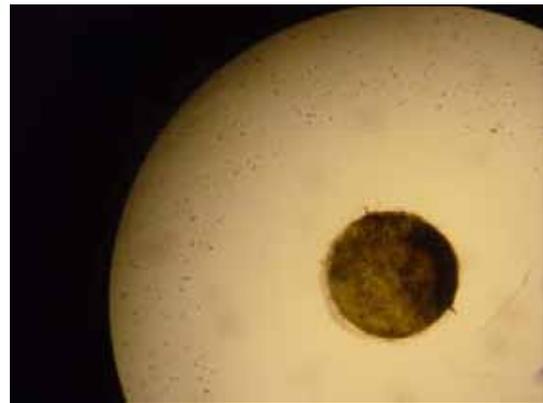
Escherichia coli
Corteza de *Pinus hartwegii*



Enterococcus faecalis
hoja, rama y corteza de *Pinus hartwegii*



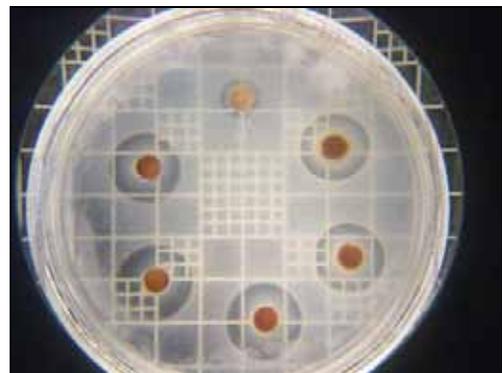
Enterococcus faecalis
Rama de *Abies religiosa*



Streptococcus β -hemolítico
Hoja de *Abies religiosa*



Enterococcus faecalis
Rama de *Abies religiosa*



Corynebacterium xerosis
Corteza de *Abies religiosa*

I

Datos estadísticos de *Pinus hartwegii*

Mycobacterium phlei

1.1)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-concentración)

Method: 95.0 percent LSD

CONCENTRACION	Count	Mean	Homogeneous
30	24	0.625	X
60	24	0.958333	X
90	24	2.58333	X
120	24	2.625	X
150	24	3.45833	X
200	24	4.5	X

Contrast	Difference
30 - 60	-0.333333
30 - 90	*-1.95833
30 - 120	*-2.0
30 - 150	*-2.83333
30 - 200	*-3.875
60 - 90	*-1.625
60 - 120	*-1.66667
60 - 150	*-2.5
60 - 200	*-3.54167
90 - 120	-0.0416667
90 - 150	*-0.875
90 - 200	*-1.91667
120 - 150	*-0.833333
120 - 200	*-1.875
150 - 200	*-1.04167

* Existe diferencia estadística significativa

1.2)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

Method: 95.0 percent LSD

ESTRUCTURA	Count	Mean	Homogeneous
HOJA	48	1.77083	X
RAMA	48	1.77083	X
CORTEZA	48	3.83333	X

Contrast	Difference
CORTEZA - HOJA	*2.0625
CORTEZA - RAMA	*2.0625
HOJA - RAMA	0.0

* Existe diferencia estadística significativa

Streptococcus mutans

1.3)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-concentración)

Method: 95.0 percent LSD			
CONCENTRACION	Count	Mean	Homogeneous
60	24	0.0	X
90	24	0.0	X
90	24	0.625	XX
120	24	1.04167	XX
150	24	1.25	XX
200	24	1.58333	X

Contrast	Difference
30 - 60	0.0
30 - 90	-0.625
30 - 120	*-1.04167
30 - 150	*-1.25
30 - 200	*-1.58333
60 - 90	-0.625
60 - 120	*-1.04167
60 - 150	*-1.25
60 - 200	*-1.58333
90 - 120	-0.41667
90 - 150	-0.625
90 - 200	*-0.958333
120 - 150	-0.208333
120 - 200	-0.541667
150 - 200	-0.333333

* Existe diferencia estadística significativa

1.4)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

Method: 95.0 percent LSD			
ESTRUCTURA	Count	Mean	Homogeneous
HOJA	48	0.0	X
RAMA	48	0.0	X
CORTEZA	48	2.25	X

Contrast	Difference
CORTEZA - HOJA	*2.25
CORTEZA - RAMA	*2.25
HOJA - RAMA	0.0

* Existe diferencia estadística significativa

Escherichia coli

1.5)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-concentración)

