

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

"EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y
DETERMINACION DE LA TOXICIDAD PARA ARTEMIA SALINA.
DE ESPECIES VEGETALES EMPLEADAS EN LA MEDICINA
TRADICIONAL MEXICANA"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTAN:

Espinosa Regalado Manuel

Mendez López Patricia

BIBLIOTECA CENTRAL

QUERÉTARO, QRO. 1995

No Adq. 55696

No. Título _____

Clas. 615.1

E 77c

BIBLIOTECA CENTRAL

**“DIOS ES EL MEJOR FARMACOLOGO Y EL
MEJOR DISEÑADOR, POR QUE DESARROLLA
LAS MEJORES MEDICINAS Y LAS
ACONDICIONA EN ENVASES DE TALLOS Y EN
CAJAS DE HOJAS Y FLORES”**

PAMA

JURADO ASIGNADO

DIRECTORA DE TESIS M. en C. ALEJANDRA ROJÁS MOLINA

SINODAL M. en C. GUADALUPE GARCIA ALCOCER

SINODAL Q.B. SERGIO PACHECO HERNANDEZ

SUPLENTE Q.B. PATRICIA VILLALOBOS AGUILERA

SITIO DONDE SE REALIZO LA INVESTIGACION:

LABORATORIOS DE FITOQUIMICA Y MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE

QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO.

DEDICATORIAS:

DOY GRACIAS A DIOS, POR HABERME PERMITIDO LLEVAR
HASTA SU CULMINACION MI TESIS.

A MIS PADRES:

JOSE ANTONIO MENDEZ CARBAJO
MARGARITA LOPEZ ARRIAGA

DEDICO EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACION POR
HABERME DADO TAN VALIOSA HERENCIA, *MIS ESTUDIOS.*

PATRICIA MENDEZ LOPEZ.

A QUIEN ESTUVO CONMIGO EN TODO MOMENTO...

DIOS, GRACIAS.

ESTE TRABAJO DE TESIS LO DEDICO A MIS PADRES:

MANUEL ESPINOSA AVILES

MARTHA REGALADO SALAZAR

**QUE ES EL FRUTO DE ESA SEMILLA, QUE HACE AÑOS
SEMBRARON EN MI, Y QUE CULTIVARON CON SU
ESFUERZO Y DEDICACION.**

MANUEL ESPINOSA REGALADO.

AGRADECIMIENTOS:

AGRADECEMOS A CADA UNO DE NUESTROS MAESTROS
POR SUS CONOCIMIENTOS Y EXPERIENCIA
TRASMITIDOS.

DE UNA MANERA ESPECIAL AGRADECEMOS A
NUESTROS SINODADES:

M. en C. GUADALUPE GARCIA ALCOCER

Q.B. PATRICIA VILLALOBOS AGUILERA

"POR SUS VALIOSAS
APORTACIONES A ESTE TRABAJO,
GRACIAS".

Q.B. SERGIO PACECO HERNANDEZ

"GRACIAS POR SU APOYO,
CONFIANZA, DEDICACION Y
ASESORAMIENTO".

M. en C. ALEJANDRA ROJAS MOLINA

“GRACIAS POR ABRIRNOS LAS PUERTAS HACIA LA INVESTIGACION, POR HABERNOS DADO SU GRAN EXPERIENCIA Y APOYO PARA LLEGAR A LA CULMINACION DE ESTE TRABAJO, QUE ES UNA META MUY DESEADA POR NOSOTROS”.

“GRACIAS POR SUS CONSEJOS Y SU VALIOSA AMISTAD”.

“LA APRECIAMOS”.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	i
LISTA DE CUADROS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
1. INTRODUCCIÓN	7
2. ANTECEDENTES	23
3. JUSTIFICACIÓN	38
4. OBJETIVOS	40
4.1. OBJETIVOS GENERALES	40
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
5. METODOLOGÍA	44
5.1. MATERIAL VEGETAL	44
5.2. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES	44
5.3. ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO	44
5.4. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD PARA <i>ARTEMIA SALINA</i> DE LOS EXTRACTOS CLOROFÓRMICOS Y METANÓLICOS DE LAS PLANTAS OBJETO DE ESTUDIO.	48
5.4.1. DETERMINACIÓN DE LA LC50 (CONCENTRACIÓN LETAL 50).	
5.5. EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES Y DE LOS CONTROLES POSITIVOS SOBRE MICROORGANISMOS DE PRUEBA, EMPLEANDO EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.	48
5.5.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS CURVAS CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE LOS CONTROLES POSITIVOS.	
5.6. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES INHIBITORIAS MÍNIMAS (CIM) DE LOS EXTRACTOS ACTIVOS EN LA EVALUACIÓN CUALITATIVA Y DE SUS RESPECTIVOS CONTROLES POSITIVOS, EMPLEANDO EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO.	62

6. RESULTADOS	64
7. DISCUSIÓN	81
8. CONCLUSIONES	89
9. APÉNDICE I	91
10. BIBLIOGRAFÍA	94

RESUMEN

La presente disertación describe la investigación llevada a cabo para determinar la actividad antimicrobiana y la toxicidad para *Artemia salina* de 15 especies utilizadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diarreas y disenterias. Las especies vegetales seleccionadas fueron: *Chenopodium graveolens*, *Commelina diffusa*, *Conyza filaginoides*, *Croton fragilis*, *Datura lanosa*, *Dononaea viscosa*, *Dyssodia pinnata*, *Gymnosperma glutinosum*, *Lepidium virginicum*, *Lopezia racemosa*, *Parthenium tomentosum*, *Potentilla thurberi*, *Pterogonum atrorubens*, *Salvia heliaelianthemifolia* y *Zornia dyphilla*. Para la realización del presente trabajo se emplearon 10 cepas de microorganismos enteropatógenos aislados a partir de muestras clínicas, las cuales incluyeron: *Aeromona hydrophila*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Yersinia enterocolitica*.

El estudio microbiológico se efectuó en dos fases. En la primera fase, se determinó cualitativamente la actividad antimicrobiana de los extractos; en la segunda fase, se cuantificó la potencia de los extractos activos mediante la obtención de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM).

Nueve de las quince plantas evaluadas, mostraron efecto antibacteriano sobre por lo menos uno de los microorganismos de prueba. Destaca la actividad antibiótica de *Commelina diffusa*, *Conyza filaginoides*, *Gymnosperma glutinosum* y *Zornia dyphilla* sobre

Staphylococcus aureus (CIM = 0.3172 mg/ml, CIM = 0.2933 mg/ml, CIM = 0.3809 mg/ml y CIM = 0.3786 mg/ml respectivamente).

El extracto metanólico de *Datura lanosa* mostró el más amplio espectro de acción, resultando activo contra: *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Yersina enterocolitica*.

Doce de las quince plantas estudiadas, resultaron tóxicas para el crustáceo *Artemia salina*. Las especies más potentes fueron *Parthenium tomentosum* y *Zornia dyphylla* con CL50 de 1.12 y 6.78 ppm respectivamente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo tienden a validar, en parte, el uso etnomédico de las especies objeto de estudio para el tratamiento de diarreas y disenterias en la medicina tradicional mexicana.

LISTA DE CUADROS

- CUADRO 1. Mecanismo de patogenia de los principales microorganismos causantes de diarreas y disenterias.
- CUADRO 2. Uso actual de agentes antimicrobianos en el tratamiento de diarreas y disenterias de origen infeccioso.
- CUADRO 3. Mecanismo de acción de los antibióticos.
- CUADRO 4. Mecanismo de resistencia de los antibióticos.
- CUADRO 5. Confirmación de la actividad de plantas de Guatemala contra enterobacterias.
- CUADRO 6. Actividad antimicrobiana de los extractos acuosos y etanólicos de 10 plantas de Nigeria.
- CUADRO 7. Actividad antimicrobiana de los extractos acuosos y etanólicos de 10 plantas de Nigeria (continuación del cuadro 6).
- CUADRO 8. Investigación de la actividad vibriocida de la tintura de cinco plantas de Centro América.
- CUADRO 9. Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima.
- CUADRO 10. Actividad antimicrobiana del extracto de *Acalypha wilkesiana*.
- CUADRO 11. Actividad antibacterial de los extractos etanólico, de ácido cítrico y tetraciclina penicilina.
- CUADRO 12. Propiedades antifúngicas de los extractos de *Dalbergia melanoxylon*.
- CUADRO 13. Especies vegetales seleccionadas.
- CUADRO 14. Microorganismos de prueba.
- CUADRO 15. Sensibilidad de los microorganismos de prueba frente a dos antibióticos de uso clínico. Concentración crítica mínima de inhibición y su coeficiente de correlación.

- CUADRO 16. Resultados del Análisis Fitoquímico Cualitativo.
- CUADRO 17. Extractos activos contra *Shigella flexneri*.
- CUADRO 18. Extractos activos contra *Staphylococcus aureus*.
- CUADRO 19. Extractos activos contra *Vibrio cholerae*.
- CUADRO 20. Extractos activos contra *Vibrio parahaemolyticus*.
- CUADRO 21. Extractos activos contra *Yersinia enterocolitica*.
- CUADRO 22. Cuantificación de los extractos que resultaron activos en la evaluación cualitativa.
- CUADRO 23. Actividad citotóxica de los extractos orgánicos para *Artemia salina*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Casos acumulados de enfermedades diarreicas en México, de 1991 a la semana 25 de 1994.
- Figura 2. Incidencia de enfermedades diarreicas por entidad federativa hasta la semana 25 de 1994.
- Figura 3. Estimación de la concentración crítica mínima de inhibición de Trimetoprima-sulfametoxazol para *Aeromonas hydrophila*.
- Figura 4. Estimación de la concentración crítica mínima de inhibición de Ampicilina para *Escherichia coli*.
- Figura 5. Estimación de la concentración crítica mínima de inhibición de Gentamicina para *Proteus mirabilis*.
- Figura 6. Estimación de la concentración crítica mínima de inhibición de Carbenicilina para *Pseudomonas aeruginosa*.
- Figura 7. Estimación de la concentración crítica mínima de inhibición de Amikacina para *Salmonella typhi*.
- Figura 8. Estimación de la concentración crítica mínima de inhibición de Gentamicina para *Shigella flexneri*.
- Figura 9. Estimación de la concentración crítica mínima de inhibición de Cefalotina para *Staphylococcus aureus*.
- Figura 10. Estimación de la concentración crítica mínima de inhibición de Tetraciclina para *Vibrio cholerae*.
- Figura 11. Estimación de la concentración crítica mínima de inhibición de Tetraciclina para *Vibrio parahaemolyticus*.
- Figura 12. Estimación de la concentración crítica mínima de inhibición de Gentamicina para *Yersinia enterocolitica*.

- Figura 13. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Potentilla thurberi* sobre *Shigella flexneri*.
- Figura 14. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Datura lanosa* sobre *Staphylococcus aureus*.
- Figura 15. Efecto inhibitorio del extracto clorofórmico de *Commelina diffusa* sobre *Staphylococcus aureus*.
- Figura 16. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Pterogonum atrorubens* sobre *Staphylococcus aureus*.
- Figura 17. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Pterogonum atrorubens* sobre *Vibrio cholerae*.
- Figura 18. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Datura lanosa* sobre *Vibrio parahaemolyticus*.
- Figura 19. Efecto inhibitorio del extracto clorofórmico de *Commelina diffusa* sobre *Yersinia enterocolitica*.
- Figura 20. Efecto inhibitorio de Gentamicina sobre *Proteus mirabilis*.

1. INTRODUCCIÓN

En un país como el nuestro, cuyas raíces históricas tienen su origen en pueblos tales como los Olmecas, los Toltecas, los Mayas y los Aztecas, quienes alcanzaron en su momento un gran desarrollo, resulta necesario profundizar en el gran conocimiento que nos legaron nuestros antepasados indígenas, particularmente en el uso y aprovechamiento de los recursos naturales nacionales.

En México, al igual que en otros lugares del mundo, las plantas proporcionaron a nuestros antepasados la respuesta alimenticia y medicinal que, desde épocas muy remotas, requerían en su interacción con la naturaleza y en la búsqueda del equilibrio indispensable para su supervivencia. Y fue, por una parte la casualidad, y por otra la minuciosa observación, lo que permitió conocer las propiedades curativas de algunos vegetales. En resumen, fue la praxis del ensayo y error, la que guió a nuestros primitivos antepasados a encontrar el alivio de sus males en la naturaleza (Lozoya X., 1984).

Los indígenas, en virtud de su íntimo contacto con la naturaleza, y por una experiencia prolongada y tal vez dolorosa en más de una ocasión, habían adquirido amplios conocimientos sobre las virtudes curativas de las plantas y las sabían aprovechar con sorprendente acierto. Basta recordar el "Códice de la Cruz-Badiano" (el libro de las hierbas medicinales de los indios), escrito en náhuatl por Martín de la Cruz, médico indígena de formación empírica, y traducido al latín por Juan Badiano, dicho libro es un antiguo herbario, realizado a la sazón con la memoria aun viva de la caída de Tenochtitlan y plasmado con tintas hechas de la misma tierra mexicana (Martínez, M., 1991; De la Cruz, M., 1991).

El conocimiento médico de los indígenas no ha llegado en su totalidad hasta nosotros, debido a que era transmitido verbalmente de una generación a otra, sin ser escrito nunca, ya que su sistema de escritura no se prestaba para ello, pues con sus jeroglíficos solo trataban de

perpetuar la memoria de los grandes acontecimientos de su historia (Martínez, M., 1991). Otra razón por la cual se ha perdido parte del legado cultural de los médicos prehispánicos, se basa en el hecho de que la mayoría de sus conocimientos médicos eran mantenidos en secreto y frecuentemente eran disfrazados con manifiesta superchería, propia de la época (Martínez M., 1991).

La medicina indígena, de profundo arraigo religioso, se encontraba inmersa en una singular cosmovisión, característica de las culturas de Mesoamérica. Por tal razón, durante la época inicial de la conquista, fue combatida sistemáticamente por los colonizadores, quienes la consideraban como una manifestación de idolatría. Sin embargo, la actitud de los españoles con relación a la herbolaria no tardó en cambiar, ya que los conquistadores provenían de una sociedad donde la herbolaria se hallaba en pleno renacimiento y formaba parte de su propio brebaje cultural. De hecho, existían algunas similitudes entre los procedimientos herbolarios europeos e indígenas para el tratamiento de heridas, afecciones cutáneas, diarreas y un sin fin de padecimientos. De tal forma que este conocimiento conjunto, pronto pasó a formar parte de lo que hoy conocemos como Medicina Tradicional Mexicana (Lozoya X., 1984).

La Medicina Tradicional Mexicana es una herencia de conocimientos empíricos recibidos a partir de nuestros antepasados en forma oral, que se han venido transmitiendo de generación en generación hasta nuestros días.

Por otra parte, debido a que la flora mexicana es muy rica y diversa, los médicos tradicionales mexicanos, emplean una gran variedad de preparaciones de especies vegetales para tratar diferentes enfermedades. Entre los padecimientos que más comúnmente son tratados por los médicos tradicionales se encuentran las enfermedades infecciosas.

En este punto valdría la pena mencionar que una de las principales afecciones que padece la población mexicana está relacionada con los "desórdenes gastrointestinales" de etiología bacteriana, entre los cuales destacan las diarreas y las disenterías. A este respecto resulta conveniente recordar que en la actualidad la diarrea constituye la mayor causa de morbilidad y mortalidad en los países en vías de desarrollo; y debido a las condiciones biológicas, sociales y

ambientales prevaecientes en esos países, las infecciones diarreicas pueden llegar a ser endémicas y desarrollar severas pandemias (Cáceres, A. et al., 1992).

De acuerdo a datos estadísticos proporcionados por la Dirección General de Epidemiología de la SSA, se observa que el número de casos acumulados de enfermedades diarreicas por año, entre los años 1991 y 1994, no ha variado significativamente con el transcurso del tiempo, lo cual pone de manifiesto que las medidas de control no han sido las adecuadas para disminuir el porcentaje de incidencia de casos (ver figura 1) (Boletín de la Dirección General de Epidemiología de la SSA, semana 25, 1994).

La morbilidad por enfermedades diarreicas en México incluye casos de diarreas infecciosas (amibiasis, shigellosis, fiebre tifoidea, salmonelosis, otras infecciones gastrointestinales e intoxicación alimentaria bacteriana). El mayor número de casos corresponde a las llamadas, "otras infecciones intestinales" de las cuales se han reportado 797,680 casos hasta la fecha, le siguen amibiasis con 351,780 casos, salmonelosis con 26,784 casos, intoxicación alimentaria bacteriana 11,470 casos, shigellosis con 5,008 casos y fiebre tifoidea con 2,857 casos (Boletín de la Dirección General de Epidemiología de la SSA, semana 25, 1994).

En lo que se refiere a la distribución por entidades federativas, los estados que reportan el mayor número de casos por "otras infecciones intestinales" son Jalisco (79,188), México (74,992) y Yucatán (52,542); en amibiasis destacan los estados de México (33,193), Jalisco (29,968) e Hidalgo (21,240); en salmonelosis los estados de Jalisco (3,178), Coahuila (2,816) y Tabasco (2,336); en intoxicación alimentaria bacteriana los estados de Sinaloa (1,430), Veracruz (1,329) y Nuevo León (1,289); shigellosis los estados de Morelos (581), México (537) y Veracruz (390); y en fiebre tifoidea los estados de Tamaulipas (425), Zacatecas (422) y Sinaloa (267) (ver figura 2) (Boletín de la Dirección de Epidemiología de la SSA, semana 25, 1994).

Con relación a los microorganismos causales de las diarreas y disenterias, se han considerado agentes diarreicos clásicos varias especies de *Salmonella* y *Shigella*. Sin embargo,

actualmente en muchos laboratorios clínicos se están recuperando especies tales como *Campylobacter jejuni* de muestras de heces diarreicas casi con igual frecuencia que especies de *Salmonella* y *Shigella*. Asimismo algunas especies de *Vibrio*, particularmente las especies *parahaemolyticus* y *cholerae*, así como la *Yersinia enterocolitica* se reconocen también como agentes etiológicos de enfermedades diarreicas (Koneman, E. et al., 1992).

Actualmente también se han considerado como agentes etiológicos de síndromes diarreicos, algunas especies de *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Arizona* (ahora incluidas en el género de *Salmonella*), *Edwardsiella* y cepas enterotoxigénicas de *Escherichia coli*.

Otros microorganismos importantes causantes de diarreas incluyen el *Clostridium perfringens*, el *Clostridium septicum* y el *Clostridium difficile*. El primero es una causa común de enfermedad transmitida por alimentos y el segundo recientemente se ha asociado con enterocolitis hemorrágica neutropénica (Koneman, E. et al., 1992). También pueden hallarse *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* en cultivos puros de pacientes que reciben tratamiento de largo plazo con antibióticos de amplio espectro (Koneman, E. et al., 1992).

Específicamente, en México existen especies de microorganismos que son causa frecuente de diarrea y disentería, entre los que podemos encontrar principalmente: la *Aeromona hydrophila*, la *Escherichia coli*, el *Staphylococcus aureus*, el *Proteus mirabilis*, la *Pseudomona aeruginosa*, la *Salmonella typhi*, la *Shigella flexneri* el *Vibrio cholerae*, el *Vibrio parahamolyticus*, la *Yersinia enterocolitica* y algunos otros más cuya incidencia es menos significativa (ver cuadro 1) (Koneman, E. et al., 1992).

Con respecto a la terapéutica más utilizada en la actualidad para el tratamiento de las diarreas y disenterias de origen infeccioso, los fármacos más utilizados en la clínica, son antibióticos que en su mayoría son sintetizados por microorganismos, bacterias u hongos (ver cuadro 2) (Amabile, C., 1988).

Estos agentes antimicrobianos se han clasificado, de acuerdo a su estructura química y a su mecanismo de acción, en los siguientes grupos:

- 1) Los agentes que inhiben o activan la acción de enzimas que intervienen en la síntesis de las paredes de la célula bacteriana, para producir la pérdida de la viabilidad y, con frecuencia, la lisis celular. Estos agentes incluyen las penicilinas y las cefalosporinas, que tienen una estructura similar, y agentes disimiles, como la cicloserina, vancomicina, bacitracina y los agentes imidazólicos antimicóticos (miconazol, ketaconazol y clotrimazol).
- 2) Agentes que actúan en forma directa sobre la membrana celular del microorganismo, provocando un desequilibrio en la selectividad de la permeabilidad membranal. Estos antibióticos incluyen detergentes, polimixina y colistimetato, y los agentes poliénicos antimicóticos, nistatina y anfotericina B, que se une a los esteroides de la pared celular.
- 3) Los agentes que afectan la función de los ribosomas para causar una inhibición reversible de la síntesis proteica, estos agentes bacteriostáticos incluyen cloramfenicol, tetraciclinas, eritromicina y clindamicina.
- 4) Agentes que se unen a las subunidades ribosomales 30 S y alteran la síntesis de proteínas, lo cual lleva eventualmente a la lisis; éstos incluyen los aminoglucósidos.
- 5) Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos, como las rifamicinas (p. ej., rifampicina), que inhiben la RNA-polimerasa DNA-dependiente, y las quinolonas, que inhiben el superarrollamiento del DNA y su síntesis.
- 6) Los antimetabolitos, que incluyen la trimetoprima y sulfonamidas, las cuales bloquean los pasos metabólicos específicos que son esenciales para los microorganismos.
- 7) Análogos de los ácidos nucleicos, como zidovudina, ganciclovir, vidarabina y aciclovir. que se unen a las enzimas vírales que son esenciales para la síntesis de DNA deteniendo así la replicación viral.

En la actualidad se desconoce el mecanismo de acción preciso de algunos agentes antimicrobianos, por lo cual es probable, que surgan categorías adicionales a medida que se descubren mecanismos más complejos (ver cuadro 3).

Es importante mencionar que todos los agentes quimioterapéuticos antimicrobianos que se utilizan actualmente para el tratamiento de enfermedades diarreicas presentan una serie de desventajas entre las que se pueden mencionar la resistencia natural o adquirida que llegan a presentar algunos microorganismos a los antibióticos, problemas de biodisponibilidad del fármaco y las reacciones indeseables que pueden presentarse en los pacientes a los cuales se administran los antibióticos.