Method: 95.0 percent LSD			
CONCENTRACION	Count	Mean	Homogeneous
30	24	0.416667	X
60	24	1.54167	X
90	24	2.5	X
120	24	3.0	X
150	24	4.16667	X
200	24	4.95833	X

(* Existe diferencia estadística significativa e

30 - 60	*-1.125
30 - 90	*-2.08333
30 - 120	*-2.58333
30 - 150	*-3.75
30 - 200	*-4.54167
60 - 90	*-0.958333
60 - 120	*-1.45833
60 - 150	*-2.625
60 - 200	*-3.41667
90 - 120	*-0.5
90 - 150	*-1.66667
90 - 200	*-2.45833

* Existe diferencia estadística significativa

150 - 200	*-0.791667
-----------	------------

* Existe diferencia estadística significativa

1.6)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

Method: 95.0 percent LSD			
ESTRUCTURA	Count	Mean	Homogeneous
HOJA	48	2.29167	X
RAMA	48	2.97917	X
CORTEZA	48	3.02083	X

Contrast	Difference
CORTEZA - HOJA	*0.729167
CORTEZA - RAMA	0.0416667
HOJA - RAMA	*-0.6875

* Existe diferencia estadística significativa

Staphylococcus aureus

1.7)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-concentración)

Method: 95.0 percent LSD			
CONCENTRACION	Count	Mean	Homogeneous
30	24	0.75	X
60	24	1.20833	XX
90	24	1.83333	XX
120	24	2.04167	XX
150	24	2.25	XX
200	24	2.70833	X

Contrast	Difference
30 - 60	-0.458333
30 - 90	*-1.08333
30 - 120	*-1.29167
30 - 150	*-1.5
30 - 200	*-1.95833
60 - 90	-0.625
60 - 120	-0.833333
60 - 150	-1.04167
60 - 200	*-1.5
90 - 120	-0.208333
90 - 150	-0.416667
90 - 200	-0.875
120 - 150	-0.208333
120 - 200	-0.666667
150 - 200	-0.458333

* Existe diferencia estadística significativa

1.8)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

Method: 95.0 percent LSD			
ESTRUCTURA	Count	Mean	Homogeneous
RAMA	48	0.0	X
HOJA	48	1.33333	X
CORTEZA	48	4.0625	X

Contrast	Difference
CORTEZA - HOJA	*2.72917
CORTEZA - RAMA	*4.0625
HOJA - RAMA	*1.33333

* Existe diferencia estadística significativa

Enterococcus faecalis

1.9)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-concentración)

```
-----
Method: 95.0 percent LSD
CONCENTRACION  Count      Mean      Homogeneous
-----
30              24        2.29167      X
50              24        3.375        X
90              24        4.125        X
120             24        4.66667      X
150             24        5.70833      X
200             24        6.41667      X
-----

Contrast                               Difference
-----
30 - 50                                 *-1.08333
30 - 90                                 *-1.83333
30 - 120                                *-2.375
30 - 150                                *-3.41667
30 - 200                                *-4.125
50 - 90                                  *-0.75
50 - 120                                 *-1.29167
50 - 150                                 *-2.33333
50 - 200                                 *-3.04167
90 - 120                                  -0.541667
90 - 150                                 *-1.58333
90 - 200                                 *-2.29167
120 - 150                                 *-1.04167
120 - 200                                 *-1.75
150 - 200                                 *-0.708333
-----
```

* Existe diferencia estadística significativa

2.0)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

```
-----
Method: 95.0 percent LSD
ESTRUCTURA    Count      Mean      Homogeneous
-----
HOJA           48        3.22917      X
CORTEZA        48        4.91667      X
RAMA           48        5.14583      X
-----

Contrast                               Difference
-----
CORTEZA - HOJA                           *1.6875
CORTEZA - RAMA                           -0.229167
HOJA - RAMA                               *-1.91667
-----
```

* Existe diferencia estadística significativa

Streptococcus β -hemolítico

2.1)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-concentración)

Method: 95.0 percent LSD			
CONCENTRACION	Count	Mean	Homogeneous
30	24	1.41667	X
60	24	1.70833	X
90	24	2.33333	X
120	24	2.83333	X
150	24	3.5	X
200	24	4.16667	X