Con relación a la resistencia que presentan los microorganismos a los antibióticos, es posible afirmar que esta tiene su origen en el uso indiscriminado de estos fármacos, sobre todo en los hospitales, así como en la automedicación que por cierto en México se practica frecuentemente (cuadro 4).

Por otra parte, con relación a los problemas de biodisponibilidad de los antibióticos, en muchas ocasiones la dosis requerida para producir el efecto debe implicar concentraciones de absorción plasmáticas y tisulares inferiores a las concentraciones tóxicas para las células humanas, sin embargo, en ocasiones esto no es posible y por lo tanto el antibiótico es inefectivo para ejercer el efecto deseado. En otros casos, cuando los microorganismos penetran las células humanas, el antibiótico no puede introducirse fácilmente a ellas originando un efecto adverso sobre varias respuestas fisiológicas.

Para concluir con la descripción de las desventajas que presentan los antibióticos de uso más común, se pueden mencionar una serie de efectos indeseables entre los que destacan: reacciones de hipersensibilidad, colitis, trastornos del tracto urinario, trastornos del sistema hematopoyético, trastornos hepáticos, reacciones del sistema nervioso central (SNC), cambio en la composición de la microflora intestinal, disminución de varias sustancias endógenas fisiológicamente importantes e interacciones farmacológicas.

Finalmente resta comentar que en la actualidad se considera que no existe ningún antibiótico que resulte ideal para combatir los microorganismos que causan enfermedad diarreica y de hecho muchos de estos fármacos pueden hacer que los síntomas de la diarrea y la disentería se agraven (Boletín de la Dirección General de Epidemiología de la SSA; vol. 1 y 3, 1991).

■ 91 + 92 × 93 ■ 94

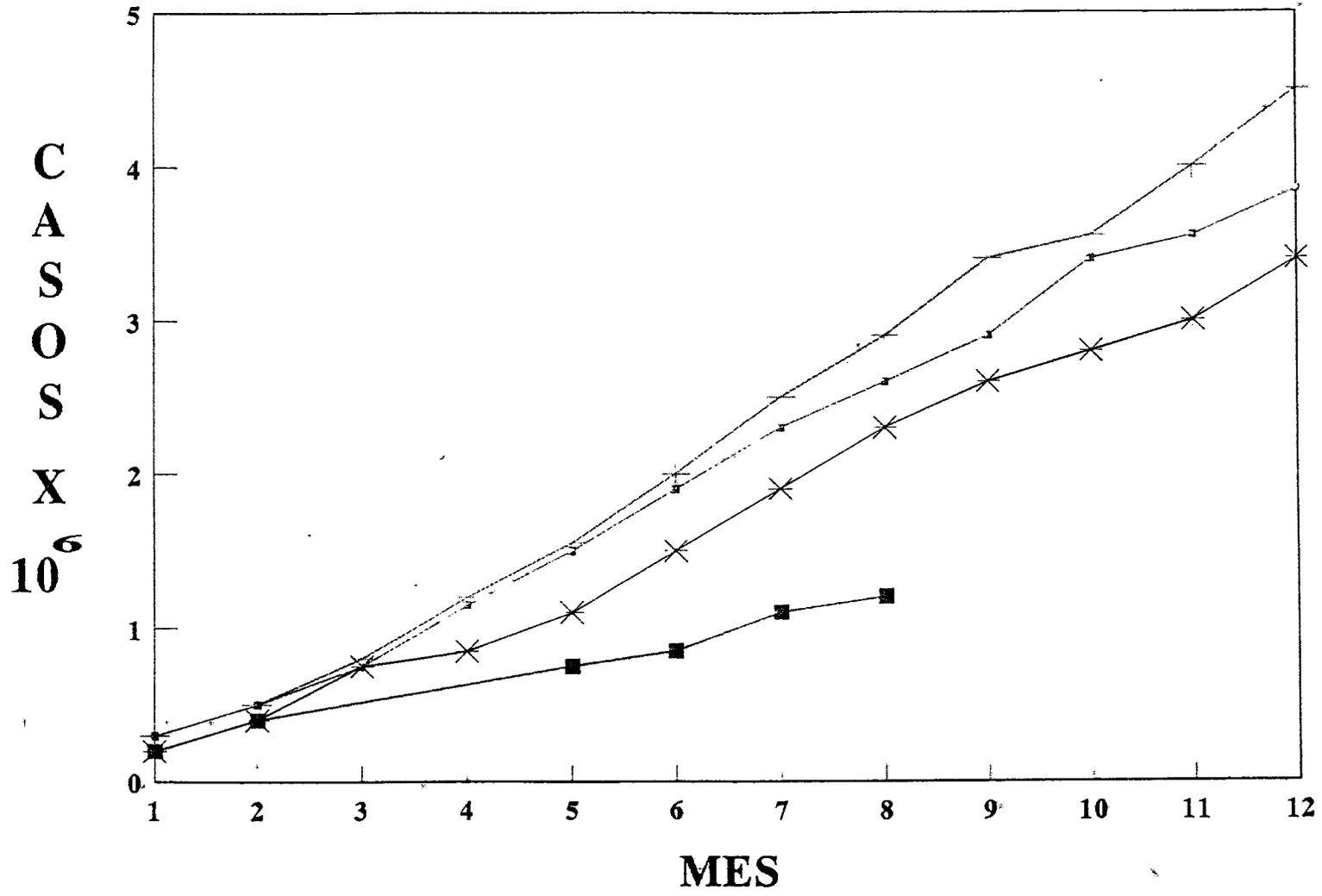
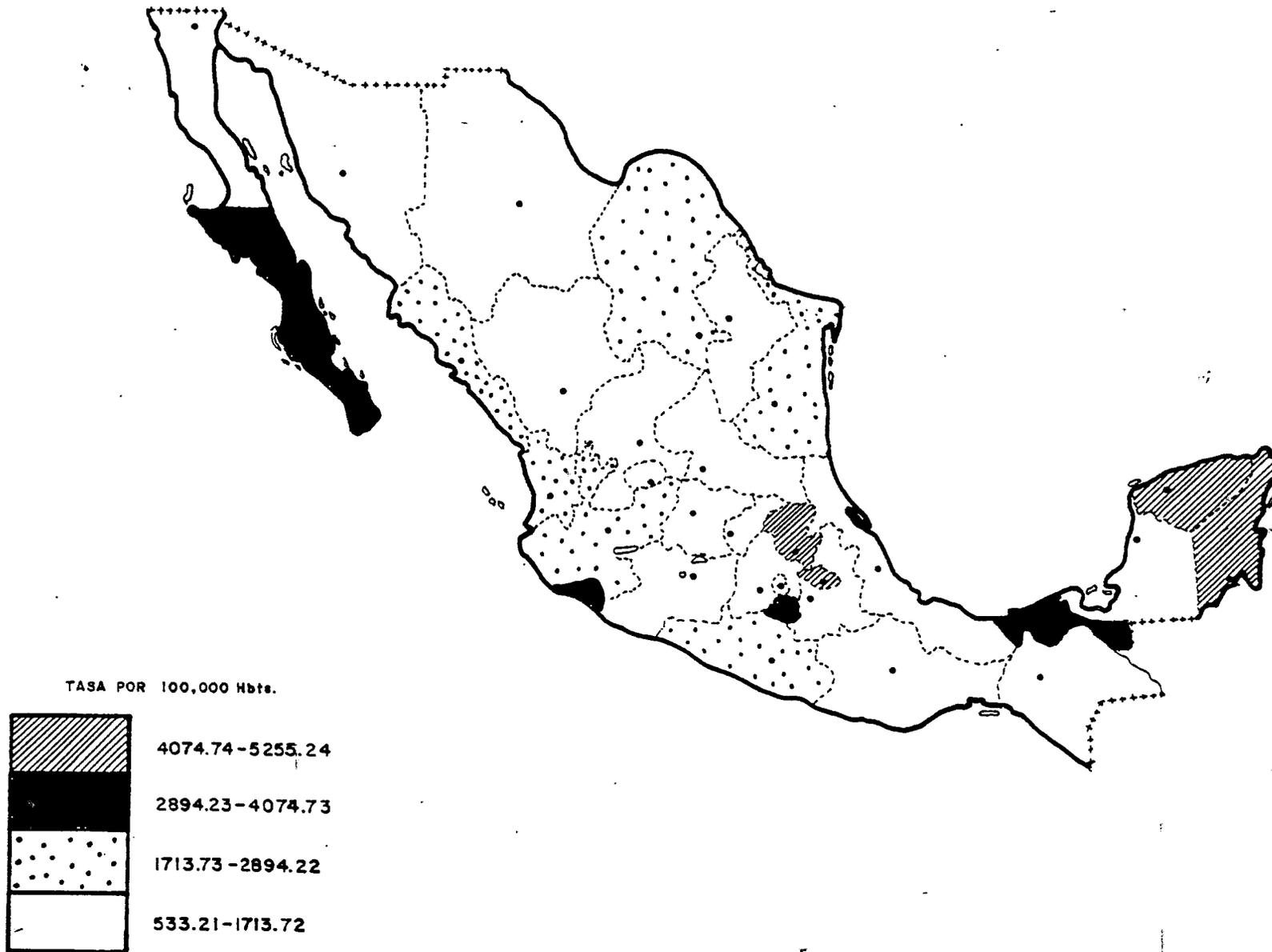


FIGURA 1. CASOS ACUMULADOS DE ENFERMEDADES DIARREICAS EN MÉXICO DE 1991 A LA SEMANA 25 DE 1994.

FIGURA 2. INCIDENCIA DE ENFERMEDADES DIARREICAS
POR ENTIDAD FEDERATIVA 1994



MICROORGANISMO	MECANISMO DE PATOGENICIDAD
<i>Aeromona hydrophila</i>	Produce una enterotoxina termolábil y una citotoxina. Y algunas especies son capaces de adherirse a la mucosa intestinal.
<i>Escherichia coli</i>	<p>Enterotoxigénica: forman enterotoxinas termolábiles y/o termoestables. La adherencia de las células bacterianas al epitelio intestinal es un requisito para la producción de toxinas. La producción de toxina esta mediada por plásmidos.</p> <p>Enteropatogénica: la patogenia no está clara; sin embargo, las reacciones inflamatorias y los cambios degenerativos epiteliales que se observan en cortes de tejidos pueden ser secundarios a propiedades adherentes de la bacteria, que se creen relacionados con plásmidos.</p> <p>Enteroinvasivas: son capaces de entrar en las células epiteliales intestinales y producir una diarrea inflamatoria similar a la causada por especies de <i>Shigella</i>. También se cree que las cepas invasivas alojan plásmidos de factores de virulencia.</p> <p>Hemorrágica: es un síndrome reconocido hace poco, probablemente secundario a daño por toxinas de células endoteliales vasculares. Se han demostrado efectos de citotoxinas en células Vero y HeLa similares a las producidas por la toxina de <i>Shigella dysenteriae</i>.</p>

Cuadro 1. Mecanismos de Patogenia de los Principales microorganismos causantes de diarreas y disenterias.

MICROORGANISMO	MECANISMO DE PATOGENICIDAD
<i>Proteus mirabilis</i>	Actua en forma similar a la Escherichia coli enterotoxigénica formando enterotoxinas. Se adhiere al epitelio intestinal para la producción de sus toxinas.
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<p>Considerando el efecto de los factores de patogenicidad, podemos agruparlos en tres tipos:</p> <p>Factores de colonización: incluyen a las fimbrias que se encuentran en todas las cepas y una capa mucosa que se encuentra en la superficie de la pared y que contribuye al anclaje de la bacteria en las células de los tejidos.</p> <p>La endotoxina de la pared: que como en otros bacilos Gramnegativos es un lipopolisacárido que causa necrosis focal en el sitio de colonización</p> <p>Las sustancias extracelulares: que incluyen dos hemolisinas, una es un glucolípido y la otra es una fosfolipasa, ambos producen destrucción total de los eritrocitos de varias especies.</p>
<i>Salmonella typhi</i>	Penetra por la pared del intestino, fijándose primeramente en este por sus adhesinas, posteriormente por su capacidad invasiva y debido a un lipopolisacárido (endotoxina) produce necrosis en el intestino delgado y llegan así a los ganglios linfáticos del mesenterio en donde se reprodu-

Cuadro 1. Mecanismos de Patogenia de los Principales microorganismos causantes de diarreas y disenterias.

MICROORGANISMO	MECANISMO DE PATOGENICIDAD
<i>Salmonella typhi</i> (continuación...)	cen en forma abundante causando graves enfermedades febriles. La producción de enterotoxinas por algunas cepas, se manifiesta por cuadros diarreicos, y son similares a las enterotoxinas de las E. coli.
<i>Shigella flexneri</i>	Produce una enterotoxina llamada toxina shiga que produce un efecto semejante a la toxina que presenta E. coli enterotoxigenica. El germen invade las células epiteliales del intestino grueso provocando un síndrome disenterico.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Producen enterotoxinas del tipo A,B, C1,C2,D,E y F que habitualmente se asocian con envenenamiento estafilocócico de alimentos humanos produciendo náuseas, vómitos, diarreas y cólicos.
<i>Vibrio cholerae</i> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Colonizan el intestino delgado, se multiplican y elaboran la toxina del cólera (TC) que estimula la actividad de adenilato ciclasa en el epitelio intestinal. La acumulación de fosfato 3', 5' cíclico de adenocina (AMPc) en las células epiteliales activa una proteína kinasa y eventualmente causa el enorme flujo de líquido y electrólitos al lumen del intestino delgado.
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Estos microorganismos poseen la capacidad de invadir la mucosa intestinal y de producir una enterotoxina termoestable similar a la de al-

Cuadro 1. Mecanismos de Patogenia de los Principales microorganismos causantes de diarreas y disenterias.

MICROORGANISMO	MECANISMO DE PATOGENICIDAD
<i>Yersinia enterocolitica</i> (continuación...)	gunas cepas de E. coli. Los factores de virulencia compartidos con otras especies del genero Yersinia, como la capacidad de sobrevivir intracelularmente, también contribuyen a la patogenia.

Cuadro 1. Mecanismos de Patogenia de los Principales microorganismos causantes de diarreas y disenterias.

MICROORGANISMO	ORDEN DE ELECCION DE LAS DROGAS		
	PRIMERO	SEGUNDO	TERCERO
<i>Aeromona hydrophila</i>	Trime-sulfa	Cloramfenicol	-----
<i>Escherichia coli</i>	Ampicilina + un aminoglucósido Una cefalosporina Aztreonam	Un aminoglucósido Una penicilina + un inhibidor de penicilinas	Trime-sulfa
<i>Proteus mirabilis</i>	Ampicilina o amoxiciclina	Una cefalosporina Un aminoglucósido	-----
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Una penicilina de amplio espectro + un aminoglucósido	Una cefalosporina Antipseudomonas + un aminoglucósido	Aztreonam Imipenem
<i>Salmonella typhi</i>	Trime-sulfa Cloramfenicol Norfloxacin o ciprofloxacina	Cefoperazona Ceftriaxona	Ampicilina
<i>Shigella flexneri</i>	Ciprofloxacina o norfloxacin	Trime-sulfa	Ampicilina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Penicilina G	Una cefalosporina	Clindamicina
<i>Vibrio cholerae</i>	Una tetraciclina	Trime-sulfa	Cloramfenicol
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>			Ciprofloxacina
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Ningun tratamiento o trime-sulfa Un aminoglucósido Cloramfenicol	Una cefalosporina	-----

Cuadro 2. Uso actual de agentes antimicrobianos en el tratamiento de diarreas y disenterias de origen infeccioso.

ANITIBIOTICO	MECANISMO DE ACCION
B-lactámicos *penicilinas *cefalosporinas	Inhibición de la síntesis de la pared celular
Aminoglucósidos *gentamicina *estreptomina *neomicina, etc.	Inhibición de la síntesis de proteínas
Cloranfenicol	
Tetraciclinas	
Macrolidos y relacionados *eritromicina *lincosamidas	
Sulfonamidas Trimetoprim	Inhibición de la síntesis de ácido fólico

Cuadro 3. Mecanismos de acción de los antibióticos

ANTIBIOTICO	MECANISMO DE RESISTENCIA
B-lactámicos *penicilinas *cefalosporinas	Destoxificación enzimática
Aminoglucósidos *gentamicina *estreptomicina *neomicina, etc.	
Cloramfenicol	
Tetraciclinas	Disminución de la entrada o de la retención en la célula
Macrólidos y relacionados *eritromicina *lincosamidas	Modificación del blanco
Sulfonamidas Trimetoprim	Síntesis de vía alterna no sensible al fármaco
Estos son los mecanismos típicos de resistencia mediada por plásmidos, cuando la resistencia está dada por mutaciones, los mecanismos son distintos. Existen, además otros tipos de resistencia debida a plásmidos aún no caracterizados bioquímicamente.	

Cuadro 4. Mecanismos de resistencia de los antibióticos.

2. ANTECEDENTES

Desde épocas remotas, el hombre ha usado extractos vegetales y productos derivados de los mismos para el tratamiento de numerosas enfermedades infecciosas. Durante mucho tiempo, el empleo de esos agentes terapéuticos y la búsqueda de otros nuevos agentes antimicrobianos de origen vegetal disminuyó debido a la gran revolución ocasionada por los antibióticos derivados de microorganismos o sus análogos sintéticos, la cual data desde los primeros ensayos clínicos de la penicilina en 1921.

Sin embargo, debido a los inconvenientes que presentan los antibióticos más utilizados en la clínica actual, entre los que destacan problemas de toxicidad y resistencia, desde la década pasada ha resurgido el interés por los agentes antimicrobianos derivados de plantas, como lo demuestra la abundante literatura que se ha publicado con relación al tema durante ese período (Mitscher, et al., 1987).

En este reciente interés por los agentes antimicrobianos de origen vegetal la medicina tradicional ha desempeñado un papel importante como criterio para la selección de plantas con principios potencialmente antimicrobianos. De manera general, las investigaciones conducentes a la obtención de antibióticos a partir de las especies vegetales se han realizado con una serie de microorganismos de prueba que incluyen bacterias gram-positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*), gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*), levaduras (*Candida albicans*) y diversos hongos. La susceptibilidad de tales microorganismos al agente potencial antimicrobiano se determina en dos fases: en la primera, se realiza un ensayo cualitativo primario que permite detectar la presencia o ausencia de actividad. En la segunda, se cuantifica la potencia relativa (Mitscher, et al., 1987). Vale la pena destacar que en la mayoría de tales investigaciones se han

empleado cepas de microorganismos ATCC, es decir cepas de investigación perfectamente estandarizadas.

A pesar de los numerosos estudios que en otras partes del mundo se han realizado, con el objeto de encontrar agentes con actividad antimicrobiana a partir de plantas empleadas en la medicina tradicional, existen muy escasas investigaciones encaminadas a validar la actividad antimicrobiana de especies que se utilizan para el tratamiento de enfermedades diarreicas de origen infeccioso.

A continuación, se presenta una descripción de los trabajos efectuados con relación a este tema, a partir de 1991.

Una evaluación parasitológica y microbiológica de plantas medicinales utilizadas por los indios Mixe del estado de Oaxaca (México), fue realizada en el Instituto de Biología Farmacéutica, Universidad Shanzlestr (Alemania) y en el Departamento de Parasitología Médica, Escuela de Higiene y Medicina Tropical en Londres (Inglaterra). Se investigó la actividad de 29 extractos de plantas contra *Entamoeba histolytica*, tres bacterias (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus*) y dos hongos (*Cladosporium cucumerinum* y *Penicillium oxalicum*). Posteriormente, se separaron los extractos con CH_2Cl_2 y H_2O y las fases resultantes también fueron evaluadas (Heinrich. M. et al., 1991). De las 29 plantas seleccionadas, 20 son usadas para tratar problemas gastrointestinales incluyendo disenterías, dolores estomacales, diarreas, vómitos, úlceras gástricas, infecciones parasitarias etc.; cinco plantas son empleadas contra infecciones de la piel y cuatro plantas son usadas para ambos de los grupos indicados. En el ensayo anti-amibiasis resultaron de particular interés dos plantas: la *Castela texana* y la *Annona muricata*, en ambos casos la actividad estuvo principalmente concentrada en la fracción lipofílica de la separación entre CH_2Cl_2 y H_2O ; también la fase CH_2Cl_2 de *Chenopodium graveolens* presento una buena actividad. De manera particular, se encontró una actividad antibacteriana altamente significativa para los extractos de *Govania polygama*, *Hyptis verticillata*, *Quercus oleoides*, *Psidium guineense*, *Smilax lanceolata* y *Walteria americana*. En la separación entre CH_2Cl_2 y H_2O , no se observó ninguna

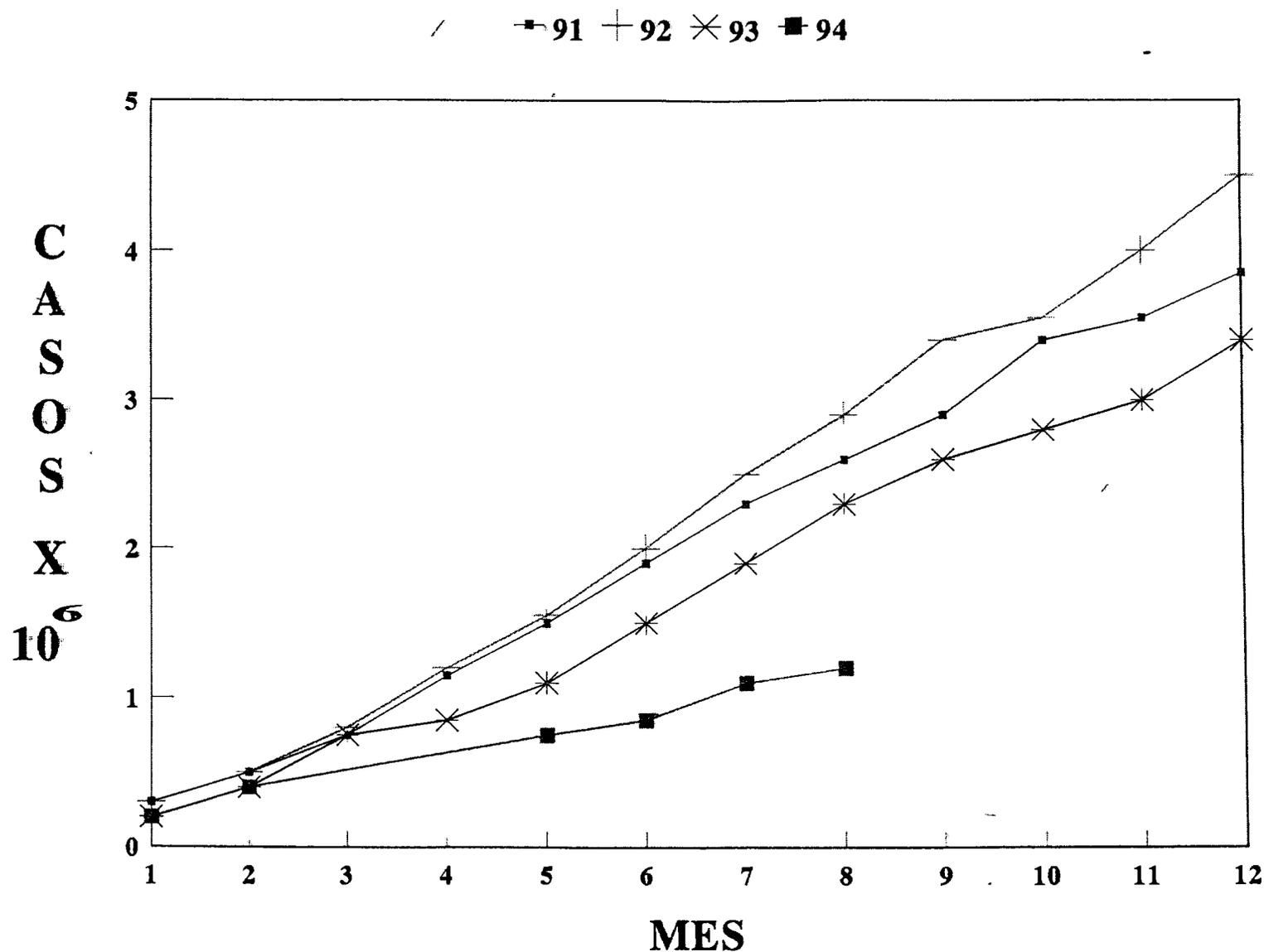


FIGURA 1. CASOS ACUMULADOS DE ENFERMEDADES DIARREICAS EN MÉXICO DE 1991 A LA SEMANA 25 DE 1994.

concentración significativa de la actividad en una de las fases, con la excepción de *Psidium guineense*. En este caso la actividad se concentró claramente en la fase de CH_2Cl_2 . *Annona muricata*, *Leonurus sibiricus* y *Waltheria americana* mostraron una fuerte actividad antifúngica; la actividad tendió a concentrarse en la fase de CH_2Cl_2 (Heinrich, M. et al., 1991).