Contrast	Difference
30 - 60	-0.291667
30 - 90	*-0.916667
30 - 120	*-1.41667
30 - 150	*-2.08333
30 - 200	*-2.75
60 - 90	*-0.625
60 - 120	*-1.125
60 - 150	*-1.79167
60 - 200	*-2.45833
90 - 120	-0.5
90 - 150	*-1.16667
90 - 200	*-1.83333
120 - 150	*-0.666667
120 - 200	*-1.33333
150 - 200	*-0.666667

* Existe diferencia estadística significativa

2.2)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

Method: 95.0 percent LSD			
ESTRUCTURA	Count	Mean	Homogeneous
HOJA	48	1.35417	X
RAMA	48	3.10417	X
CORTEZA	48	3.52083	X

Contrast	Difference
CORTEZA - HOJA	*2.16667
CORTEZA - RAMA	0.416667
HOJA - RAMA	*-1.75

* Existe diferencia estadística significativa

Análisis estadístico de la respuesta inhibitoria entre las cepas bacterianas

2.3)

Multiple Range Tests

Method: 95.0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous
HALOS PSM	144	0.75	X
HALOS PSA	144	1.79861	X
HALOS PMP	144	2.45833	X
HALOS PSH	144	2.65972	X
HALO PEC	144	2.76389	X
HALOS PEF	144	4.43056	X

Contrast	Difference
HALOS PEF - HALOS PMP	*1.97222
HALOS PEF - HALOS PSA	*2.63194
HALOS PEF - HALOS PSH	*1.77083
HALOS PEF - HALOS PSM	*3.68056
HALOS PEF - HALO PEC	*1.66667
HALOS PMP - HALOS PSA	*0.659722
HALOS PMP - HALOS PSH	-0.201389
HALOS PMP - HALOS PSM	*1.70833
HALOS PMP - HALO PEC	-0.305556
HALOS PSA - HALOS PSH	*-0.861111
HALOS PSA - HALOS PSM	*1.04861
HALOS PSA - HALO PEC	*-0.965278
HALOS PSH - HALOS PSM	*1.90972
HALOS PSH - HALO PEC	-0.104167
HALOS PSM - HALO PEC	*-2.01389

* Existe diferencia estadística significativa

II

Datos estadísticos de *Abies religiosa*

Corynebacterium xerosis

2.4)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-concentración)

Method: 95.0 percent LSD

CONCENTRACION	Count	Mean	Homogeneous
30	24	1.333333	X
60	24	1.708333	X
120	24	2.208333	XX
90	24	2.291667	XX
150	24	2.916667	X
200	24	4.458333	X

Contrast	Difference
30 - 60	-0.375
30 - 90	-0.958333
30 - 120	-0.875
30 - 150	*-1.583333
30 - 200	*-3.125
60 - 90	-0.583333
60 - 120	-0.5
60 - 150	*-1.208333
60 - 200	*-2.75
90 - 120	0.0833333
90 - 150	-0.625
90 - 200	*-2.166667
120 - 150	-0.7083333
120 - 200	*-2.25
150 - 200	*-1.541667

* Existe diferencia estadística significativa

2.5)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

Method: 95.0 percent LSD

ESTRUCTURA	Count	Mean	Homogeneous
HOJA	48	0.0	X
RAMA	48	2.895833	X
CORTEZA	48	4.5625	X

Contrast	Difference
CORTEZA - HOJA	*4.5625
CORTEZA - RAMA	*1.666667
HOJA - RAMA	*-2.895833

* Existe diferencia estadística significativa

Mycobacterium phlei

2.6)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-concentración)

```
-----
Method: 95.0 percent LSD
CONCENTRACION  Count      Mean      Homogeneous
-----
30              24        0.958333      X
60              24        1.25          XX
90              24        1.58333      XX
120             24        2.16667      XX
150             24        2.54167      X
200             24        3.16667      X
-----

Contrast              Difference
-----
30 - 60                -0.291667
30 - 90                *-0.625
30 - 120               *-1.20833
30 - 150               *-1.58333
30 - 200               *-2.20833
60 - 90                -0.333333
60 - 120               *-0.916667
60 - 150               *-1.29167
60 - 200               *-1.91667
90 - 120               -0.583333
90 - 150               *-0.958333
90 - 200               *-1.58333
120 - 150              -0.375
120 - 200              *-1.0
150 - 200              *-0.625
-----
```

* Existe diferencia estadística significativa

2.7)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

```
-----
Method: 95.0 percent LSD
ESTRUCTURA      Count      Mean      Homogeneous
-----
HOJA             48        0.666667      X
RAMA             48        2.35417      X
CORTEZA         48        2.8125      X
-----

Contrast              Difference
-----
CORTEZA - HOJA        *2.14583
CORTEZA - RAMA        *0.458333
HOJA - RAMA           *-1.6875
-----
```

* Existe diferencia estadística significativa

Streptococcus mutans

2.8)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-concentración)

Method: 95.0 percent LSD			
CONCENTRACION	Count	Mean	Homogeneous
30	24	1.41667	X
60	24	2.375	XX
90	24	3.0	XX
120	24	3.75	XX
150	24	4.29167	XX
200	24	5.20833	X

Contrast	Difference
30 - 60	-0.958333
30 - 90	*-1.58333
30 - 120	*-2.33333
30 - 150	*-2.875
30 - 200	*-3.79167
60 - 90	-0.625
60 - 120	-1.375
60 - 150	*-1.91667
60 - 200	*-2.83333
90 - 120	-0.75
90 - 150	-1.29167
90 - 200	*-2.20833
120 - 150	-0.541667
120 - 200	*-1.45833
150 - 200	-0.916667

* Existe diferencia estadística significativa

2.9)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

Method: 95.0 percent LSD			
ESTRUCTURA	Count	Mean	Homogeneous
RAMA	48	0.708333	X
HOJA	48	2.83333	X
CORTEZA	48	6.47917	X

Contrast	Difference
CORTEZA - HOJA	*3.64583
CORTEZA - RAMA	*5.77083
HOJA - RAMA	*2.125

* Existe diferencia estadística significativa

Escherichia coli

3.0)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-concentración)

```
-----
Method: 95.0 percent LSD
CONCENTRACION  Count      Mean      Homogeneous
-----
30              24       2.04167      X
50              24       2.95833      X
90              24       3.41667     XX
120             24       4.04167      X
150             24       5.125        X
200             24       5.75         X
-----

Contrast              Difference
-----
30 - 50                *-0.916667
30 - 90                *-1.375
30 - 120               *-2.0
30 - 150               *-3.08333
30 - 200               *-3.70833
50 - 90                 -0.458333
50 - 120               *-1.08333
50 - 150               *-2.16667
50 - 200               *-2.79167
90 - 120               -0.625
90 - 150               *-1.70833
90 - 200               *-2.33333
120 - 150              *-1.08333
120 - 200              *-1.70833
150 - 200              -0.625
-----
```

* Existe diferencia estadística significativa

3.1)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

```
-----
Method: 95.0 percent LSD
ESTRUCTURA      Count      Mean      Homogeneous
-----
HOJA             48       2.58333      X
RAMA             48       4.3125       X
ORTEZA          48       4.77083      X
-----

Contrast              Difference
-----
ORTEZA - HOJA        *2.1875
ORTEZA - RAMA        0.458333
HOJA - RAMA          *-1.72917
-----
```

* Existe diferencia estadística significativa

Staphylococcus aureus

3.2)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-concentración)

Method: 95.0 percent LSD			
CONCENTRACION	Count	Mean	Homogeneous
30	24	2.29167	X
60	24	3.25	XX
90	24	4.0	XX
120	24	4.75	XX
150	24	5.625	XX
200	24	6.54167	X

Contrast	Difference
30 - 60	-0.958333
30 - 90	*-1.70833
30 - 120	*-2.45833
30 - 150	*-3.33333
30 - 200	*-4.25
60 - 90	-0.75
60 - 120	*-1.5
60 - 150	*-2.375
60 - 200	*-3.29167
90 - 120	-0.75
90 - 150	*-1.625
90 - 200	*-2.54167
120 - 150	-0.875
120 - 200	*-1.79167
150 - 200	-0.916667

* Existe diferencia estadística significativa

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

3.3)

Method: 95.0 percent LSD			
ESTRUCTURA	Count	Mean	Homogeneous
RAMA	48	2.33333	X
HOJA	48	4.08333	X
CORTEZA	48	6.8125	X