Debido a que Guatemala cuenta con una gran variedad de especies vegetales, tomando en consideración que las poblaciones indígenas tienen una basta herencia tradicional en el empleo de plantas medicinales (Orellana, 1987) y que los desórdenes gastrointestinales son causa frecuente de problemas de salud, se llevó a cabo un estudio en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos (USAC) (Guatemala) y en el Centro para Estudios Mesoamericanos sobre Tecnología Apropriada (CEMAT) (Guatemala). Se investigaron 16 plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, confirmando su actividad contra enterobacterias (Cáceres A., et al., 1992). Se obtuvieron los extractos empleando tres solventes de diferente polaridad (n-hexano, acetona y alcohol) y su actividad in vitro fue demostrada contra las bacterias enteropatógenas, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella flexneri*. Los resultados demostraron que las especies más activas fueron *Acalypha guatemalensis*, *Diphysa robinioides*, *Lippia dulcis*, *Psidium guajava* y *Spondias purpurea* (ver cuadro 5), (Cáceres, A., et al., 1992).

Los herbolarios tradicionales de Nigeria, usan una variedad de preparaciones para el tratamiento de diferentes enfermedades, incluyendo muchas infecciones microbianas, tales como gonorrea, dolor de garganta y diarrea. En la mayoría de los casos, los herbolarios prácticos ignoran la farmacología de sus medicaciones. La desigual distribución del personal de sanidad, entre las áreas rural y urbana, no permite otra alternativa que apoyarse en el herbolario práctico. Con base en lo anterior, se realizó un estudio en el Instituto Nacional de Investigación Medica, Yaba, Lagos y en el Departamento de Microbiología Medica y Parasitología, Colegio de Medicina, Universidad de Lagos (Nigeria). Se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos y metanólicos de 10 plantas medicinales contra 19 cepas ATCC (Ólukoya, D.K. et al., 1992). Los resultados fueron alentadores, ya que todas las plantas contenían

sustancias con propiedades antimicrobianas (ver cuadro 6 y 7). Estos resultados correlacionan con la observación de trabajos previos (Adegoke, et al., 1968; Bamgbose, et al., 1979; Olukoya, et al., 1986). Fue interesante conocer la correlación entre el uso de curanderos tradicionales y la actividad antimicrobiana demostrada. Resulta notorio que los extractos metanólicos tuvieron mayor actividad que sus respectivos extractos acuosos. Se observó que algunas de las plantas tienen un gran espectro de acción. Esta observación permitió la formulación de antisépticos y desinfectantes para su utilización en quimioterapia (Olukoya, D.K. et al., 1992).

Otro estudio se realizó en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos (USAC), en el Hospital General de Enfermedades comunes, Instituto Guatemalteco de Seguridad Social (IGSS) e Instituto de Nutrición de Centro América y Panamá (INCAP), ciudad de Guatemala (Guatemala). En 1969-70 se presentó en Guatemala una pandemia de *Shigella dysenteriae* I (Mata, et al., 1970) y de *Salmonella typhi* en 1972 (Pérez Miravete, 1973). En Julio de 1991 en Guatemala se detectó el primer caso de *Vibrio cholerae* 01, cerca de la frontera con México. Desde entonces todo el país resultó afectado, ya que más de 2000 personas se enfermaron, de las cuales aproximadamente el 20% fueron confirmadas bacteriológicamente y un 80% murieron (Anon, 1991). Sanidad Pública y las autoridades de Seguridad Social, establecieron el diagnóstico y las medidas de prevención para minimizar el impacto de la epidemia (Torres, et al., 1991). Por lo anterior, se investigó la actividad de 5 plantas de América Central, empleadas popularmente para el tratamiento de infecciones contra cepas de *Vibrio cholerae* 01 (Cáceres, A. et al., 1992).

La evaluación se llevó a cabo en dos fases, en la primera se evaluó la tintura de las 5 especies vegetales, usando 13 cepas de *Vibrio cholerae* 01, en la segunda fase se realizó la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto que presentó la mayor actividad (etanólico, acuoso, n-hexánico y aceite esencial). En la segunda fase, se demostró que los extractos hexánicos tienen la mejor actividad, todas las cepas presentaron actividad con grandes diámetros de inhibición (diámetros de 8 mm). Los extractos acuosos y etanólicos

tuvieron una actividad intermedia (6 a 8 mm) y el aceite esencial no presentó actividad (ver cuadro 8). La CIM (obtenida por el método de disco) de las 13 cepas fue de 10 ug (Cáceres, A. et al., 1992).

En el folklore de la medicina Argentina, también se emplean muchas plantas para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como catarro, bronquitis, neumonía, úlceras y diarreas (Hieronymus, 1982; Barbotto, 1964; Ratera y Ratera, 1980; Tousarkissian, 1980; Martínez Crovetto, 1981). Se han realizado numerosos estudios para determinar la actividad antimicrobiana de plantas del Sur de América (Bhakuni, et al., 1982; Broussalis, et al., 1981; Wachsmann, et al., 1982; Broussalis, et al., 1983; Gutkind, et al., 1984), así como la identificación de compuestos activos (Bandoni, et al., 1972; Meidina, et al., 1977). En un trabajo realizado por Claudia Anesini y Cristina Pérez en la Universidad de Buenos Aires, se obtuvieron 132 extractos de plantas medicinales con actividad antimicrobiana de Argentina, usando una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la penicilina "G"; *Escherichia coli* y *Aspergillus niger* como microorganismos de prueba (Anesini C. y Pérez C., 1993).

Se obtuvieron las curvas concentración-respuesta de los antibióticos estándar seleccionados, usando el método de difusión en agar, los extractos obtenidos al hervir en agua el material vegetal, fueron probados y doce especies resultaron activas contra *Staphylococcus aureus*, mientras que cuatro contra *Aspergillus niger*.

Estos resultados apoyan el uso tradicional de las plantas evaluadas para el tratamiento de infecciones microbianas incluyendo las causadas por *Staphylococcus aureus* resistente a la penicilina "G", razón por lo cual estas plantas pueden proveer interesantes alternativas para nuevos antibióticos. En la Medicina Tradicional las especies *Punica granatum* y *Psidium guineense* son utilizadas para el tratamiento de diarreas, en tanto que *Lithrea ternifolia* y *Origanum* se utilizan para la terapia de bronquitis y neumonía, etc. (Ratera y Ratera, 1980; Martínez-Crovetto, 1981). La actividad antimicrobiana mostrada por *Prosopis strombulifera*, *Punica granatum* y *Psidium guineense* contra *Escherichia coli* apoya su uso para el tratamiento de infecciones cuyos síntomas pueden concernir a bacterias gram-negativas, por lo que se

justifica su uso en el tratamiento de diarreas, disenterias y laringitis y la *Lithrea ternifolia* puede emplearse para tratar enfermedades del tracto respiratorio (Ratera y Ratera, 1980; Martínez-Crovetto, 1981). Entre las plantas que fueron activas contra *Aspergillus niger*, están el *Allium sativum* que comúnmente es empleado en dolor de oído y el *Citrus sinensis* para tos. Esta observación puede ser útil para el aislamiento de sus principios, a un costo reducido (Anesini C. et al., 1993).

Existe otro trabajo realizado en el Departamento de Química Bioorgánica, Universidad de Pisa (Italia), donde se evaluó la composición y propiedades antimicrobianas de 4 aceites esenciales contra algunas bacterias estándar y cepas de hongos, sobre una base cuantitativa mediante la concentración inhibitoria mínima (CIM) y su concentración bactericida mínima (CBM) (Panizzi L. et al., 1993). Los resultados fueron satisfactorios existiendo relación entre inhibición y la composición química de las especies estudiadas (ver cuadro 9), (Panizzi, L. et al., 1993).

Por otra parte, en la Universidad de Ilorin, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Universidad Federal de Tecnología, Mina (Nigeria), P.I. Alade y O.N. Irobi evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto de las hojas crudas de *Acalypha sp.* Los extractos acuoso y etanólico inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans* y *Aspergillus flavus*. Los extractos acuosos no ejercieron acción inhibitoria sobre *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis*, mientras el extracto etanólico fue activo. La concentración inhibitoria mínima de los extractos se encontró entre un rango de 0.25 y 32mg/ml, mientras la concentración bactericida mínima fue entre 1.0 y 64mg/ml (ver cuadro 10) (Alade P.I. et al., 1993).

Fue posible obtener información acerca de una investigación realizada en Bulgaria, en el Instituto de Química Orgánica, Academia de Ciencias de Bulgaria y en Centro Nacional de Higiene y Medicina Ecológica, también en Bulgaria. I.N. Kostova, N.M. Nikolov y L.N. Chipilska examinaron el efecto antimicrobiano de las hydroxycoumarinas: esculina, esculetina, fraxina y fraxetina contra *Staphylococcus aureus*, *Candida sp.*, *Escherichia coli* y *Pseudomona*

aurogenosa y lo compararon con cinco extractos de la corteza de *Fraxinus ornus* I (Kostova, J.N. et al., 1993). La corteza de *Fraxinus* en la Medicina Folklorica de Bulgaria se emplea para el tratamiento de varias enfermedades y la curación de heridas (Stoyanov, 1973; Asenov y Nikolov, 1988). Los resultados obtenidos indican que las hidroxycumarinas: esculetina, fraxina y fraxetina son las principales responsables de las propiedades antimicrobianas de los extractos de la corteza de *Fraxinus ornus* (Kostava, J.N. et al., 1993).

Finalmente, en Rhodesia-Zimbabwe, en el Departamento de Farmacia, en la Universidad de Zimbabwe se estudiaron las propiedades antibacterianas y antifúngicas de varios extractos obtenidos a partir de la corteza de *Dalbergia melanoxylon* (metanólico, con ácido cítrico, acuoso, con diclorometano y etéreo). Los resultados obtenidos se muestran en los cuadros 11 y 12. Esta investigación demostró que los extractos exhiben actividad bacteriostática a bajas concentraciones y actividad bactericida a concentraciones altas. Los extractos obtenidos con ácido cítrico y CH_2Cl_2 mostraron una actividad antifúngica comparable a la nistatina (Gundidza, M. et al., 1993).

PLANTA	SOLVENTE	BACTERIA INVESTIGADA			CMI (mg de extracto)
		A (mm)	B(mm)	C(mm)	
<i>Acalypha guatemalensis</i>	Metanol	6	6	10	<i>S. typhi</i> , > 10
<i>Buddleja americana L.</i>	Etanol	6	8	8	<i>S. flexneri</i> , > 10
<i>Byrsonima crassifolia</i>	Etanol	6	10	6	<i>S. typhi</i> , > 10
	Acetona	6	13	6	
<i>Casimiroa edilis</i>	Acetona	6	6	8	<i>S. flexneri</i> , 8
<i>Diphysa robinoides</i>	Etanol	9	8	14	<i>S. typhi</i> , 5
	Acetona	7	6	14	<i>S. flexneri</i> , 5
<i>Lippia dulcis Trev.</i>	Acetona	8	6	9	<i>S. flexneri</i> , 10
<i>Prunus capuli Cav.</i>	Etanol	6	6	8	<i>S. flexneri</i> , > 10
	Acetona	6	6	8	<i>S. typhi</i> , 8
<i>Psidium guajava L.</i>	Metanol	9	8	13	<i>S. flexneri</i> , > 10
	Acetona	7	6	14	
<i>Spondiaspurpurea</i>	Metanol	12	9	19	<i>S. flexneri</i> , 10
<i>Wigandia caracasana</i>	Etanol	6	9	6	<i>S. typhi</i> , 5
	n-Hexano	6	10	6	

Diametro del reservorio = 6mm

A: *Escherichia coli enteropatogéna.*

B: *Salmonella typhi*

C: *Shigella flexneri*

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

PLANTA	MICROORGANISMO																					
	SA		STA		STB		STC		STD		STF		STG		NG		EC		ECT		ST	
	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A
<i>Asparagus africanus</i>	2+	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1+	0
<i>Boerhavia diffusa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2+	2+	1+	1+	0	0	0	0	3+	3+
<i>Cumbretum racemosum</i>	3+	0	0	0	2+	0	0	0	0	0	0	0	2+	2+	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Emilia coccinea</i>	2+	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Grewia carpinifolia</i>	2+	0	2+	3+	0	0	2+	2+	0	0	0	0	0	0	2+	2+	0	0	0	0	0	0
<i>Lannea welwitschii</i>	2+	2+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2+	2+	0	0	0	0	0	0	2+	2+
<i>Phyllanthus discoideus</i>	2+	2+	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	2+	2+	2+	2+	1+	0	2+

E. etanol; A. Acuoso; 0, no inhibición; 1+, zona de inhibición, de 5-9mm;

2+, zona de inhibición de 10-19mm; 3+ zona de inhibición ≥ 20 ;

EC, *Escherichia coli*; NCTC 10 418; ECT, *Escherichia coli* aislada de la localidad;

NG, *Neisseria gonorrhoeae*; SA, *Staphylococcus aureus*; STA, *Streptococcus* grupo A;

STB, *Streptococcus* grupo B; STC *Streptococcus* grupo C; STD, *Streptococcus* grupo D;

STF, *Streptococcus* grupo F; STG, *Streptococcus* grupo G; ST, *Salmonella typhimurium*.

PLANTA	MICROORGANISMOS																				
	SD		Y		P		K		PS		B		CD		CT		BF		BM		
	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	E	A	
<i>Anthocleista vogelii</i>	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	1+	0	0	0
<i>Asparagus africanus</i>	1+	0	0	0	0	0	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Boerhavia diffusa</i>	3+	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3+	2+	0	0	0	0	0	0	0
<i>Combretum bracteatum</i>	0	0	0	0	0	0	1+	1+	0	0	0	0	0	1+	0	0	1+	1+	0	0	0
<i>Combretum racemosum</i>	3+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3+	1+	2+	0	0	0	3+	0	0
<i>Emilia coccinea</i>	0	0	2+	0	0	0	2+	2+	2+	0	0	0	0	0	0	0	2+	0	0	0	0
<i>Grewia carpinifolia</i>	0	0	2+	0	2+	2+	0	2+	0	0	0	0	3+	3+	0	0	2+	0	2+	0	0
<i>Ipomeoa involucrata</i>	0	0	0	0	0	0	1+	1+	0	0	0	0	1+	1+	0	0	1+	1+	0	0	0
<i>Lanea welwitsschii</i>	3+	3+	3+	2+	2+	0	2+	0	2+	2+	2+	0	0	3+	2+	0	0	0	3+	0	0
<i>Phyllanthus discoideus</i>	0	2+	2+	2+	2+	2+	0	2+	2+	2+	0	0	0	2+	0	0	0	0	0	0	2+

0, no inhibición; 1+ zona de inhibición de 5-9mm de diametro; 2+ zona de inhibición de 10- 19mm; 3+, > = 20mm; B, *Bacillus subtilis*; BF, *Bacteroides fragilis*; BM, *Bacteroides melaninogenicus*; CD, *Corynebacterium diphtheriae*; CT, *clostridium tetani*; K, *Klebsiella pneumoniae*; P, *Proteus vulgaris*; PS, *Pseudomonas pyocyanea*; SD, *Shigella dysenteriae*; Y, *Yersinia enterocolitica*.

PLANTA	MEDIDA DEL DIAMETRO (MM)
<i>Physalis philadelphica</i>	6
<i>Psidium guajava</i>	6
<i>Smilax lundellii</i>	6
<i>Solanum nigrescens</i>	6
<i>Tagetes lucida</i>	9

MICROORGANISMO	<i>Satureja montana</i>		<i>Calamintha nepeta</i>		<i>Thymus vulgaris</i>		<i>Rosmarinus officinalis</i>	
	CMI (ug/ml)	CBM	CMI (ug/ml)	CBM	CMI (ug/ml)	CBM	CMI (ug/ml)	CBM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	5	5	5	5	5	5	20	20
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	40	40	10	10	2	2	40	40
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 14207	No hay actividad		20	20	No hay actividad		No hay actividad	
<i>Bacillus subtilis</i> BGA	5	5	2	2	2	2	10	10
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ISS MC 40	5	5	5	5	2	2	5	5
<i>Candida albicans</i>	5	5	5	5	1	1	10	10

Cuadro 9. Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).

MICROORGANISMO	ZONA DE INHIBICION (mm)				CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (mg/ml)	
	E	A	C	K	E	A
	(30mg)	(30mg)	(10mg)	(130mg)		
BACTERIA						
<i>Staphilococcus aureus</i>	10	15	12	NP	2	4
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	12	8	15	NP	2	2
<i>Pseudomona flavescence</i>	15	4	20	NP	4	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	0	9	NP	8	NP
<i>Proteus mirabilis</i>	10	0	12	NP	2	NP
HONGOS						
<i>Trichophyton rubrum</i>	14	12	NP	16	0.25	32
<i>Trichopyton mentagrophytes</i>	12	12	NP	16	1.00	32
<i>Aspergillus flavus</i>	10	15	NP	17	16	4
<i>Candida albicans</i>	3	3	NT	16.5	2	4

NT, No aprobado; E, extracto etanólico; A, extracto acuoso; C, control antibacterial ciproflazacin (10 mg); K, control antifúngico ketoconazol (120mg).

BACTERIA	ETANOL		ACIDO CITRICO		TETRACICLINA/PENICILINA	
	CIM (ug/ml)	CBM (ug/ml)	CIM (ug/ml)	CBM (ug/ml)	CIM (ug/ml)	CBM (ug/ml)
<i>Bacillus subtilis</i>	48	49	2.81	5.72	3.31	13.1
<i>Escherichia coli</i>	100	120	6.25	12.5	12.5	25.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	132	138	11.83	24.0	13.3	51.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	130	6.25	12.5	100	135
<i>Salmonella typhimurium</i>	125	140	50	65	12.5	50.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	49	101	3.35	12.6	103	139
<i>Yersinia pestis</i>	125	142	50	65	12.5	100

CIM, Concentración Inhibitoria Mínima; CBM Concentración Bactericida Mínima.

FRACCION (0.625 mg/ml)	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Etanol	8,2	11,2
Acido citrico	59,1	55,7
Diclorimetano	62,8	61
Eter de petróleo	0	0
Nistatina	70,3	75,4

La inhibición está expresada como porcentaje relativo a los controles de prueba.

Cuadro 12. Propiedades antifúngicas de los extractos de *Dalbergia melanoxylon*.

3. JUSTIFICACION

Como ya se mencionó con anterioridad, a la fecha se considera que las enfermedades diarreicas de origen infeccioso constituyen uno de los padecimientos que más afectan a la población de nuestro país. Asimismo, es obvio que en la actualidad el tratamiento de dichas afecciones no es precisamente el ideal, ya que por una parte, o los antibióticos más comúnmente empleados no son completamente efectivos contra los microorganismos o por otra parte, el uso de tales antibióticos, origina una serie de efectos indeseables que implican problemas de resistencia o toxicidad.

Por esta razón es claro que existe la necesidad de buscar alternativas para la obtención de nuevas fuentes de antibióticos, entre las que podemos mencionar a las plantas medicinales. A este respecto, si se considera que México posee una gran tradición en el empleo de plantas para el tratamiento de padecimientos diarreicos y que nuestro país cuenta con una gran riqueza de flora medicinal, resulta evidente que las plantas mexicanas constituyen una fuente potencial valiosa de principios activos con actividad antimicrobiana, que podrían proporcionar una solución alterna para el tratamiento de las infecciones diarreicas. Sin embargo, a la fecha los estudios encaminados a comprobar científicamente las propiedades antimicrobianas de dichas especies vegetales, son muy escasos.