Contrast	Difference
CORTEZA - HOJA	*2.72917
CORTEZA - RAMA	*4.47917
HOJA - RAMA	*1.75

* Existe diferencia estadística significativa

Enterococcus faecalis

3.4)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-concentración)

Method: 95.0 percent LSD			
CONCENTRACION	Count	Mean	Homogeneous
30	24	1.70833	X
60	24	2.91667	X
90	24	3.91667	X
120	24	4.58333	X
150	24	5.33333	X
200	24	7.0	X

Contrast	Difference
30 - 60	*-1.20833
30 - 90	*-2.20833
30 - 120	*-2.875
30 - 150	*-3.625
30 - 200	*-5.29167
60 - 90	*-1.0
60 - 120	*-1.66667
60 - 150	*-2.41667
60 - 200	*-4.08333
90 - 120	-0.666667
90 - 150	*-1.41667
90 - 200	*-3.08333
120 - 150	*-0.75
120 - 200	*-2.41667
150 - 200	*-1.66667

* Existe diferencia estadística significativa

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

3.5)

Method: 95.0 percent LSD			
ESTRUCTURA	Count	Mean	Homogeneous
HOJA	48	2.89583	X
RAMA	48	4.39583	X
CORTEZA	48	5.4375	X

Contrast	Difference
CORTEZA - HOJA	*2.54167
CORTEZA - RAMA	*1.04167
HOJA - RAMA	*-1.5

* Existe diferencia estadística significativa

Streptococcus β-hemolítico

3.6)

Pruebas de comparación múltiple de Tukey (inhibición-estructura)

```
-----  
Method: 95.0 percent LSD  
ESTRUCTURA      Count      Mean      Homogeneous  
-----  
HOJA              48         2.75      X  
CORTEZA           48        3.47917  X  
RAMA              48         5.0      X  
-----  
Contrast              Difference  
-----  
CORTEZA - HOJA              *0.729167  
CORTEZA - RAMA              *-1.52083  
HOJA - RAMA                  *-2.25  
-----
```

* Existe diferencia estadística significativa

Análisis estadístico de la respuesta inhibitoria entre las cepas bacterianas

3.7)

Multiple Range Tests

Method: 95.0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous
HAL03 AMP	144	1.94444	X
HAL03 ACX	144	2.48611	X
HAL03 ASM	144	3.34028	X
HAL03 ASH	144	3.74306	XX
HAL03 AEC	144	3.88889	XX
HAL03 AEF	144	4.24306	XX
HAL03 ASA	144	4.40972	X

Contrast	Difference
HAL03 ACX - HAL03 AEC	*-1.40278
HAL03 ACX - HAL03 AEF	*-1.75694
HAL03 ACX - HAL03 AMP	*0.541667
HAL03 ACX - HAL03 ASA	*-1.92361
HAL03 ACX - HAL03 ASH	*-1.25694
HAL03 ACX - HAL03 ASM	*-0.854167
HAL03 AEC - HAL03 AEF	-0.354167
HAL03 AEC - HAL03 AMP	*1.94444
HAL03 AEC - HAL03 ASA	*-0.520833
HAL03 AEC - HAL03 ASH	0.145833
HAL03 AEC - HAL03 ASM	*0.548611
HAL03 AEF - HAL03 AMP	*2.29861
HAL03 AEF - HAL03 ASA	-0.166667
HAL03 AEF - HAL03 ASH	*0.5
HAL03 AEF - HAL03 ASM	*0.902778
HAL03 AMP - HAL03 ASA	*-2.46528
HAL03 AMP - HAL03 ASH	*-1.79861
HAL03 AMP - HAL03 ASM	*-1.39583
HAL03 ASA - HAL03 ASH	*0.666667
HAL03 ASA - HAL03 ASM	*1.06944
HAL03 ASH - HAL03 ASM	0.402778

* Existe diferencia estadística significativa

Análisis estadístico entre las bacterias y los principios activos de *Pinus hartwegii* Lindl y *Abies religiosa* (H.B.K.) Cham. & Schlecht

Mycobacterium phlei

3.8)

Multiple Range Tests

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
          Count      Mean      Homogeneous
-----
HALOS AMP      144      1.94444      X
HALOS PMP      144      2.45833      X
-----
Contrast                                Difference
-----
HALOS AMP - HALOS PMP                    *-0.513889
-----

```

* Existe diferencia estadística significativa

Streptococcus mutans

3.9)

Multiple Range Tests

```

-----
Method: 95.0 percent LSD
          Count      Mean      Homogeneous
-----
HALOS PSM      144      0.75      X
HALOS ASM      144      3.34028      X
-----
Contrast                                Difference
-----
HALOS ASM - HALOS PSM                    *2.59028
-----

```

* Existe diferencia estadística significativa

Escherichia coli

4.0)

Multiple Range Tests

Method: 95.0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous
HALO PEC	144	2.76389	X
HALOS AEC	144	3.88889	X

Contrast

HALO PEC - HALOS AEC

Difference
* -1.125

* Existe diferencia estadística significativa

Staphylococcus aureus

4.1)

Multiple Range Tests

Method: 95.0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous
HALOS PSA	144	1.79861	X
HALOS ASA	144	4.40972	X

Contrast

HALOS ASA - HALOS PSA

Difference
* 2.61111

* Existe diferencia estadística significativa

Enterococcus faecalis

4.2)

Multiple Range Tests

Method: 95.0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous
HALOS AEF	144	4.24306	X
HALOS PEF	144	4.43056	X

Contrast

HALOS AEF - HALOS PEF

Difference

-0.1875

* Existe diferencia estadística significativa

Streptococcus β -hemolítico

4.3)

Multiple Range Tests

Method: 95.0 percent LSD

	Count	Mean	Homogeneous
HALOS PSH	144	2.65972	X
HALOS ASH	144	3.74306	X

Contrast

HALOS ASH - HALOS PSH

Difference

*1.08333

* Existe diferencia estadística significativa



LITERATURA CITADA

Acosta, L. 2003. Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med.* [online]. Ene.-abr. 2003, vol.8, no.1 [fecha de consulta: 14 Mayo 2007], p.0-0. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100008&lng=es&nrm=iso>.

Alfaro, T., Chalala M. Rodríguez C., Ramos R., Carballo C. y Cabezas C. 2000. Lavado y desinfección de drogas vegetales. Normas técnicas. Proceso tecnológico (proyecto). Departamento de Control Microbiológico del Centro de investigación y Desarrollo de Medicamentos. México, D. F.

Allen B. y F. Baker , 1976, Aislamiento identificación y pruebas de sensibilidad. Editorial Médica Panamericana. México, D. F.

Alonso, J. 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos. Editorial Corpus. Rosario, Argentina.

Arenas, G. R. 2003. Micología Médica Ilustrada. 2^a Edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México, D. F.

Baker J. y M. Breach, 1990, Manual de técnicas de microbiología medica. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Bauer A. W; Kirby M. M; Sherris J. C, y M Turk. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45:493-496

Beaman J. y J. Andesen, 1966, The vegetation, floristics and phytogeography of the summit of Cerro Potosi, Mexico. *Amer. Midl. Natur.* 75: 1-13

Beaman J. 1962. The timberline of Iztaccihuatl and Popocatepetl, Mexico. *Ecol.* 43:377-385

Bruneton J. 1991. Elementos de Fotoquímica y de Farmacognosia. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Bruneton J. 1993. Pharmacognosie. Phytochimie, plantes medicinales. 2^a Edición. Technique et Documentation – Lavoisier, París. La 1^a edición está traducida al español: Elementos de fotoquímica y farmacognosia, Ed. Acribia, Zaragoza (1991).

Cacho, J. 1997.El Antibiograma. *Rev Biomed,* 9:56-64

Cebrián J. y J. Guarga. 2002. Diccionario Integral de Plantas Medicinales. RBA integral. Barcelona, España.

Chapman D., H., Pratt F., Parker. 1988. Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas. Editorial Trillas. México D. F.

Collins C. y M.Lyne, 1989. Métodos microbiológicos. Editorial Acribia. Zaragoza España.

CONANP. Parque Nacional Izta-Popo. 2004. (Fecha de consulta: 2 /01/2007). <http://iztapopo.conanp.gob.mx/2004>

Danival. Antibioticos. 2003. (Fecha de consulta: 09/09/2004). http://www.danival.org/microclin/antibiot/ madre_antibiot.html

Davis B., R. Dulbecco, Eisen H. y Ginsberg H. 1984. Tratado de microbiología con inclusión de inmunología y genética molecular. 3ª Edición. Salvat Editores. Barcelona, España.