Por tal motivo, surgió la idea de plantear un proyecto de investigación cuya finalidad principal fuera comprobar científicamente la actividad antimicrobiana de 15 plantas, empleadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de trastornos gastrointestinales entre las que se incluyen las diarreas y las disenterias. Considerando también que los estudios farmacológicos efectuados sobre esas plantas son escasos, se pensó que resultaba interesante evaluar dichas especies mediante una prueba sencilla como lo

es el ensayo de determinación de toxicidad para *Artemia salina*; a fin de detectar de manera preliminar un posible efecto citotóxico que pudiera estar correlacionado con la actividad antimicrobiana.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos generales:

- 4.1.1. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las especies vegetales: *Chenopodium graveolens*, *Commelina diffusa*, *Conyza filaginoides*, *Croton fragilis*, *Datura lanosa*, *Dononaea viscosa*, *Dyssodia pinnata*, *Gymnosperma glutinosum*, *Lepidium virginicum*, *Lopezia racemosa*, *Parthenium tomentosum*, *Potentilla thurberi*, *Pterogonum atrorubens*, *Salvia heliaelanthemifoliay* *Zornia dyphila* (Cuadro 13), sobre diez cepas de enterobacterias patógenos (Cuadro 14).
- 4.1.2. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de los extractos de las especies que resultaran activas en la evaluación cualitativa y comparación de su potencia con los controles positivos adecuados.
- 4.1.3. Evaluación de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las especies objeto de estudio, a fin de determinar su toxicidad para *Artemia salina*.

4.2. Objetivos específicos:

- 4.2.1. Preparación de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las plantas objeto de estudio mediante el método de extracción continua en Soxhlet.
- 4.2.3. Realización del análisis fitoquímico cualitativo de las especies vegetales seleccionadas empleando el método de Cuin y Col.
- 4.2.4. Determinación de la toxicidad para *Artemia salina* de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las plantas objeto de estudio.

- 4.2.5. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales sobre los microorganismos de prueba y obtención de las concentraciones críticas mínimas de inhibición.
- 4.2.6. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de los extractos que resultaran activos en la evaluación cualitativa.
- 4.2.7. Comparación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de los extractos activos con las respectivas concentraciones inhibitorias mínimas de los controles positivos seleccionados para cada microorganismo.
- 4.2.8. Correlación de los resultados obtenidos con la información existente en la literatura con respecto a la composición química y la actividad farmacológica de las plantas estudiadas y especies relacionadas.

NOMBRE BOTANICO	NOMBRE COMUN	LOCALIZACION	USOS
<i>Chenopodium graveolens</i>	Epazote de zorrillo	Valle de México	Antihelmintico
<i>Commelina diffusa</i>		Querétaro	Cólicos
<i>Conyza filaginoides</i>	Simonillo	Valle de México	Desordenes gastrointestinales
<i>Croton fragilis</i>	Tanché	Valle de México	Desordenes gastrointestinales
<i>Datura lanosa</i>	Toloache	Hidalgo	Desordenes gastrointestinales
<i>Dononaea viscosa</i>	Chapuliztle	Valle de México	Desordenes gastrointestinales
<i>Dyssodia pinnata</i>	Torzón	Chihuahua	Cólicos
<i>Gymnosperma glutinosum</i>	Escobilla	Guanajuato	Desordenes gastrointestinales
<i>Lepidium virginicum</i>	Lentejilla	Valle de México	Desordenes gastrointestinales
<i>Lopezia racemosa</i>	Perilla	San Luis Potosí	Desordenes gastrointestinales
<i>Parthenium tomentosum</i>		Guerrero	Desordenes gastrointestinales
<i>Potentilla thurberi</i>	Hierva colorada	Nayarit	Desordenes gastrointestinales
<i>Pterogonum atrorubens</i>	Hierva colorada	Valle de México	Desordenes gastrointestinales
<i>Salvia heliaelianthemifolia</i>	Manto de la virgen	San Luis Potosí	Desordenes gastrointestinales
<i>Zornia dyphilla</i>	Hierba de la víbora	Valle de México	Desordenes gastrointestinales
		Sinaloa	Desordenes gastrointestinales
		Oaxaca	Desordenes gastrointestinales

Cuadro 13. Especies vegetales seleccionadas.

MICROORGANISMO	PATOGENIA
<i>Aeromona hydrophila</i>	Enfermedad diarreica aguda de corta duración y acompaña a un síndrome que se asemeja mucho al cólera.
<i>Escherichia coli</i>	Enterotoxigénica: produce una diarrea secretora "diarrea del viajero" similar a la producida por <i>V. cholerae</i> . Enteropatógena: síndromes diarreicos - moderados. Enteroinvasiva: diarrea inflamatoria similar a la causada por especies de <i>Shigella</i> . Hemorrágica: diarrea hemorrágica.
<i>Proteus mirabilis</i>	Gastroenteritis.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gastroenteritis
<i>Salmonella typhi</i>	Gastroenteritis (diarrea leve a fulminante), fiebres entéricas.
<i>Shigella flexneri</i>	Síndrome disentérico (disenteria bacilar).
<i>Staphylococcus aureus</i>	Intoxicación alimentaria, enteritis, peritonitis, absceso de hígado, enterocolitis estafilocócica (pseudomembranosa).
<i>Vibrio cholerae</i>	Gastroenteritis: diarrea intensa que conlleva a la deshidratación.
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Gastroenteritis aguda
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritis, peste.

Cuadro 14. Microorganismos de prueba.

5. METODOLOGIA

5.1. Material vegetal.

La recolecta del material vegetal se realizó en las localidades donde fueron previamente identificadas las especies que fueron seleccionadas para este estudio.

Las especies *Chenopodium graveolens*, *Commelina diffusa*, *Conyza filaginoides*, *Croton fragilis*, *Datura lanosa*, *Dononaea viscosa*, *Dyssodia pinnata*, *Gymnosperma glutinosum*, *Parthenium tomentosum*, *Potentilla thurberi*, *Pterogonum atrorubens* y *Zornia dyphilla* fueron proporcionadas por el Dr. Bye, del jardín botánico de la U.N.A.M.; en tanto que *Lepidium virginicum*, *Lopezia racemosa* y *Salvia heliaelianthemifolia* fueron recolectadas e identificadas por la M.C. Valentina Serrano del Herbario de la U.A.Q.

El material vegetal se secó al aire y se pulverizó en un molino convencional.

5.2. Preparación de los extractos vegetales.

Se prepararon los extractos clorofórmico y metanólico de las plantas objeto de estudio a fin de extraer compuestos de intermedia y elevada polaridad respectivamente.

Se empleó un método de extracción continua por Soxhlet utilizando 15 g de material vegetal seco y molido y 150 ml de disolvente. El tiempo de extracción fue de diez horas

Posteriormente, los extractos vegetales fueron evaporados hasta sequedad en un rotaevaporador.

5.3. Análisis Fitoquímico Cualitativo.

El análisis cualitativo se llevó a cabo mediante reacciones sencillas y rápidas de efectuar, con la finalidad de detectar de manera preliminar los metabolitos secundarios presentes en las plantas.

5.3.1. Reacción de Lieberman-Bouchard (determinación de saponinas).

2 mg de extracto se colocaron en una cápsula de porcelana, se adicionaron 3 gotas de anhídrido acético concentrado, mezclando perfectamente y se adicionó 1 gota de H_2SO_4 concentrado. Se observaron cambios de coloración en un lapso de 15 minutos, a los 2, 5, 10, 15 minutos.

Los esteroides presentan inmediatamente una coloración roja, magenta, azul o verde. Los terpenoides se manifiestan después de un tiempo por una coloración roja muy estable durante y después de 15 minutos.

5.3.2. Determinación de Taninos.

Se adicionaron 2 ml de agua destilada a 10 mg de extracto y 2 ó 3 gotas de cloruro de sodio al 10% para precipitar las proteínas, posteriormente se filtró.

El filtrado se trabajó de la siguiente manera:

- a) Se tomaron 0.5 ml del filtrado y se adicionaron 2 gotas de agua de bromo. La aparición de precipitado indica la presencia de taninos.
- b) A 0.5 ml del filtrado, se adicionó una gota de solución de cloruro férrico al 1% . La aparición de una coloración azul-verde, confirma la presencia de compuestos fenólicos.

5.3.3. Determinación de azúcares reductores.

Debido a que estos compuestos se detectan en medio alcalino, 20 mg de extracto se disolvieron en 2 ml de agua destilada y se alcalinizó la solución hasta un pH entre 10 y 11 con NaOH al 10% , posteriormente se filtró.

A 0.5 ml del filtrado se le adicionaron 0.5 ml del reactivo de Benedict (ver apéndice I) y 1 ml de agua destilada, se calentó la mezcla en baño maría durante 5

minutos. Al mismo tiempo se prepararon un estándar positivo y un blanco utilizando en este último 0.5 ml de agua destilada como muestra.

La aparición de un precipitado rojo ladrillo confirma la presencia de azúcares reductores.

5.3.4. Determinación de alcaloides.

40 mg de extracto se disolvieron con 6 ml de HCl al 10% mediante calentamiento en baño maría, posteriormente se filtró la solución. El filtrado se dividió en 3 porciones iguales de 2 ml y se ensayó con los siguientes reactivos:

- a) Reactivo de Mayer. A la primera porción del filtrado se le adicionaron 3 gotas del reactivo de Mayer (ver apéndice I) y se observó el cambio. Una coloración amarillo verdosa indica la presencia de alcaloides.
- b) Reactivo de Dragendorff. A la segunda porción del filtrado se le adicionaron 3 gotas del reactivo de Dragendorff (ver apéndice I), se mezcló perfectamente observando si la solución cambiaba su color. La aparición de una coloración naranja indica positividad para alcaloides.
- c) Reactivo de Hager. Se adicionaron 3 gotas del reactivo de Hager (ver apéndice I) a la tercera porción del filtrado, se dejó en reposo la mezcla por 2 minutos, al cabo de este tiempo se observó la solución. La aparición de una coloración amarilla indica la presencia de alcaloides.

5.3.5. Determinación de Flavonoides.

40 mg de extracto fue diluido con 5 ml de etanol hasta formar una solución amarillo verdosa que posteriormente se dividió en 3 porciones iguales de 1 ml:

- a) A la primera porción se adicionó de 1 a 2 gotas de HCl concentrado, observando cambio en la coloración de la solución. Una coloración roja indica presencia de auronas.

Si no aparece coloración roja, se adiciona un trozo de magnesio metálico, si están presentes en la muestra compuestos flavonoides aparecerán las siguientes coloraciones:

- flavonas: naranja a rojo,
 - flavonoles: rojo a rojo intenso,
 - flavononas: carmesí o magenta,
 - chalconas: no hay cambio de color.
- b) La segunda porción se depositó en una cápsula de porcelana, se concentró la muestra por evaporación en baño maría y se adicionó 1 gota de H_2SO_4 concentrado, observando algún cambio en la coloración. La presencia de compuestos flavonoides origina las siguientes coloraciones a la solución:
- flavonas: amarilla,
 - flavonoles: rojo oscuro a guinda,
 - flavononas: naranja,
- c) A la tercera porción se le adicionó de 2 a 3 gotas de NaOH al 10%, se mezcló perfectamente observando cambio en la coloración. La aparición de las siguientes coloraciones indican la presencia de compuestos flavonoides:
- flavonas: amarillo a rojo intenso,
 - flavonoles: café naranja,
 - chalcona: púrpura,
 - xantonas: amarillo.

5.3.6. Determinación de Glicósidos cianogenéticos.

Se impregnó una tira de papel filtró con reactivo de Guinard (ver apéndice I) dejándose secar a temperatura ambiente. 40 mg de extracto se depositaron en un tubo de ensaye y se adicionó 1 ml de cloroformo, calentándose a baño maría, colocando a la vez en la boca del tubo la tira de papel filtró. La aparición de una

coloración rosa a roja en el papel filtró se considera positiva por la reacción que se lleva a cabo entre el grupo ciano y el reactivo de Guirnard.

5.3.7. Determinación de Glicósidos cardiotónicos.

Se disolvieron 40 mg de extracto en 2 a 3 gotas de piridina y se adicionó una gota de solución de nitroprusiato de sodio al 0.5% y 4 gotas de KOH 2N. La aparición de una coloración roja se considera positiva.

5.4. Determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las plantas objeto de estudio.

Se prepararon soluciones de los extractos clorofórmicos y metanólicos disolviendo 20 mg en 2 ml de los solventes correspondientes. De estas soluciones se transfirieron 10, 100 y 1000 ul a viales de manera independiente y por triplicado. Se dejó evaporar el disolvente a sequedad y posteriormente se aforó cada vial con 5 ml de sal de mar (Ocean) obteniéndose así concentraciones de 20, 200 y 2000 ug/ml, respectivamente (Anderson, et al., 1991).

Después de incubar los huevecillos de *Artemia salina* en sal de mar (Ocean) a 25 grados centígrados y durante 48 horas, se transfirieron 10 larvas a cada uno de los viales conteniendo los extractos de prueba. Transcurridas 24 horas, se registró el número de organismos sobrevivientes. Los resultados se procesaron mediante un análisis de probit (Lieberman, 1983) para calcular la concentración letal cincuenta (CL50).

5.5. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y de los controles positivos sobre los microorganismos de prueba, empleando el método de difusión en agar.

De manera general el método de difusión en agar consiste en el empleo de placas de agar nutritivo previamente inoculado con una solución estándar del microorganismo de prueba, en cuya superficie se colocan reservorios conteniendo las muestras a evaluar a diferentes concentraciones. Después de un periodo de incubación adecuado, si la muestra tiene

propiedades antimicrobianas, se observa una zona de inhibición del crecimiento alrededor de los reservorios como resultado del efecto de la muestra problema la cual difundió en el agar alrededor de los reservorios.

En el caso del presente trabajo los reservorios seleccionados fueron discos de papel filtró especialmente utilizado para la realización de pruebas antimicrobianas (Shleicher & Shuell). Los discos fueron impregnados con 90 ul de las soluciones de las sustancias de prueba. Cabe hacer la aclaración que el volumen de la solución utilizado (90 ul), era la cantidad necesaria para saturar los discos de papel. En el caso de los extractos vegetales se prepararon soluciones a concentraciones de 44.4 mg/ml, 22.2 mg/ml, 11.1 mg/ml y 5.5 mg/ml, de tal forma que al aplicar los 90 ul se obtenían en el disco cantidades finales de 4 mg, 2 mg, 1 mg y 0.5 mg respectivamente. Es importante mencionar que en todos los casos se dejaron evaporar los disolventes en los cuales se disolvieron los extractos y los antibióticos.

Con relación a la cantidad de control positivo utilizado para cada microorganismo, en primer término fue necesario determinar las respectivas concentraciones críticas mínimas de inhibición (CCMI), (concentración mínima que es capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo en las condiciones del experimento), a fin de obtener las cantidades de antibiótico apropiadas para la evaluación. Para tal efecto, en primer lugar fue necesario probar la susceptibilidad de los microorganismos a diferentes antibióticos mediante el empleo de sensidiscos comerciales (Bigaux).

Una vez seleccionado el antibiótico y obtenidas las concentraciones a las cuales el microorganismo presentó la mayor inhibición, se eligieron dos concentraciones mayores y dos concentraciones menores, las cuales fueron evaluadas mediante el método de difusión en agar para obtener datos que permitieran la construcción de curvas concentración respuesta a partir de las cuales obtener las concentraciones críticas mínimas de inhibición (ver cuadro 15). Dichas curvas se obtuvieron graficando en el eje de las abscisas: $((\text{diámetro de inhibición} - \text{diámetro del disco})/2)^2$ y en el eje de las ordenadas el logaritmo natural (ln) de la concentración del antibiótico (ver figuras de la 3 a la 11). Se obtuvo por regresión lineal, mediante un software

estadístico (STATGRAPHICS), la mejor recta que describiera el comportamiento de la inhibición del crecimiento en función de las concentraciones para cada antibiótico de prueba.

La concentración crítica corresponde a la ordenada al origen y la concentración del antibiótico (control positivo) seleccionada para la realización de los ensayos para la determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los extractos de prueba, fue el doble de la concentración crítica a fin de asegurar una inhibición satisfactoria (ver cuadro 15).

Posterior a la selección de los controles positivos adecuados, y una vez descrita la manera en que se prepararon las muestras de prueba, se procederá a la descripción del método de difusión en agar el cual se condujo utilizando la técnica descrita por Barry y Thornsberry (Barry y Thornsberry, 1991).

Los microorganismos de prueba se prepararon mediante incubación en caldo nutritivo (Merck) durante 24 horas a 37 grados centígrados. La concentración final de los organismos en el cultivo se ajustó mediante dilución con solución salina isotónica (NaCl 0.9%) o caldo nutritivo hasta obtener la turbidez visualmente comparable a la del estándar preparado mediante la mezcla de 0.1 ml de BaCl_2 0.048M (BaCl_2 (1.75%) $2\text{H}_2\text{O}$) 9.9 ml de H_2SO_4 0.36N (1%).

Esta turbidez equivale a la densidad del estándar de McFarland No. 1 y corresponde a un número aproximado de 3×10^8 células/ml (Barry y Thornsberry, 1991).

0.5 ml de una suspensión bacteriana se sembró de manera uniforme en cada caja petri, conteniendo 15-20 ml de agar Mueller-Hinton (Difco). Las cajas se dejaron secar durante 3-5 min. y, posteriormente, los discos impregnados con el antibiótico de prueba se aplicaron manualmente con una pinza estéril sobre la superficie de agar inoculada. Las placas así preparadas se mantuvieron a una temperatura de 5 grados centígrados durante 30 minutos para facilitar la difusión de las muestras. Transcurrido este tiempo, las cajas se incubaron por 24 horas a 37 grados centígrados.

El ensayo se realizó por duplicado para cada una de las muestras de prueba.

MICROORGANISMO	ANTIBIOTICO	HALO DE INHIBICION					r	Ccr ug/ml
		10ug	20ug	30ug	40ug	50ug		
<i>Aeromona hydrophila</i>	Cloranfenicol	10ug ----	20ug ----	30ug ----	40ug ----	50ug ----		
	*Trimetoprima-sulfametoxazol	3.75ug 27mm	15ug 31mm	24.75ug 35mm	36ug 38mm	45ug 40mm	0,9469	2,76
<i>Escherichia coli</i>	*Ampicilina	1.25ug 12.5mm	5ug 19mm	10ug 21.5mm	15ug 24.5mm	20ug 27mm	0,9578	2,71
	Gentamicina	1.25ug 19.5mm	5ug 23mm	10ug 26mm	15ug 25mm	20ug 25mm		
<i>Proteus mirabilis</i>	Ampicilina	10ug 16mm	20ug 17.5mm	30ug 9.5mm	40ug 20mm	50ug 18mm		
	*Gentamicina	1.25ug 10mm	5ug 15mm	10ug 17mm	15ug 19mm	20ug 20mm	0,9793	2,56
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	*Carbenicilina	25ug 13mm	50ug 18.5mm	100ug 24mm	150ug 25mm	200ug 30mm	0,9594	51,92
	Gentamicina	1.25ug 8mm	5ug 14mm	10ug 15.5mm	15ug 20mm	20ug 20mm		
<i>Salmonella typhi</i>	*Amikacina	10ug 18mm	20ug 20mm	30ug 22mm	40ug 24mm	50ug 25mm	0,9735	9,18
	Trimetoprima-sulfametoxazol	3.75ug 27.5mm	15ug 38mm	24.75ug 38mm	36ug 30mm	45ug 30mm		
<i>Shigella flexneri</i>	Ampicilina	1.25ug ----	5ug ----	10ug ----	15ug ----	20ug ----		
	*Gentamicina	1.25ug 14.5mm	5ug 20mm	10ug 23mm	15ug 23.5mm	20ug 25.5mm	0,9066	1,44
<i>Staphylococcus aureus</i>	*Cefalotina	10ug 35mm	20ug 37mm	30ug 40mm	40ug 43mm	50ug 45mm	0,9567	4,26
	Trimetoprima-sulfametoxazol	3.75ug 30mm	15ug 36mm	24.75ug 37mm	36ug 37mm	45ug 37mm		
<i>Vibrio cholerae</i>	Gentamicina	1.25ug 12mm	5ug 20mm	10ug ----	15ug 25mm	20ug 25mm		
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	*Tetraciclina	3.75ug 20mm	15ug 26mm	24.75ug 27mm	36ug 28mm	45ug 30mm	0,9852	2,16
<i>Yersinia enterocolitica</i>	*Gentamicina	1.25ug 15mm	5ug 25mm	10ug 30mm	15ug 33mm	20ug 36mm	0,9805	2,43
	Trimetoprima-sulfametoxazol	3.75ug 35mm	15ug ---	24.75ug ---	36ug ---	45ug ---		

* Antibiotico empleado.

r, coeficiente de correlación; Ccr, concentración crítica aproximada.

Cuadro 15. Sensibilidad de los microorganismos de prueba frente a dos antibióticos de uso clínico.
Concentración crítica mínima de inhibición y su coeficiente de correlación.

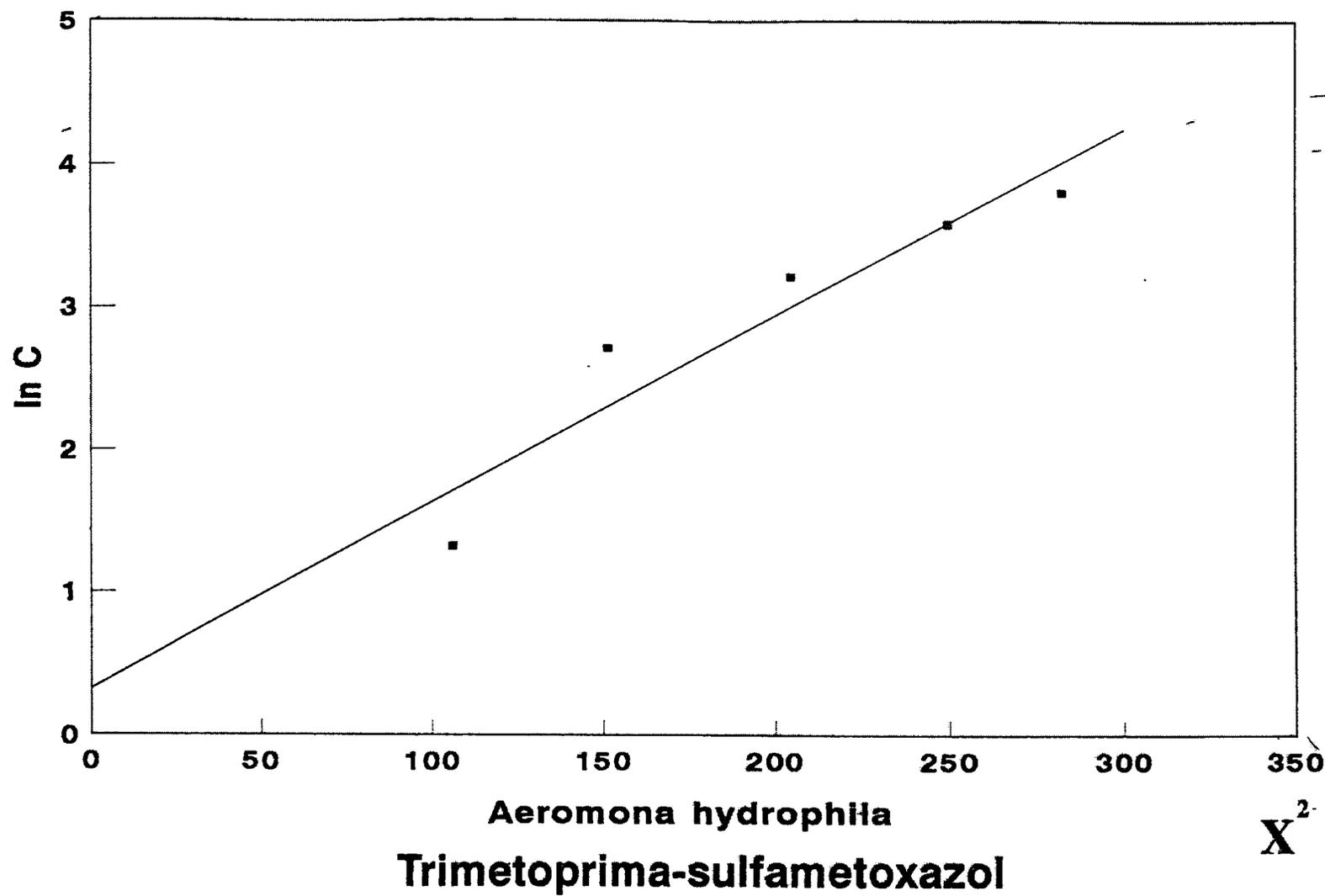


FIGURA 3. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA MÍNIMA DE INHIBICIÓN DE TRIMETOPRIMA-SULFAMETOXAZOL PARA AEROMONA HYDROPHILA.

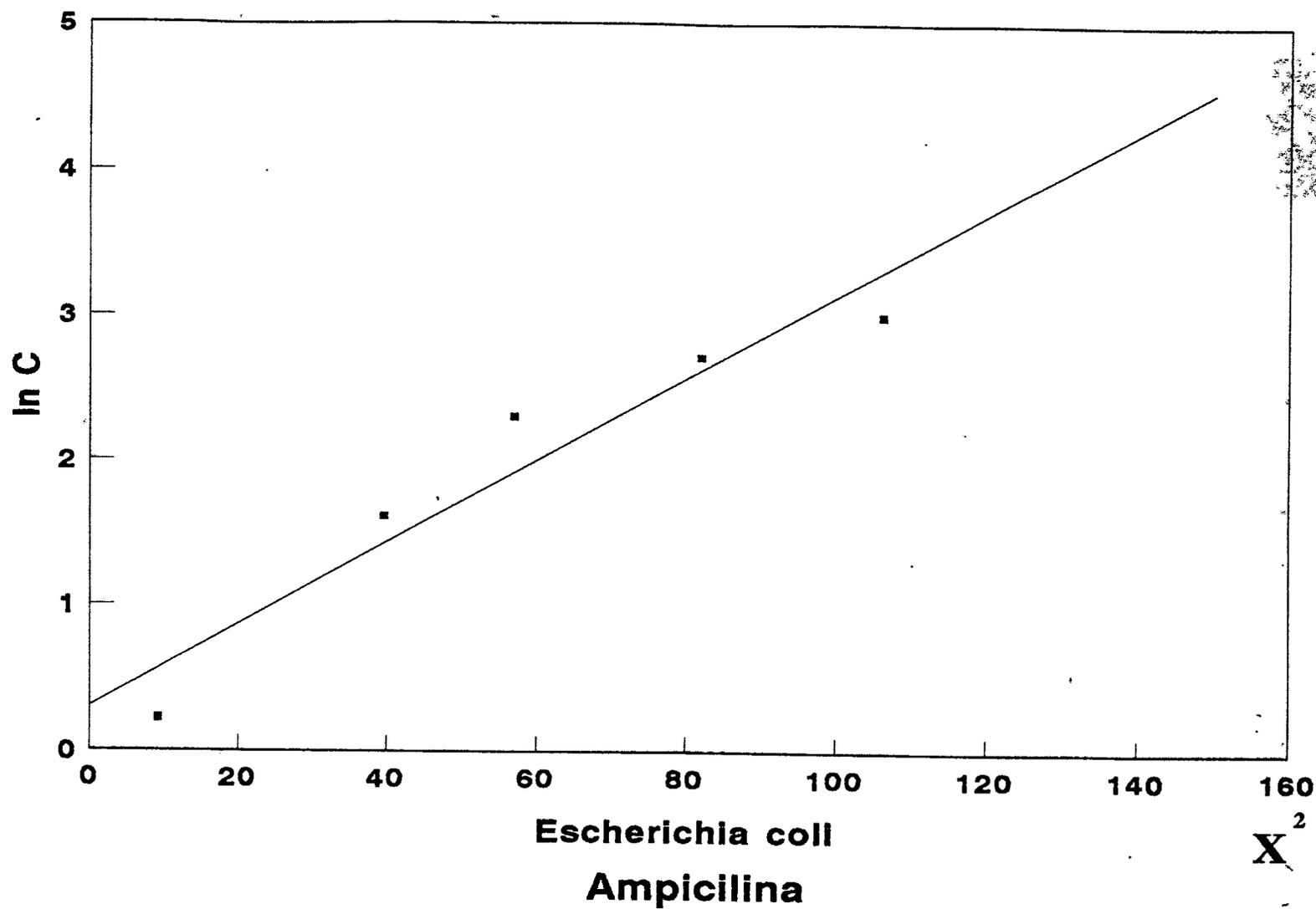


FIGURA 4. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA MÍNIMA DE INHIBICIÓN DE AMPICILINA PARA ESCHERICHIA COLI.

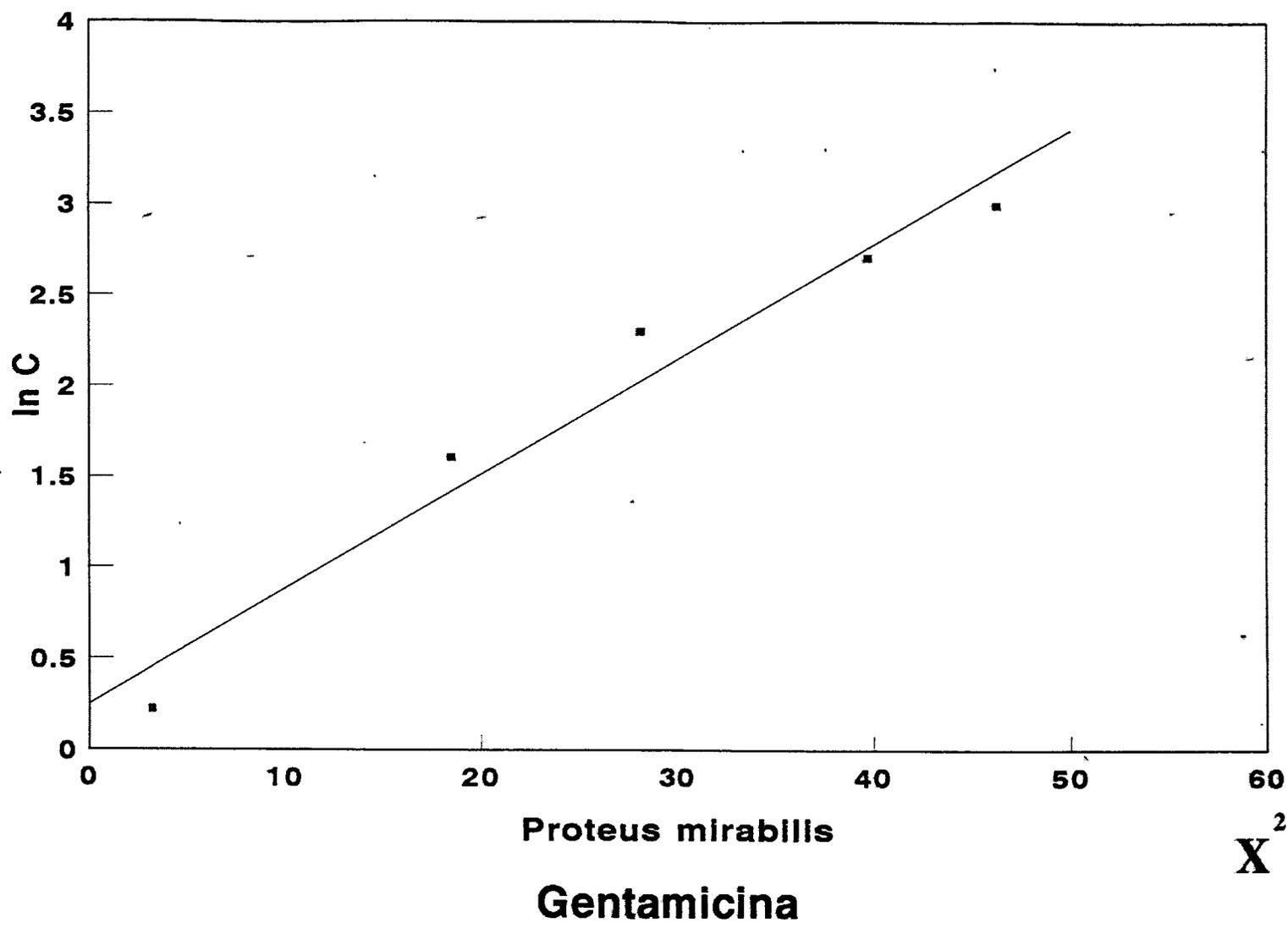


FIGURA 5. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA MÍNIMA DE INHIBICIÓN DE GENTAMICINA PARA PROTEUS MIRABILIS.

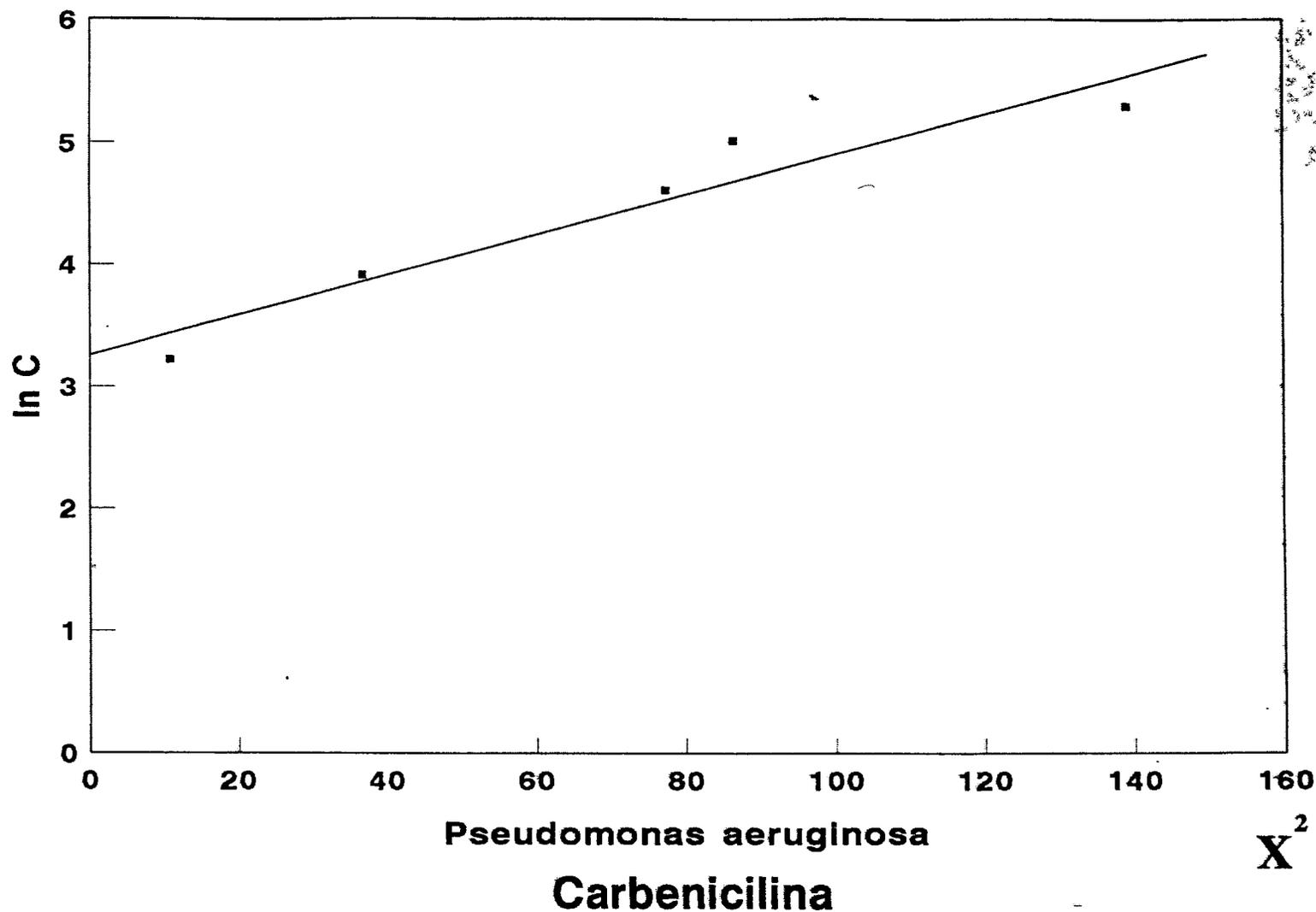


FIGURA 6. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA MÍNIMA DE INHIBICIÓN DE CARBENICILINA PARA PSEUDOMONA AERUGINOSA.

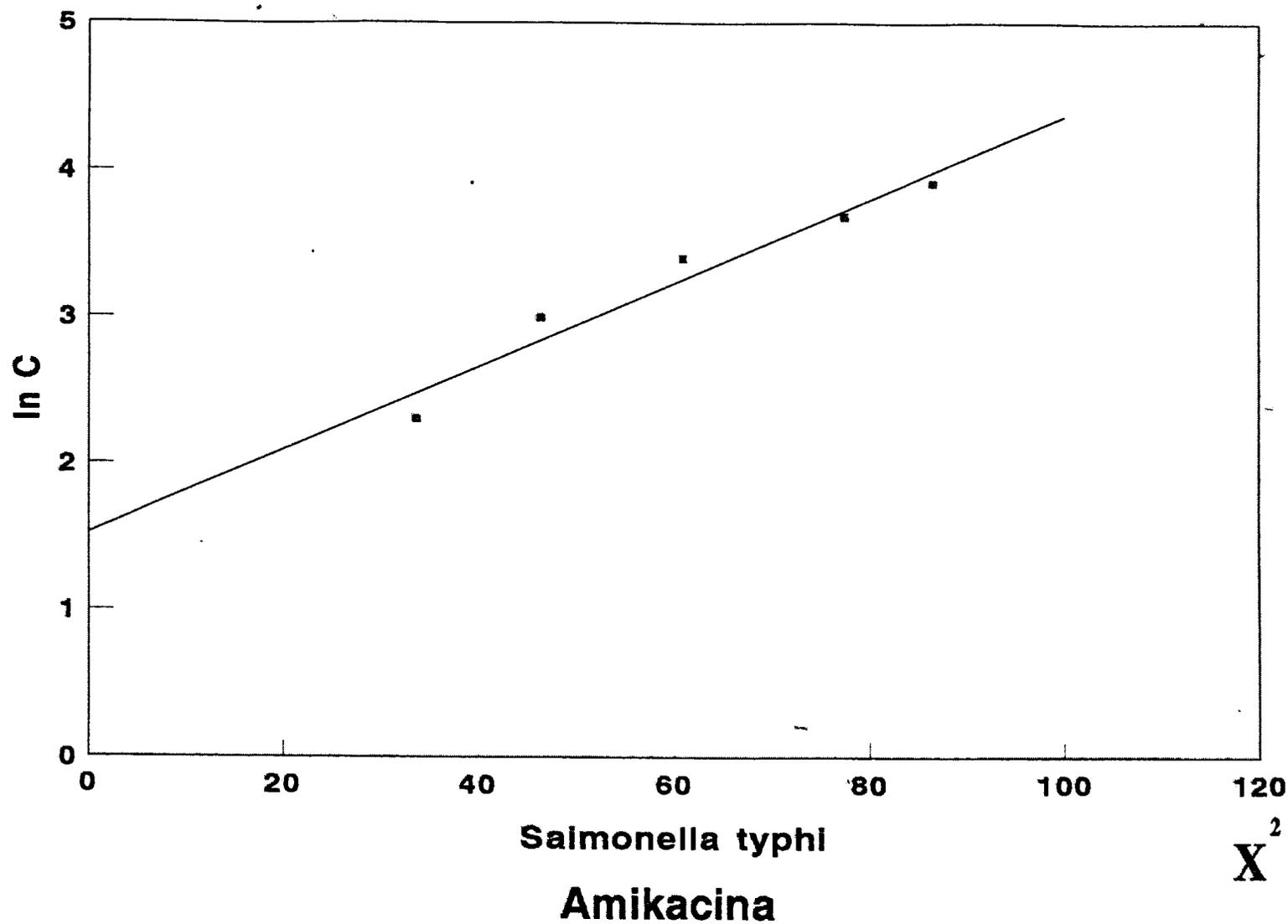


FIGURA 7. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA MÍNIMA DE INHIBICIÓN DE AMICACINA PARA SALMONELLA TYPHY.

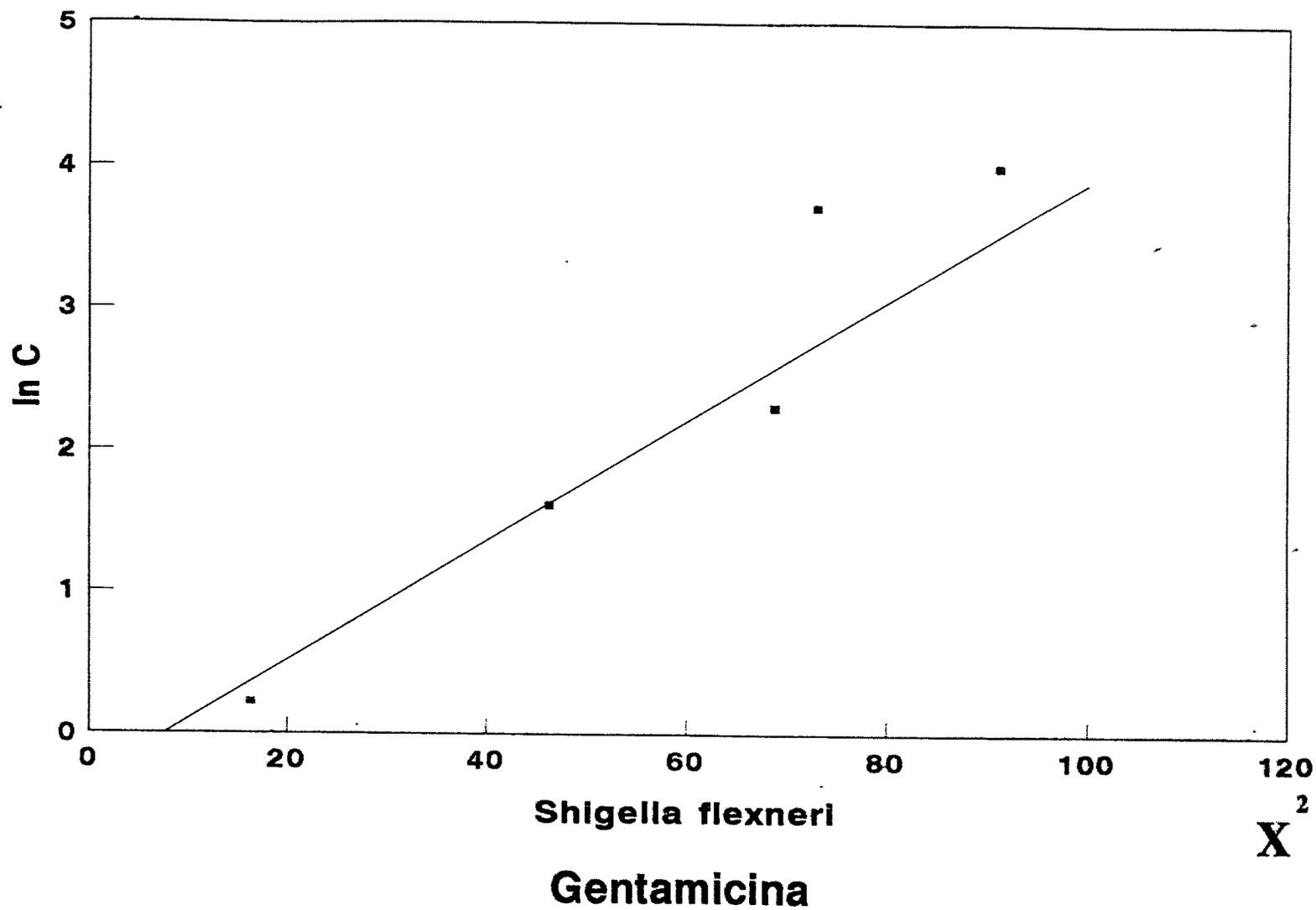


FIGURA 8. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA MÍNIMA DE INHIBICIÓN DE GENTAMICINA PARA SHIGELLA FLEXNERI.