Deiter H. 1980. Fisiología Vegetal, Fundamentos moleculares y bioquímicos del metabolismo y el desarrollo. Ediciones Omega. Barcelona, España.

Devlin R. 1982. Fisiología Vegetal. 4ª Edición. Ediciones Omega. Barcelona España.

Dominguez, A. X. 1992. Química orgánica. 7ª edición. Compañía Editorial Continental. México.

Duerden B., Reid T., Jewsbury J. y Turk D. 1993. Microbiología de enfermedades infecciosas. Editorial Limusa. México.

Finegold M. y Martín W. 1983. Diagnóstico microbiológico. 6ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

FitzPatrick E. A. 1985. Suelos; su formación, clasificación y distribución. Compañía editorial Continental. México, D.F.

Forés R. 1997. Atlas de las plantas medicinales y curativas, La salud a través de las plantas. Editorial Cultural. España.

Fundación Alfonso Martín Escudero. 1999. Las plantas de extractos; bases para un plan de desarrollo del sector. Artes Gráficas Cuesta. Madrid.

García, R. H. 1995. Plantas curativas mexicanas, Descripción y usos. Panorama editorial. México D. F.

González, B. 1997. Tecnología y Métodos de Laboratorio clínico. Editorial Salvat. Barcelona, España.

Hess D. 1980. Fisiología vegetal; Fundamentos moleculares y bioquímico-fisiológicos del metabolismo y el desarrollo. Ediciones Omega. Barcelona, España.

Ingraham C. y H. Prentiss. 1998. Introducción a la Microbiología. Editorial Reverte. Barcelona, España.

Islas, V. y J. Sánchez. 1992. Breve historia de la farmacia en México y en el mundo. Asociación farmacéutica Mexicana. México, D. F.

Jackson M. y J. Beltrán. 1964. Análisis químico de suelos. Ediciones Omega. Barcelona, España.

James W. 1967. Introducción a la Fisiología Vegetal. 6ª Edición. Editorial Omega. Barcelona, España.

Karting T, Still F. y Reithaler F. 1991. Antimicrobial activity of the essential oil of young pine shoots (*Picea Abies* L.). *Ethnopharmacol* 35:(2):155-7

Koneman W., Alen S., Dowell V., Janda W., Somers H. y Winn W. 1992. Diagnóstico microbiológico, Texto y Atlas. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Kuklinski C. 2003. Farmacognosia, Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega. España.

Levinson W. y Jawetz J. 1992. Microbiología e Inmunología Médicas. Evaluación y repaso. Editorial El Manual Moderno. México, D. F.

Lennette E. H. 1987. Manual de Microbiología Clínica. 4ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Linares, E., Flores, B. y Bye R. 1990. Selección de plantas medicinales de México. Noriega Editores. México, D. F.

Lozoya X. 1999. La herbolaria en México. Tercer Milenio. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. México, D. F.

Marques, C. 1988. Probabilidad y Estadística para Ciencias Químico-Biológicas. UNAM. Ciudad Universitaria. D.F.

Martínez, M. 1963. Pinos de México. 3ª. Edición. UNAM, Tomo 1 y 2. México D. F.

Martínez, P. 2000. Plantas medicinales: relato de una posibilidad confiscada, El estatuto de la flora en la biomedicina mexicana. Instituto Nacional de Antropología e Historia. México D. F.

McMurry J. 2001. Química Orgánica. 5ª Edición. Internacional Thomson Editores. México, D.F.

McMurry J. 2004. Química Orgánica. 6ª Edición. Internacional Thomson Editores. México, D.F.

Mendel L., Bennett E. y Delin R. 1997. Enfermedades Infecciosas Principio y Prácticas. 4ª Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Montiel, A. y Guzmán D. 1997. Laboratorio de microbiología clínica, diagnóstico de enfermedades infecciosas. Boletín Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Morrison T. R. y Boyd N. R. 1998. Química Orgánica. Editorial Addison Wesley Longman de México. México.

Mulet, L. 1997. Principios tóxicos y síntomas de intoxicación. Castellón: Diputación Provincial, 1997

Muñoz, F. 1987. Plantas Medicinales y Aromáticas. Estudio cultivo y procesado. Ediciones Mudi-prensa. Madrid.

Muñoz, B. 2002. Plantas medicinales y aromáticas, Estudio cultivo y procesado. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.

Myrvick Q. N. y Weiser R. S. 1991. Bacteriología y Microbiología Médicas 2ª Edición. Editorial Interamericana-McGraw-Hill. México D. F.

NCCLS National Committe for Clinical Laboratory Standards. 1984 (Approved Standard M2-A3). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. National Committe for Clinical Laboratory Standards. Villa nova, PA: NCCLS.

NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993 (Approved Standard M2-A5). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villa nova, PA: NCCLS.

Niembro, A.1990. Árboles y arbustos útiles de México: naturales e introducidos. Editorial Limusa. México.

Norma Oficial Mexicana NOM-21-RECNAT-2000 Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Norlex Internacional, Edición Electrónica de Leyes. Publicada en el diario oficial de la federación el 7 de diciembre 2001, SEMARNAT.

Pedretti A. 1990. Chimica e Farmacologia delle Piante Medicinali. Editorial Studio. Milán, Italia.

Pérez, A. 2001. Enciclopedia de las plantas medicinales. Edimat libros. Madrid, España

Reynaud J. 2002. La flora del farmacéutico. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.

Richad R. D. 2002. Oil seed medicinals in natural drugs and dietary supplements - new functional foods. Trends in Food Science and Technology. Vol.13 issue 11 -p 353-60

Rivero, L. Álvarez M. López T. y González J. 1997. Actividad antifúngica *in vitro* del *Pinus cabraea* (pino macho). *Rev Cubana Plant Med.* Vol. 2, no. 1 pp. 25-29

Rojas, G. 1980. Fisiología Vegetal Aplicada. 2ª Edición. Ediciones McGraw-Hill de México.

Romo, A. 1985. Productos naturales de la flora mexicana. Editorial Limusa. México D. F.

Rzedowski J. 1978. Vegetación de México. Segunda reimpresión. Editorial Limusa. México.

Rzedowski J. y Calderón G. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª Edición. Instituto de Ecología y CANABIO. Pátzcuaro, Michoacán.

Saldierna, R., Suárez, T., García, B. y Rodríguez, C. 2000. Recetario de Hierbas y plantas medicinales. Ediciones Euroméxico. Colombia.

Salisbury F. y Ross C. 2000. Fisiología de las Plantas. Internacional Thomson Editores. Madrid, España.

Schales C., Gerlach H. y Kusters J. 1993. Investigations on the antibacterial effect conifer needle oils on bacteria isolated from the faces of captive Capercaillies. Zentralb. Veterinarmed (B). 40 (6):381-90

Siebe Ch., Jahn R. y Stahr. 1996. Manual para la descripción y evaluación ecológica de los suelos en campo. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A. C. Chapingo, México.

Sincholle D., Cotta M., Guedon D. y Coll R. 1987. Plantes medicinales et decontamination. Pharm. Acta Helv.1987, 62 (1):14-18.

Tay Z. J. 1994. Microbiología y Parasitología Médicas. 2ª Edición. Méndez Editores. México, D. F.

Trease y Evans. 1991. Farmacognosia. 13ª Edición. Interamericana. Editorial McGraw-Hill. México.

Valle, P. C. 2003. Metabolitos secundarios de las plantas. Tesina de curso de Naturopatía, Escuela Superior de Técnicas y Estudios Avanzados. "psicostasia" revista virtual. Sumario del numero 6.1. [fecha de consulta: 22 de diciembre 2006]. Disponible en: <http://www.psicostasia.com/Rev07.htm>

Velásquez, A., Mas J., Gallegos, D., Mayorga, S. Alcántara, P., Castro, R. Fernández, T. Bocco G., Ezcurra E. y Palacio, J. 1995. Patrones y tasas de cambio de uso de suelo. México.

Viesca T. C. 1994. Medicina prehispánica de México. Panorama Editorial. México, D. F.

Volák J.y Standalí J. 1988. Plantas medicinales. TSNP Marti. Checoslovaquia.

Weninger J. S y Stermitz R. F. 1998. Química Orgánica. Editorial Reverté. Barcelona, España.

William A. y Thomson D. 1980. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. Editorial Blume Milanésado. Barcelona, España.