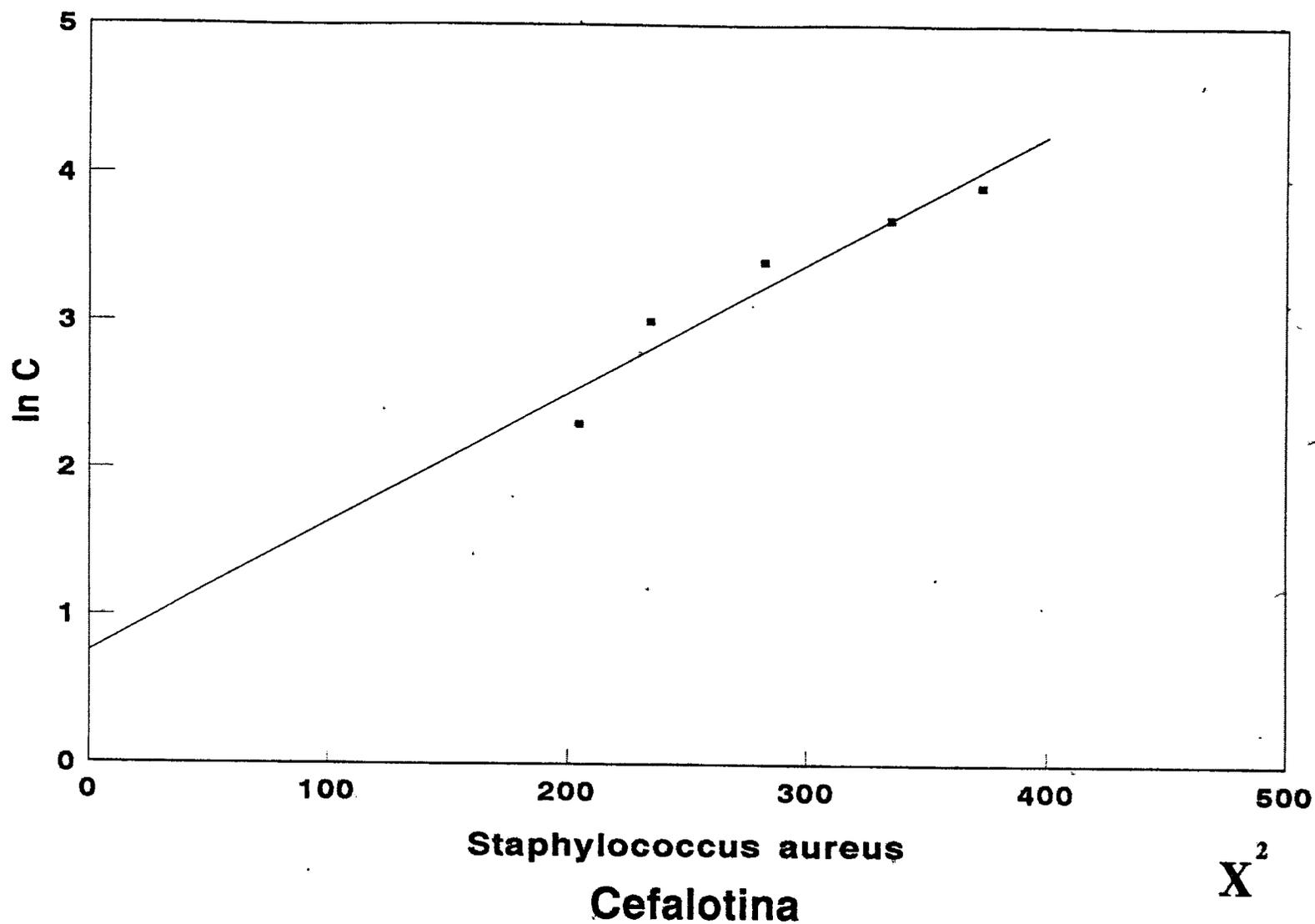


FIGURA 9. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA MÍNIMA DE INHIBICIÓN DE CEFALOTINA PARA STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

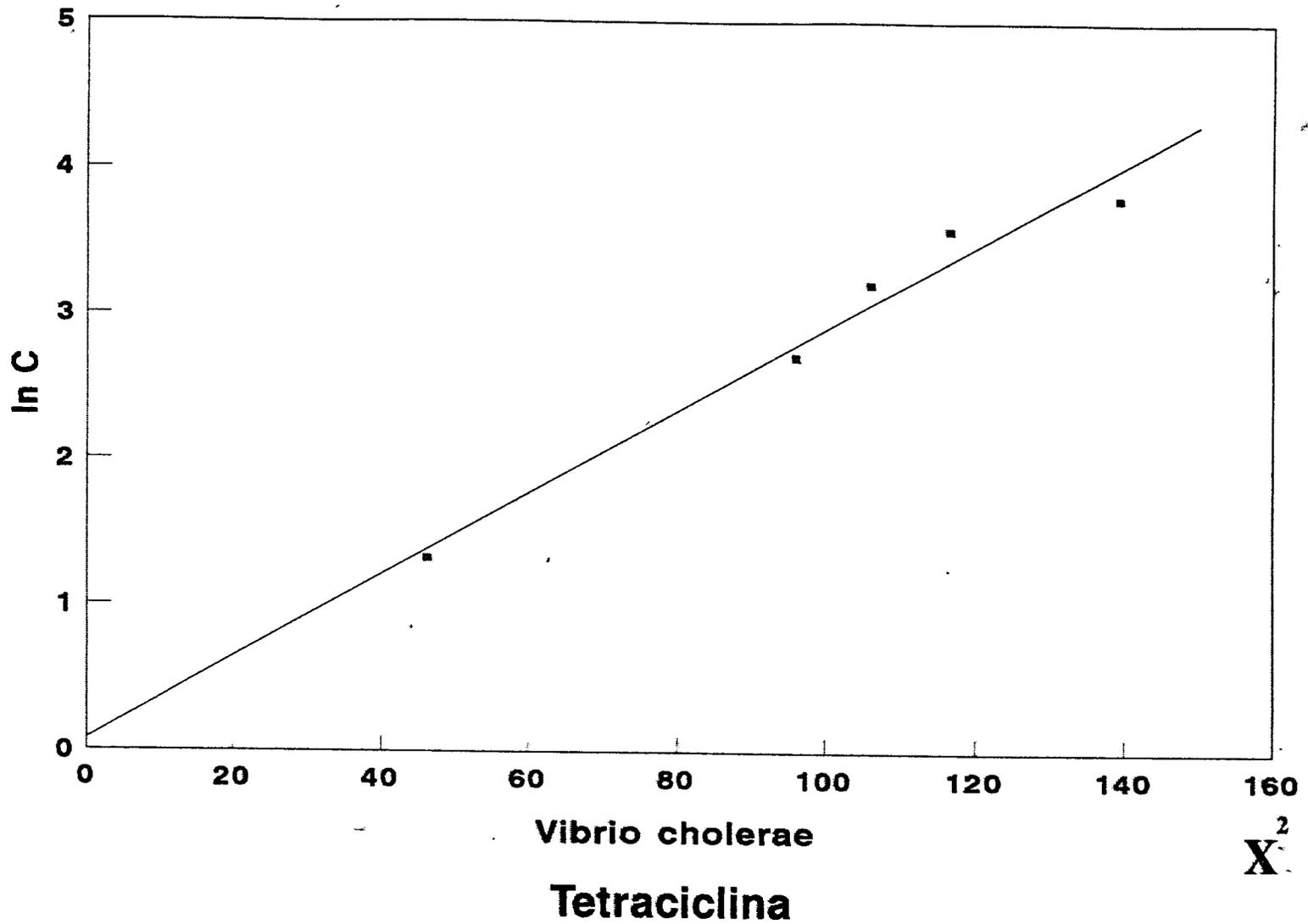


FIGURA 10. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA MÍNIMA DE INHIBICIÓN DE TETRACICLINA PARA VIBRIO CHOLERAÆ.

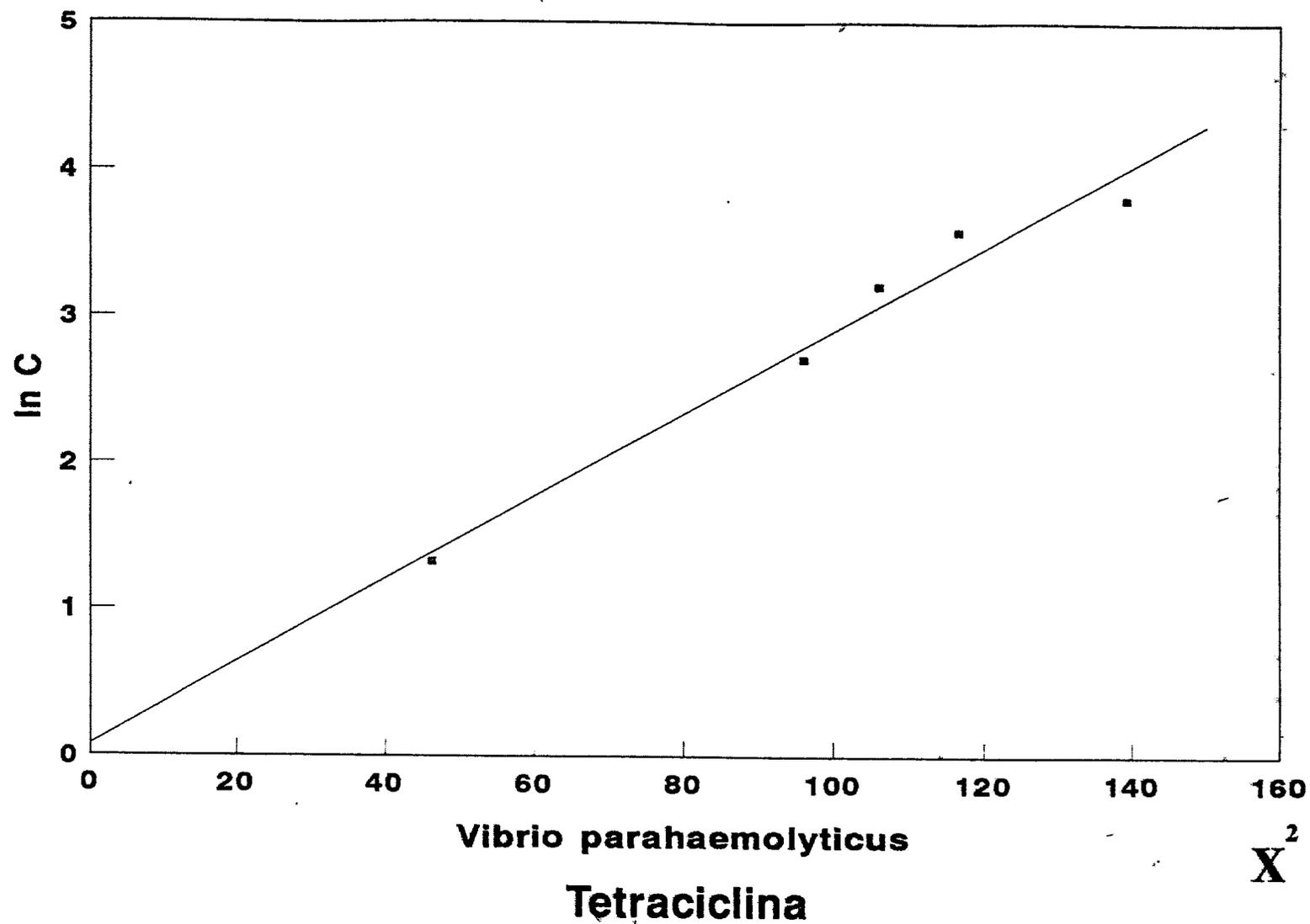


FIGURA 11. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA MÍNIMA DE INHIBICIÓN DE TETRACICLINA PARA VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS.

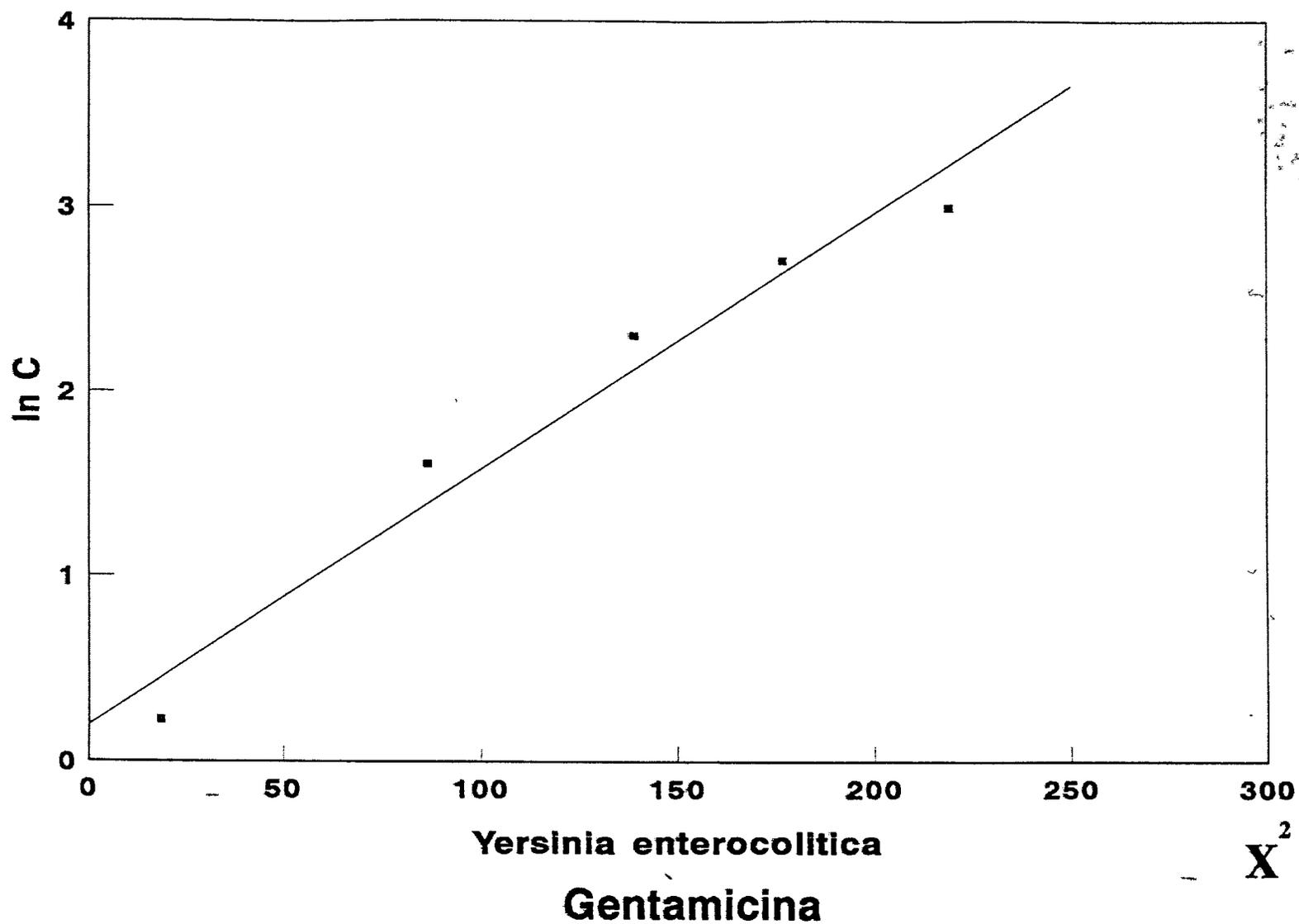


FIGURA 12. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CRÍTICA MÍNIMA DE INHIBICIÓN DE GENTAMICINA PARA YERSINIA ENTEROCOLITICA.

La actividad antimicrobiana se registró midiendo el diámetro (mm) de la zona de inhibición que circundó a cada uno de los discos. La concentración crítica mínima inhibitoria de los extractos que presentaron actividad sobre los microorganismos de prueba se calculó, al igual que para los controles positivos, mediante el método estadístico de mínimos cuadrados (Barry, 1986).

5.6. Determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas CIM de los extractos activos en la evaluación cualitativa y de sus respectivos controles positivos.

El análisis cuantitativo de la actividad antimicrobiana de los extractos activos, así como de sus respectivos controles positivos, se condujo utilizando la técnica microbiología de dilución en caldo (Bailey Scott, 1991).

Primeramente con base en la concentración crítica mínima de inhibición obtenida en la evaluación cualitativa, la cual de acuerdo a la literatura corresponde a la concentración inhibitoria mínima aproximada (CIM aproximada), se seleccionaron concentraciones correspondientes al doble, al cuádruple, a la mitad y a la cuarta parte de la concentración crítica.

Debido a que cada concentración se probó por duplicado y además se utilizó un blanco para cada concentración, fue necesario preparar series de 15 tubos de ensaye para la evaluación cuantitativa de cada extracto. A cada tubo de ensaye se le adicionó 1 ml de infusión cerebro corazón (BHI), (Merck).

Para la preparación de las soluciones de prueba, los extractos se disolvieron en metanol, mientras que los antibióticos se disolvieron en agua desionizada. Se prepararon dos soluciones stock de cada extracto y antibiótico de prueba. El primer stock contenía la sustancia de prueba en una concentración tal, que al agregar 100 ul en el tubo de ensaye, conteniendo 1ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI) se obtenía una concentración final equivalente a cuatro veces la concentración crítica mínima de inhibición correspondiente. En el caso del segundo stock, este

se preparó a una concentración adecuada, de tal forma que al adicionar 100, 50, 25 y 12.5 μ l, se obtuvieran en los tubos de ensaye (con 1 ml de caldo BHI) concentraciones finales correspondientes al doble, la concentración equivalente, la mitad y la cuarta parte de la concentración crítica mínima de inhibición de cada sustancia de prueba, respectivamente. Es importante recordar que cada concentración se preparó por triplicado.

Cada uno de los diez tubos de ensaye de la serie de quince, se inoculó con 1ml de una suspensión del microorganismo de prueba (1×10^6 organismos/ml), equivalente a una dilución 1:500 del patrón No.1 de McFarland aproximadamente (Bailey Scott, 1991). Por otra parte, los cinco tubos restantes, que se utilizaron como blanco para cada una de las cinco concentraciones, no fueron inoculados con microorganismos. Posteriormente todos los tubos así preparados, fueron incubados a 37 grados centígrados durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, se observaron los tubos inoculados con el objeto de encontrar la concentración a la cual se inhibía completamente la proliferación de microorganismos de prueba. A partir de esta concentración y considerando la concentración inferior inmediata, en la cual se observaba crecimiento de microorganismos, se eligió un rango a partir del cual se seleccionaron cinco concentraciones con el objeto de obtener la concentración inhibitoria mínima mas exacta (CIM). Estas concentraciones se evaluaron de acuerdo al método ya descrito.

6. RESULTADOS

A fin de facilitar la presentación de los resultados obtenidos en la presente tesis, éstos se expondrán en forma de cuadros cuya secuencia corresponde a la de los objetivos planteados originalmente.

Primeramente, en el cuadro 16 se presentan los resultados derivados del análisis fitoquímico cualitativo preliminar de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las plantas objeto de estudio.

En los cuadros 17 a 21 se muestran los extractos que fueron activos contra los microorganismos que resultaron ser susceptibles, se presentan también las correspondientes medidas de los halos de inhibición obtenidas a las cuatro concentraciones evaluadas.

En las figuras 12 a 19 se presentan algunas fotos que ilustran la actividad antimicrobiana de algunos de los extractos que resultaron activos.

Los resultados de la evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de los extractos que resultaron activos en la primera fase, se presentan en el cuadro 22 (CIM).

Finalmente en el cuadro 23 se muestran las concentraciones letales cincuenta (CL50) de los extractos que presentaron toxicidad para *Artemia salina*.

PLANTA	SOLVENTE	E	T	AR	A	F	GCI	GCA
<i>Chenopodium graveolens</i>	Cloroformo	P	N	N	P	N	N	N
	Metanol	P	P	P	P	N	N	P
<i>Commelina diffusa</i>	Cloroformo	P	N	N	P	P	N	N
	Metanol	N	P	N	P	P	N	P
<i>Conyza filaginoides</i>	Cloroformo	P	N	N	P	P	N	N
	Metanol	N	N	N	P	P	N	P
<i>Croton fragilis</i>	Cloroformo	P	N	N	P	P	N	N
	Metanol	N	P	P	P	P	N	N
<i>Datura lanosa</i>	Cloroformo	P	N	N	P	P	N	N
	Metanol	P	N	N	P	N	N	N
<i>Dononaea viscosa</i>	Metanol	P	P	N	N	P	N	N
<i>Dyssodia pinnata</i>	Cloroformo	P	N	N	N	N	N	N
	Metanol	P	N	N	N	P	N	P
<i>Gymnosperma glutinosum</i>	Cloroformo	P	N	N	P	P	N	N
	Metanol	P	P	N	P	P	N	N
<i>Lepidium virginicum</i>	Cloroformo	P	N	N	P	N	N	N
	Metanol	P	N	N	P	N	N	N
<i>Lopezia racemosa</i>	Cloroformo	P	N	N	P	N	N	N
	Metanol	P	P	N	P	P	N	N
<i>Parthenium tomentosum</i>	Cloroformo	P	N	N	P	N	N	N
	Metanol	P	P	N	P	N	N	N
<i>Potentilla thurberi</i>	Cloroformo	P	N	N	P	N	N	P
	Metanol	P	P	P	P	N	N	N
<i>Pterogonum atrorubens</i>	Cloroformo	P	N	N	N	P	N	N
	Metanol	P	P	P	N	P	N	N
<i>Salvia heliaelianthemifolia</i>	Cloroformo	P	N	N	P	N	N	P
	Metanol	P	P	N	P	P	N	N
<i>Zornia dyphylla</i>	Cloroformo	P	N	N	P	P	N	N
	metanol	P	P	N	P	N	N	N

P: positivo; N: negativo; E: esteroides; T: taninos; AR: azúcares reductores; A: alcaloides; F: flavonoides; GCI: glicósidos cianogenéticos; GCA: glicósidos cardiotónicos.

Cuadro 16. Resultados del Análisis Fitoquímico Cualitativo.

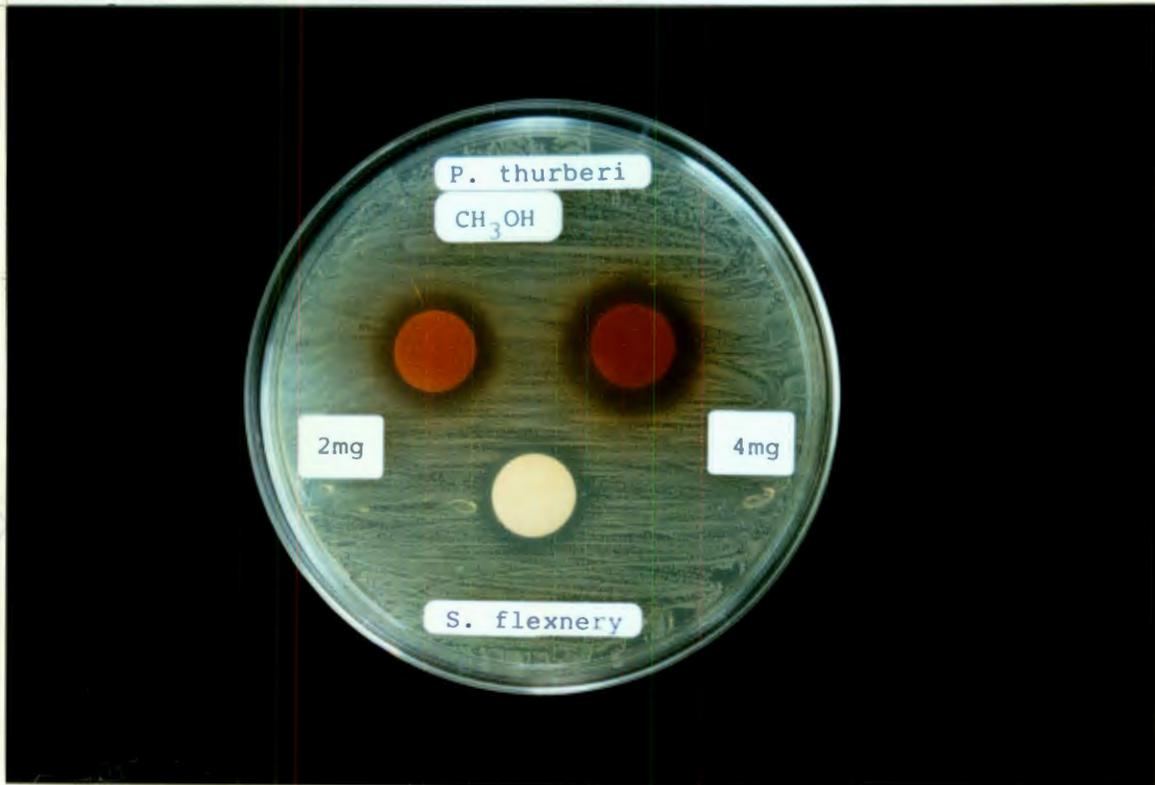


Figura 13. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Potentilla thurberi* sobre *Shigella flexneri*.



Figura 14. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Datura lanosa* sobre *Staphylococcus aureus*.



Figura 15. Efecto inhibitorio del extracto clorofórmico de *Commelina diffusa* sobre *Staphylococcus aureus*.

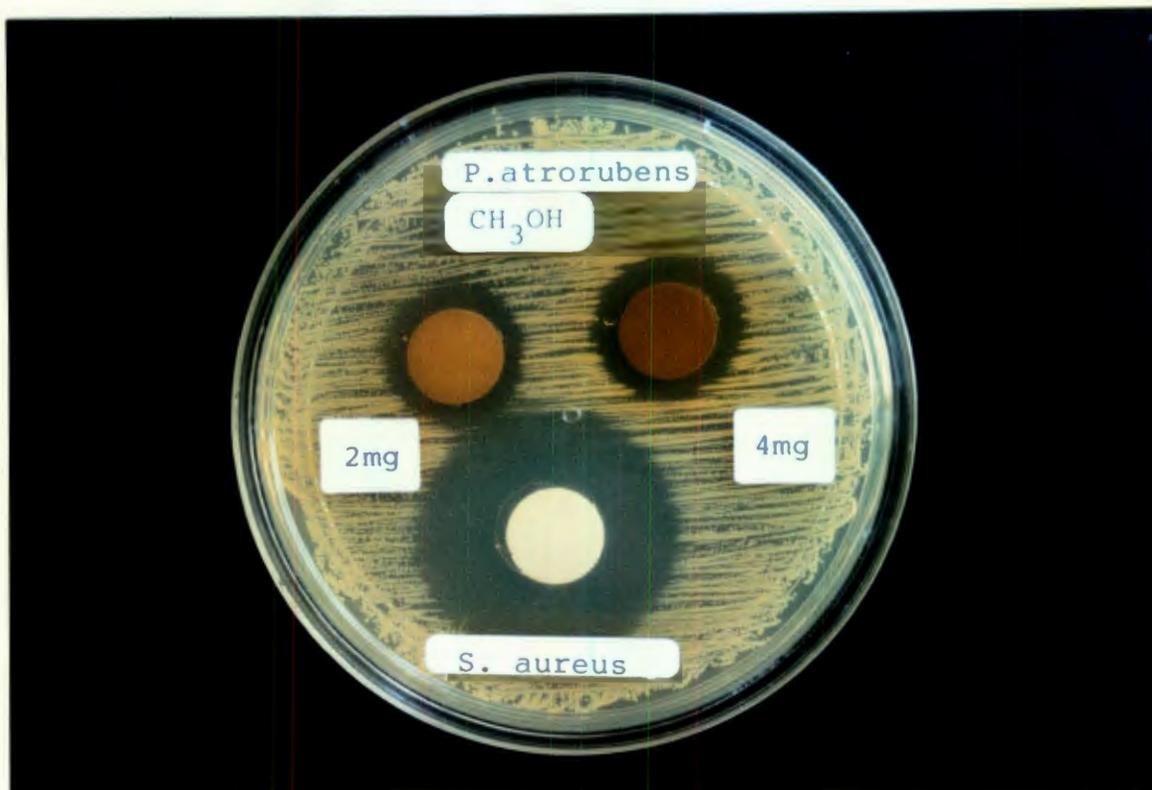


Figura 16. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Pterogonum atrorubens* sobre *Staphylococcus aureus*.

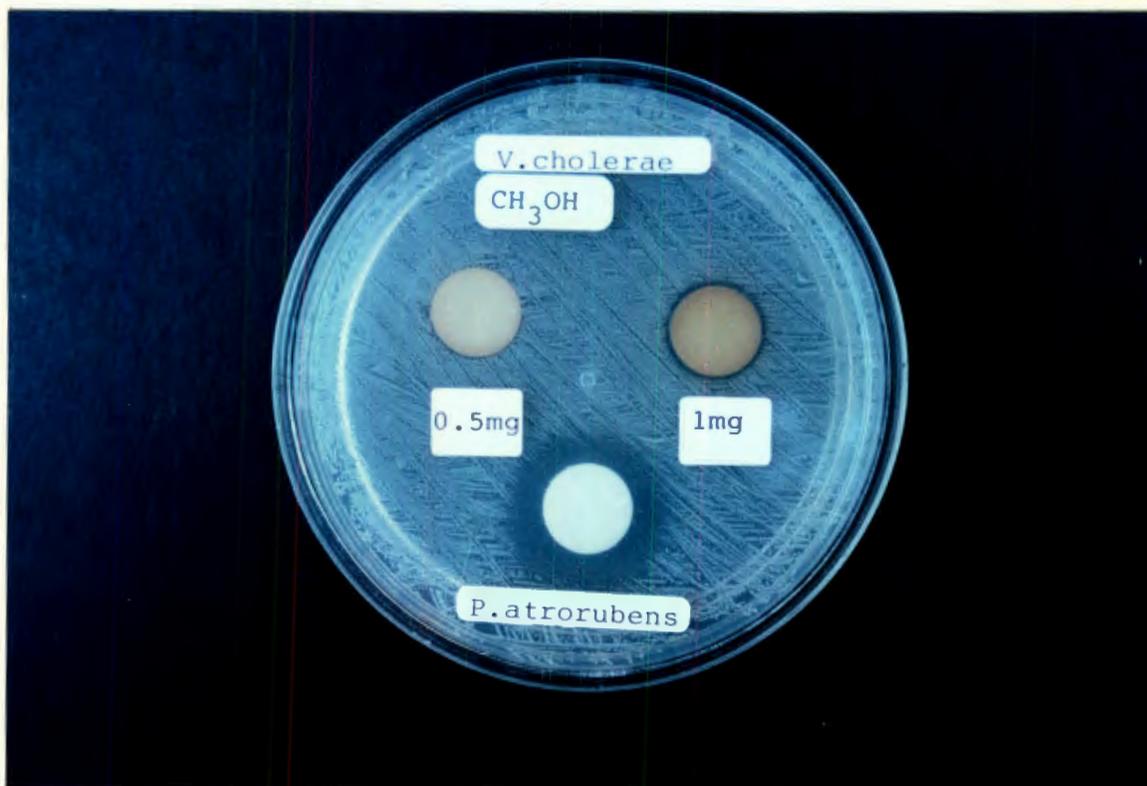


Figura 17. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Pterogonum atrorubens* sobre *Vibrio cholerae*.



Figura 18. Efecto inhibitorio del extracto metanólico de *Datura lanosa* sobre *Vibrio parahaemolyticus*.



Figura 19. Efecto inhibitorio del extracto clorofórmico de *Commelina diffusa* sobre *Yersinia enterocolitica*.



Figura 20. Efecto inhibitorio de Gentamicina sobre *Potus mirabilis*.

PLANTA	SOLVENTE	HALO DE INHIBICION (mm)			
		0.5mg	1.0mg	2.0mg	4.0mg
<i>Potentilla thurberi</i>	Metanol	15	16	20	22
<i>Potentilla thurberi</i>	Cloroformo	13	14	17	20
<i>Datura lañosa</i>	Metanol	14	15	16	17

Cuadro 17. Extractos activos contra *Shigella Flexneri*.

PLANTA	SOLVENTE	HALO DE INHIBICION (mm)			
		0.5mg	1.0mg	2.0mg	4.0mg
<i>Commelina diffusa</i>	Cloroformo	14	15	16	17
<i>Conyza filaginoides</i>	Cloroformo	16	17	18	18.2
<i>Croton fragilis</i>	Cloroformo	14	15	15.3	16
<i>Datura lanosa</i>	Metanol	15	16	18	20
<i>Gymnosperma glutinosum</i>	Metanol	14	15	15.1	15.2
<i>Pterogonum atrorubens</i>	Metanol	13	15	21	28
<i>Zornia dyphilla</i>	Metanol	13	15	17	17.1

Cuadro 18. Extractos activos contra *Staphylococcus aureus*.

PLANTA	SOLVENTE	HALO DE INHIBICION (mm)			
		0.5mg	1.0mg	2.0mg	4.0mg
<i>Potentilla thurberi</i>	Metanol	15	16	20	22
<i>Pterogonum atrorubens</i>	Metanol	13	15	17	20

PLANTA	SOLVENTE	HALO DE INHIBICION (mm)			
		0.5mg	1.0mg	2.0mg	4.0mg
<i>Datura lanosa</i>	Metanol	13	14.5	16	19

Cuadro 20. Extractos activos contra *Vibrio parahemolyticus*.

PLANTA	SOLVENTE	HALO DE INHIBICION (mm)			
		0.5mg	1.0mg	2.0mg	4.0mg
<i>Commelina diffusa</i>	Cloroformo	14	15	16	17
<i>Conyza filaginoides</i>	Cloroformo	13	13.5	15	16
<i>Croton fragilis</i>	Cloroformo	13	13.5	14.5	15.5
<i>Datura lanosa</i>	Metanol	14	16	17	19
<i>Lopezia racemosa</i>	Cloroformo	14	15	16	18

Cuadro 21. Extractos activos contra *Yersinia enterocolitica*.

MICROORGANISMO	EXTRACTO	CONCENTRACION CRITICA MINIMA DE INHIBICION (mg/ml)	COEFICIENTE DE CORRELACION	CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA (CIM) (mg/ml)
<i>Shigella flexneri</i>	Datura lanosa metanólico	0,8881	0,9891	0,625
	Potentilla thurberi clorofórmico	1,5055	0,9256	1,25
	Potentilla thurberi metanólico	1,1478	0,9663	0,8214
<i>Staphylococcus aureus</i>	Commelina diffusa clorofórmico	0,8881	0,9891	0,3172
	Conyza filaginoides clorofórmico	0,3079	0,9749	0,2933
	Croton fragilis clorofórmico	0,6154	0,9862	0,879
	Datura lanosa metanólico	1,0293	0,9661	0,8583
	Gymnosperma glutinosum metanóli	0,4115	0,8781	0,3809
	Pterogonum atrorubens metanólico	1,5857	0,9071	1,9048
	Zornia dyphilla metanólico	1,0599	0,9444	0,3786
	Potentilla thurberi metanólico	1,2854	0,9602	1,0833
<i>Vibrio cholerae</i>	Pterogonum atrorubens metanólico	1,0216	0,9972	0,8333
	Datura lanosa metanólico	1,5096	0,9099	1,32
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Commelina diffusa clorofórmico	0,8881	0,9891	0,8929
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Conyza filaginoides clorofórmico	1,3206	0,9581	1,7857
	Croton fragilis clorofórmico	1,3181	0,951	1,9643
	Datura lanosa metanólico	1,0575	0,9715	1,9619
	Lopezia racemosa clorofórmico	1,1892	0,9393	1,25

Cuadro 22. Cuantificación de los extractos que resultaron activos en la evaluación cualitativa.

PLANTA	S O L V E N T E	
	CLOROFORMO	METANOL
	CL50 (ppm)	CL50
<i>Chenopodium graveolens</i>	237.80	366.40
<i>Commelina diffusa</i>	NA	244.82
<i>Conyza filaginoides</i>	674.72	650.08
<i>Croton fragilis</i>	NA	NA
<i>Datura lanosa</i>	NA	97.59
<i>Dononaea viscosa</i>	NE	> 1000.00
<i>Dyssodia pinnata</i>	41.95	200.00
<i>Gymnosperma glutinosum</i>	NA	163.40
<i>Lepidium virginicum</i>	NA	NA
<i>Lopezia racemosa</i>	NA	150.52
<i>Parthenium tomentosum</i>	944.39	1.12
<i>Potentilla thurberi</i>	NA	200.00
<i>Pterogonum atrorubens</i>	> 1000.00	366.39
<i>Salvia heliaeliaanthemifolia</i>	NA	43.08
<i>Zornia dyphilla</i>	> 1000.00	6.78

CL50: Concentración letal cincuenta.

NA: no activo

NE: no evaluado

7. DISCUSION

El presente trabajo de tesis surgió a raíz de una inquietud personal basada en el hecho de que en nuestro país existe un gran índice de mortalidad, ocasionada por una alta incidencia de enfermedades diarreicas de etiología bacteriana. Y considerando que la población mexicana emplea una gran variedad de especies vegetales como agentes antiinfecciosos para el tratamiento de tales padecimientos, se pensó en la posibilidad de validar científicamente el empleo de algunas de las plantas más utilizadas en la Medicina Tradicional Mexicana con este objeto, a fin de contribuir de alguna manera, a la resolución de un problema real y actual de nuestra sociedad.

Las especies vegetales objeto de estudio fueron seleccionadas con base en su alta incidencia de uso entre la población de México.

Por otra parte, los microorganismos se seleccionaron tomando en cuenta la frecuencia de su aislamiento a partir de heces diarreicas provenientes de pacientes infectados. Cabe mencionar, que en esta ocasión se decidió emplear cepas patógenas que, por haber estado previamente en contacto con antibióticos de uso clínico, llegaron a desarrollar, en menor o mayor grado, resistencia a dichos antibióticos. La decisión de utilizar este tipo de microorganismos, en lugar de utilizar cepas de investigación perfectamente estandarizadas (cepas ATCC), se fundamentó en la consideración de que los resultados que se obtuvieran a partir de estas evaluaciones, estarían más directamente relacionados con una efectividad "real" de las plantas para el tratamiento de las infecciones bacterianas que ocasionan diarrea.

En primer término, se realizó un análisis fitoquímico cualitativo de los extractos clorofórmicos y metanólicos de las especies vegetales objeto de estudio con el fin de conocer, de manera preliminar, los metabolitos secundarios presentes en cada planta y poder

correlacionar los resultados obtenidos en las evaluaciones microbiológicas y de toxicidad, con el contenido fitoquímico de las plantas.

Se encontró que todas las plantas objeto de estudio contenían esteroides, lo cual no es extrañarse debido a que este tipo de metabolitos se encuentran distribuidos en todo el reino vegetal (Atkins, P.W. et al., 1987).

En cuanto a los azúcares reductores y Glicósidos cardiotónicos, el primer grupo de metabolitos se encontró en las especies: *Chenopodium graveolens*, *Croton fragilis*, *Potentilla thurberi* y *Pterogonum atrorubens* y el segundo grupo se encontró en las especies: *Chenopodium graveolens*, *Commelina diffusa*, *Conyza filaginoides*, *Dyssodia pinnata*, *Potentilla thurberi* y *Salvia heliaelianthemifolia*, mientras que en ninguna planta se encontraron Glicósidos cianogenéticos. Con relación a la actividad antimicrobiana de estos metabolitos, a la fecha no se han reportado trabajos que indiquen que estos compuestos tengan propiedades antibióticas.

Con relación a la determinación de alcaloides, estos metabolitos se detectaron en la mayoría de las especies evaluadas con excepción de *Dononaea viscosa*, *Dyssodia pinnata* y *Pterogonum atrorubens*. A este respecto, es bien conocido el hecho de que los alcaloides son compuestos con amplia variedad de actividades biológicas entre las que se incluyen efectos antimicrobianos y antifúngicos (Bever, B.O. 1986; Leven, M. et al., 1979). No se descarta la posibilidad de que las especies que los contienen deban sus propiedades antisépticas a la presencia de estos metabolitos secundarios. Sin embargo, es muy importante considerar que las pruebas cualitativas para detectar alcaloides no son completamente específicas ya que existen otros tipos de compuestos que pueden dar reacción positiva, como son algunos aminoácidos y péptidos. Por esta razón, resulta necesaria la realización de más estudios a fin de corroborar por una parte, la presencia de alcaloides en las plantas, y por otra, si los alcaloides son los responsables de la actividad antibiótica.

Gran parte de las especies estudiadas contienen taninos y flavonoides los cuales constituyen, al igual que los esteroides, metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en los

vegetales. Estos compuestos son de naturaleza fenólica y por esta razón muchos de ellos tienen propiedades antibióticas (Bever, B.O. 1986; Harborne, S.V. 1982; Leven, M. et al., 1979; Reinhold, L. et al., 1981). Posiblemente las especies que los contienen deben en parte, o totalmente su acción antimicrobiana a estos constituyentes.

Con relación a la determinación de la actividad antimicrobiana, ésta se llevó a cabo en dos fases. En la primera fase, se determinaron cualitativamente las propiedades antibióticas de los extractos vegetales en estudio. En la segunda fase, los extractos que resultaron activos en la determinación cualitativa, se evaluaron mediante un método de dilución en caldo a fin de cuantificar su potencia antimicrobiana y compararla con la de controles positivos adecuados.

Antes de iniciar con la discusión de los resultados obtenidos a partir de las pruebas biológicas, se harán algunos comentarios con relación a las técnicas microbiológicas utilizadas en el presente trabajo. En primer término, cabe destacar que se han reportado en la literatura un gran número de metodologías para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos y compuestos puros obtenidos a partir de plantas superiores. En el caso de esta investigación, se decidió estandarizar una técnica metodológica que resultara adecuada para las condiciones particulares de trabajo en el laboratorio.

En la determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana, el medio de cultivo utilizado para el desarrollo de las bacterias fue el agar Mueller-Hinton (Difco), el cual se seleccionó por presentar varias ventajas entre las que destacan: una buena reproducibilidad de lote a lote en los ensayos de susceptibilidad microbiana, proporciona un crecimiento satisfactorio para la mayoría de las bacterias enteropatógenas y la mayoría de los estudios de susceptibilidad se realizan con este medio (Comité Nacional para los Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS), 1984).

Se utilizaron como reservorios de las sustancias de prueba, discos de papel filtro estandarizados (diámetro, grosor, tamaño del poro y capacidad de absorción controlados) a fin de evitar variaciones en el contenido de muestra. La aplicación de las muestras en los discos de papel filtro se llevó a cabo mediante el uso de una micropipeta electrónica con un rango de

volumen de 5 a 1000 ul y una confiabilidad de la medición de aproximadamente un 99%. Con relación al método de sembrado, se decidió utilizar el método de siembra por estría cerrada. Las principales razones por las que se seleccionó este método fueron: la uniformidad que se logra en el crecimiento de los microorganismos y la posibilidad de evitar contaminación bacteriana de las personas que manejan los microorganismos y del instrumental utilizado.

La selección de los controles positivos se llevó a cabo mediante previa realización de pruebas de susceptibilidad de los microorganismos, en las cuales se utilizaron sensidiscos comerciales (Bigaux) que contienen los grupos de antibióticos sugeridos para los ensayos de rutina (Comité Nacional para los Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS), 1984).

En lo que se refiere a la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana, se empleó el método propuesto por Bayle Scott (Bayle Scott, 1991) con algunas modificaciones que fue necesario implementar para facilitar el desarrollo del trabajo experimental. En primer lugar, a partir de las concentraciones críticas mínimas de inhibición (CCMI) obtenidas en el ensayo cualitativo, se calcularon las concentraciones inhibitorias mínimas aproximadas (CIM aprox.) (CIM aproximadamente igual a 2CCMI) y éstas se tomaron como punto de partida para la preparación de las diluciones en el ensayo cuantitativo. Otra modificación que se hizo con relación a la técnica original implicó, el uso de un blanco para cada concentración de extracto evaluado en lugar de utilizar un blanco para cada serie de concentraciones.

La estandarización e implementación de las modificaciones de las técnicas microbiológicas utilizadas en esta investigación, constituyen quizás uno de los principales méritos del trabajo, ya que permitieron la optimización de los recursos técnicos y materiales disponibles en el laboratorio y pueden constituir la base para la realización de estudios futuros relacionados con el tema, en la Universidad Autónoma de Querétaro.

Una vez hechos los comentarios pertinentes con relación a la metodología utilizada en la evaluación antimicrobiana de los extractos objeto de estudio, se procederá a hacer una breve discusión de los resultados obtenidos en esta prueba.

Los resultados de la evaluación microbiológica se muestran en los cuadros 16-23. Se observa que las únicas enterobacterias susceptibles fueron *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Yersinia enterocolitica*.

Nueve de las quince plantas evaluadas mostraron un efecto antibacteriano contra uno o más de los microorganismos susceptibles. Sin embargo, el grado de potencia antibiótica obtenido para los extractos activos, de manera general, tiende a ser baja comparada con la de los controles positivos.

La actividad antimicrobiana más notable fue la que presentaron los extractos metanólicos de *Gymnosperma glutinosum* y *Zornia dyphilla* y los extractos clorofórmicos de *Commelina diffusa* y *Conyza filaginoides* sobre la cepa enteropatógena de *Staphylococcus aureus*, los cuales mostraron concentraciones inhibitorias mínimas menores de 400 ug/ml. A este respecto, es importante mencionar, que si bien no existen estándares internacionales para definir, los valores de las concentraciones inhibitorias mínimas que deben tomarse como referencia para considerar un extracto vegetal como una buena fuente potencial de antibióticos, si existe un acuerdo "implícito" y hasta cierto punto "arbitrario", entre los investigadores de productos naturales, en el cual se considera que extractos vegetales que presentan concentraciones inhibitorias mínimas de 500 ug/ml, son lo suficientemente potentes para garantizar la obtención de principios activos antimicrobianos.

Adicionalmente vale la pena destacar que el extracto metanólico de *Datura lanosa* mostró el más amplio espectro de actividad inhibiendo el crecimiento de *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Yersinia enterocolitica*, con un rango de concentraciones inhibitorias mínimas entre 600 y 2000 ug/ml. *Datura lanosa* tiene un alto contenido de alcaloides atropina y escopolamina, conocidos antagonistas colinérgicos. No se descarta la posibilidad de que la actividad antibiótica mostrada por esta especie, se deba a la presencia de estos alcaloides, aunque obviamente se requiere de la realización de más estudios para corroborar esta hipótesis.

Una revisión en la literatura permitió comprobar que las especies *Commelina diffusa* y *Gymnosperma glutinosum* ya habían sido objeto de estudios fitoquímicos. Correlacionando esta información con los resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar, es posible especular que la actividad antimicrobiana encontrada para *Gymnosperma glutinosum*, se debe a la presencia de los flavonoides emmaosunina y luiselizondina (Domínguez, X. 1974).

Por otra parte la actividad de *Commelina diffusa* puede atribuirse a la presencia del alcaloide 1-carbometoxi-B-carbolina, al cual ya se le ha demostrado previamente actividad antibiótica contra *Streptococcus mutans* (Kihwan, B. et al., 1992).

Con relación a la determinación de la toxicidad para *Artemia salina*, en primer término resulta conveniente recordar que los compuestos antitumorales son, casi sin excepción, tóxicos cuando se administran a dosis elevadas. De esta manera, la letalidad in vivo para las larvas del crustáceo *Artemia salina* (Meyer, et al., 1982; Aderson, et al., 1991) se ha utilizado como un bioensayo primario de fácil y rápida implementación para la detección de la actividad citotóxica y su monitoreo durante el fraccionamiento de los extractos vegetales (McvLaughlin, 1991; Mata, 1993). Estudios recientes han demostrado que este bioensayo es lo suficientemente preciso para predecir la actividad antitumoral (in vivo) y la citotoxicidad de agentes anticancerígenos en una serie de cultivos celulares humanos (Anderson, et al., 1991; Solís et al., 1993).

La evaluación de la toxicidad para *Artemia salina* puede ser aplicada para la detección de productos naturales bioactivos en donde este crustáceo responde de manera similar a los sistemas celulares de mamíferos. Por ejemplo, este bioensayo es de gran utilidad para la detección de compuestos antimitóticos que actúen mediante la inhibición de la formación de microtúbulos (Novelo, et al., 1993). Se ha descrito que las RNA-polimerasas dependientes del DNA de *Artemia salina* son similares a la de los mamíferos y, al igual que en todas las células animales, sus ATPasas transportadoras de Na⁺ y K⁺ son sensibles a la ouabaina, un glicósido utilizado en la medicina como un estimulante cardiaco (Pedersen y Carafoli, 1987). Por lo

tanto, es posible utilizar este ensayo para el descubrimiento de compuestos farmacodinámicos que regulen estos sistemas enzimáticos e interfieran en procesos vitales.

La aplicación de este ensayo en la selección de plantas medicinales para su investigación farmacognóstica ha permitido el aislamiento de numerosas sustancias bioactivas, en especial, productos naturales con una elevada actividad citotóxica (McLaughlin, 1991), antimitótica (Novelo et al., 1993), antihelmíntica (Mata, 1993) y antipalúdica (Mata, 1993; Solís, et al., 1993).

Los resultados obtenidos a partir de este bioensayo demostraron que doce de las quince plantas evaluadas presentan toxicidad para el crustáceo. Esta afirmación se basa en el conocimiento de que el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos de Norte América, ha establecido unos estándares que consideran que los extractos vegetales que presentan concentración letal cincuenta (CL50) menores de 1000 ppm pueden considerarse activos; en tanto que los extractos que muestren valores de CL50 menores de 20 ppm tienen una actividad significativa y pueden considerarse buenas fuentes potenciales de compuestos citotóxicos y antitumorales (Suffness y Pezzuto, 1991). Destaca la actividad encontrada para los extractos metanólicos de *Parthenium tomentosum* y *Zornia dyphilla* con CL50 de 1.12 y 6.78 ppm respectivamente.

Como era de esperarse, no se encontró ninguna correlación entre el efecto antimicrobiano y la toxicidad para *Artemia salina* presentada por los extractos activos. Sin embargo, existe la posibilidad que los extractos tóxicos para *Artemia salina* tengan algún efecto sobre los agentes casuales de las diarreas y disenterias de etiología amibiana y parasitaria, ya que como se mencionó previamente existen reportes de correlación entre toxicidad para *Artemia salina* y actividad antihelmíntica y antipalúdica. Definitivamente es necesario la relación de más investigaciones a fin de corroborar esta información.

Para concluir con esta discusión, se harán algunos comentarios finales relacionados con estudios farmacológicos previos efectuados con algunas de las especies objeto del presente estudio.

En un trabajo recientemente realizado en la Facultad de Química de la U.A.Q. (Pelaez H. 1994) se estudio el efecto de los extractos metanólicos de algunas plantas sobre la contractilidad espontánea del ileo aislado de rata. En dicha investigación se encontró que las especies *Conyza filaginoides*, *Croton fragilis*, *Datura lanosa*, *Gymnosperma glutinosum*, *Parthenium tomentosum*, *Potentilla thurberi*, *Pterogonum atrorubens* y *Zornia dyphilla* inducen relajación de la musculatura lisa intestinal. Resulta interesante el hecho de que todas las especies que mostraron actividad antimicrobiana, con excepción de *Lopezia racemosa*, adicionalmente tienen propiedades antiespasmódicas. Con base en esto es posible proponer que la actividad antiespasmódica presentada por estos extractos vegetales puede justificar, en parte, el uso de estas especies para tratar desórdenes gastrointestinales.

De manera adicional, la actividad antibacteriana mostrada por estas plantas puede tener un efecto benéfico adicional, particularmente en las diarreas de origen infeccioso.

8. CONCLUSIONES

1. La evaluación microbiológica de las 15 plantas objeto de estudio, demostró que las especies: *Commelina diffusa*, *Conyza filaginoides*, *Croton fragilis*, *Datura lanosa*, *Gymnosperma glutinosum*, *Lopezia racemosa*, *Potentilla thurberi*, *Pterogonum atrorubens* y *Zornia dyphilla*, tienen un efecto antibacteriano sobre por lo menos uno de los microorganismos de prueba.
2. Los valores de las concentraciones inhibitorias mínimas calculados para cada uno de los extractos, indicaron que las especies: *Commelina diffusa*, *Conyza filaginoides*, *Gymnosperma glutinosum* y *Zornia dyphilla* tienen un efecto bacteriano altamente significativo sobre *Staphylococcus aureus*.
3. El extracto metanólico de *Datura lanosa* mostró el mas amplio espectro de actividad contra las cepas enteropatógenas de *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Yersinia enterocolitica*.
4. La actividad antibiótica demostrada por *Commelina diffusa* y *Gymnosperma glutinosum*, de manera preliminar, puede atribuirse a la presencia del alcaloide 1-carbometoxi-B-carbolina y de los flavonoides emmaosunina y luiselizondina en *Commelina diffusa* y *Gymnosperma glutinosum* respectivamente.

5. La toxicidad para *Artemia salina* mostrada por doce de las plantas objeto de estudio, constituyen una evidencia que sugiere de manera preliminar que dichas especies tienen principios activos potencialmente citotóxicos y antitumorales. Destaca la actividad encontrada para los extractos metanólicos de *Parthenium tomentosum* y *Zornia dyphilla*.
6. Es posible proponer que la toxicidad para *Artemia salina* encontrada para las especies activas en este bioensayo, pudiera estar correlacionada con un efecto directo sobre los agentes etiológicos de las diarreas y disenterias de origen ambiental y parasitario.
7. No se encontró correlación entre la toxicidad para *Artemia salina* y el efecto antimicrobiano para los extractos activos.
8. Los extractos que presentaron actividad antibacteriana, con excepción de *Lopezia racemosa*, adicionalmente inducen relajación de la musculatura lisa intestinal. Con base en esto es posible afirmar que estas dos actividades biológicas justifican el uso etnomédico de estas plantas para el tratamiento de diarreas y disenterias en la medicina tradicional mexicana.

9. APENDICE I

Preparación de reactivos

- 1.- Cloruro de sodio al 10% : disolver 10 g de la sal de cloruro de sodio en un matraz volumétrico de 100 ml y diluir con agua destilada hasta la marca de aforo. Mezclar.
- 2.- Agua de bromo: saturar la cantidad necesaria de agua con vapores de bromo.
- 3.- Cloruro férrico al 1% : disolver 1 g de la sal de cloruro férrico en un matraz volumétrico de 100 ml y diluir con agua destilada hasta la marca de aforo. Mezclar.
- 4.- Hidróxido de sodio al 10% : disolver 10 g de lentejas de hidróxido de sodio en 50 ml de agua destilada, esperar a que la solución se enfríe a temperatura ambiente y entonces diluir con agua destilada hasta la marca de aforo. Mezclar.
- 5.- Reactivo de Benedict: disolver 100 g de carbonato de sodio anhidro y 173g de citrato, de sodio en 700 ml de agua destilada aproximadamente. Disolver 17.3g de sulfato de cobre en unos 100 ml de agua destilada aproximadamente y adicionar esta solución en la de carbonato-citrato, con agitación constante, aforar a un litro con agua destilada, (Domínguez, X. A., 1974).

- 6.- Ácido clorhídrico al 10% v/v : diluir 10 ml de ácido clorhídrico concentrado en 50 ml de agua destilada en un matraz volumétrico de 100 ml y llevar el volumen hasta la marca de aforo también con agua destilada. Mezclar.
- 7.- Reactivo de Mayer: disolver 13.55 g de cloruro mercuríco y 50 g de yoduro de potasio en un matraz volumétrico de 100 ml con agua destilada. Mezclar, (Domínguez, X. A., 1974).
- 8.- Reactivo de dragendorff (solución stock): disolver 2.6 g de carbonato de bismuto y 7.0 g de yoduro de sodio en 25 ml de ácido acético glacial, calentar la mezcla en baño maría, reposar el preparado de acetato de sodio durante 12 horas y después filtrar. A 20 ml del filtrado se le adicionan 8 ml de acetato de etilo, mezclar y almacenar en un frasco ámbar.
- 9.- Reactivo de Hager: consiste en una solución saturada de ácido pícrico en agua. Mezclar, (Domínguez, X. A., 1974).
- 10.- Reactivo de Guignard: disolver 1 g de carbonato de sodio y 100 mg de ácido pícrico en 100 ml de agua destilada. Mezclar, (Domínguez, X. A., 1974).
- 11.- Nitroprusiato de sodio al 0.5% : disolver 0.5 g de nitroprusiato de sodio en 100 ml de agua destilada. Mezclar.
- 12.- Hidróxido de sodio 2N : disolver 2.4 g de lentejas de hidróxido de sodio en 50 ml de agua destilada en un matraz volumétrico de 100 ml, esperar a que la solución se enfríe a temperatura ambiente y llevar el volumen hasta la marca de aforo también con agua destilada. Mezclar.

- 13.- Solución reveladora de sulfato de cesio: a 350 g de hielo se le adicionan lentamente 12 g de sulfato cerico amoniacal y 22.5 ml de ácido sulfúrico concentrado con poca agitación hasta formar una solución homogénea.
- 14.- Solución reveladora de reactivo de dragendorff: 10 ml de la solución stock de dragendorff se le adicionan 25 ml de ácido acético glacial y 60 ml de acetato de etilo. Mezclar y almacenar en frasco ámbar.

10. BIBLIOGRAFIA

- Adegoke, E. Akinsanya, A. and Naqui, A. (1968) Studies of Nigerian medicinal plants. 1: A preliminary survey of plant alkaloids. **JOURNAL OF WEST AFRICAN SCIENCES ASSOCIATION** 13, pp. 13-17.
- Alade, P.I. Irobi O.N. (1993) Antimicrobial Activities of Crude Leaf Extracts of *Acalypha wilkesiana*. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY** 39, pp. 171-174.
- Amabile Cuevas Carlos F. (1988) La resistencia a los antibióticos. **CIENCIA Y DESARROLLO** 80, pp. 171-174.
- Anderson, J.E., Goetz, C.M., McLaughlin, J.L. y Suffness, M. (1991) A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **PHYTOCHEMICAL ANALYSIS** 2, pp. 107-111.
- Anon, (1992) Cólera en Guatemala y América Latina; CURSO PRE-XLII CONGRESO NACIONAL DE MEDICINA. Guatemala. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY** 39, pp. 73-75.
- Arnason, J.T., Mackinnon, S., Durst, A., Philogene, B.J.R., Hasbun, C., Sánchez, P., Poveda, L., San Roman, L., Isman, M.B., Satasook, C., Towers, G.H.N., Wiriyachitra, P. y McLaughlin, J.L. (1993) Insecticides in tropical plants with nonneurotoxic modes of action. En: K.R. Downum, J.T. Romeo y H.A. Safford (eds.), **PHYTOCHEMICAL POTENTIAL OF TROPICAL PLANTS. RECENT ADVANCES IN PHYTOCHEMISTRY**, Vol. 27, Plenum Press, New York; pp. 107-131.
- Asenov, I. and Nikolov, S. (1988) Meditzina i Phizkultura. **PHARMACOGNOSY** 26, pp. 41.
- Bamgbose, S.O.A., Adewoye, H.O. (1979) Effect of *Enanthia chlorantha* on experimental liver damage. **JOURNAL OF AFRICAN MEDICINAL PLANTS** 2, pp. 91-94.
- Bandoni, A.L., Mendiondo, M.E. Rondina, V.D. and Coussio, J.D. (1972) Survey of Argentine medicinal plants. 1: Folklore and phytochemical screening. **JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS** 35, pp. 69-80.

Barry, A.L. y Thornsberry, C. (1991) Susceptibility test: diffusion test procedures. En: A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Hermann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (eds.), **MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**; Quinta edición; America Society for Microbiology; Washington, D.C.; pp. 1117-1125.

Barry, Arthur L. (1976) **THE ANTIMICROBIC SUSCEPTIBILITY TEST: PRINCIPLES AND PRACTICES**; 1ª Edición; Lea & Febiger; United States of America; pp. 142-218.

Bartotto, J.C. (1964) **FLORA MEDICINAL**; Arenaria; 1ª Edición, Buenos Aires, pp. 9-301.

Bailey; Scott, (1991) **DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO**; Panamericana; Séptima Edición; Buenos Aires; pp. 260, 376-381, 396, 424-425, 432.

Bever, B.O. (1986) Antiinfective activity of chemical compounds of higher plants. In: **MEDICINAL PLANTS OF TROPICAL WEST AFRICA**; 1ª Edición; Cambridge Universidad Press; Cambridge; p. 121.

Bhakuni, D.S., Bittner, M., Marticorena, C., Silvia, M. and Weldt, E. (1974) Screening of Chilean plants for antimicrobial activity. **JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS** 37, pp. 621-634.

Boletín de la Dirección General de Epidemiología de la SSA, semana 25 (1994) México; pp. 1, 14-19.

Boletín de la Dirección General de Epidemiología de la SSA; Subsecretaría de Coordinación y Desarrollo, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos; Vol. 1, 2, 3, No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, (1991, 1992, 1993) México.

Broussalis, A.M., García, G.H., Campos, R.H., Martino, V.S. and Ferraro, G. (1983) **ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE EXTRACTOS DE PLANTAS UTILIZADAS EN LA MEDICINA AUTOCTONA**, Premio Felix de Azara; Universidad de Buenos Aires; pp. 1-37.

Bryant, R.E. (1987) Pus: Fried or foe In: **CONTEMPORARY ISSUES IN INFECTIONS DISEASES**; Vol. 6; New Surgical and Medical. **APPROACHES IN INFECTICUS DISEASES** Root, R.K.; Trunkey, D.D., and Sande, M.A.; (eds.) Churchill Livingstone, Inc.; New York; pp. 31-48.

Cáceres Armando, Fletes Ligia, Aguilar Leila, Ramirez Olvi, Figueroa Ligia, Taracena Ana Maria and Samayoa Blanca (1993) Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3, Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. **JOURNAL OF ETHOPHARMACOLOGY** 38, pp. 31-37.

Cáceres Armando, Torres Miguel F., Ortiz Sergio, Cano Floridalma y Jauregui Elsa (1992) Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. IV Vibriocidal Activity of five American plants used to treat infections. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY** 39, pp. 73-75.

Comité Nacional para los Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) (1984) **Estándares de Eficiencia para las Pruebas de susceptibilidad**; Tercera Edición; México; pp. 1-24.

Cowan, S.T.; Steel, K.J. (1979) **MANUAL PARA IDENTIFICACION DE BACTERIAS DE IMPORTANCIA MÉDICA**; C.E.C.S.A.; Primera Edición; México, D.F.; pp. 79-3, 135-138, 143-148, 158, 161-163 y 164-166.

De la Cruz Martín (1991) **LIBELLUS DE MEDICINALIBUS INDORUM HERBIS**; Fondo de Cultura Económica; Segunda Edición; México, D.F.; pp. 3-8.

Dickie, P.; Bryan, L.E.; and Pichard, M.A. (1978) Effect of enzymatic adenylation dihydrostreptomycin accumulation in *Escherichia coli* carrying an R-factor: model explaining aminoglycoside resistance by inactivating mechanisms. **ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER** 14, pp. 569-580.

Domínguez, X.A. (1972) Triterpenes from *Conyza filaginoides*. **PHYTOCHEMISTRY** 11; pp 1855-1856.

Dominguez, X.A. (1974) Two penthomoxyflavones from *Gymnosperma glutinosum*. **PHYTOCHEMISTRY** 13; pp 1626-1628.

Estrada Lugo Erick (1992) **PLANTAS MEDICINALES DE MÉXICO**; Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo; Cuarta Edición; México, D.F.; pp. 38, 104-105, 186 y 295-296.

Goodman Gilman Alfred; Rall Theodore W.; Nies Alan S.; Taylor Palmer (1991) **LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA**. Editorial Médica Panamericana; Octava Edición; México; pp. 991-1169.

Gundidza Mazuru, Gaza Norrin (1993) Antimicrobial activity of *Dalbergia melanoxylon* extracts. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY** 40, pp. 127-130.

Gutkind, O.G. m Norbedom C., Mollerach, M., Ferraro, G., Coussio, J.D. and de Torresm R.A. (1984) Antibacterial activity of *Achyrocline flaccida*. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY** 10, pp. 319-321.

Harborne, S.V. (1982) Biochemistry of plant phenolics. **RECENT ADVANCES IN PHYTOCHEMISTRY** 12, p. 760.

Heinrich Michael; Kuhnt Michaela; Wright Colin W.; Rimpler Horst; Phillipson, Shandelmaier Alfred y Warhurst David C. (1992) Parasitological and microbiological evaluation of Mixe indian medicinal plants (México). **JOURNAL OF ETNOPHARMACOLOGY** 36, pp. 81-85.

Heinrich M.; Rimpler H. and Barrera N. Antonio (1992) Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a Lowland Mixe community (Oxaca, México); Ethopharmacology evaluation. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY** 36, pp. 63-80.

Hieronymus, J. (1882) **FLORA ARGENTINA**; Atlantida; 1ª Edición; Buenos Aires; pp. 19-353.

Jaffe, A.; Chabbert, Y.A.; and Derlot, E. (1983) Selection and characterization of betalactam-resistant *Escherichia coli* K-12 mutants. **ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER** 23, pp. 23, 622-625.

Kihman, Bae; Wonjon, Seo; Taeho, Kwon; Soohyun, Baek; Shiwoono, Lee; Kapduck, Jin (1992) Anticariogenic B-carboline alkaloids from *Commelina communis*. **ARC. PHARMACOL RES.** 15, pp. 220-223.

Koneman, E.W.; Allen S.D.; Dowell V.R.; Janda W.M.; Sommers H.M.; Winn W.C. (1992) **DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO**; Panamericana; Tercera Edición; Buenos Aires; pp. 226-227, 229-230, 237-238, 305-307, 321-323, 334-235 y 414.

Kostova I.N.; Nilolov N.M. and Chipilska L.N. (1993) antimicrobial properties of some hydroxycoumarins and *Fraxinus ornus* bark extracts. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY** 39, pp. 205-208.

Kumate R. Jesus (1990) **LIBELLUS DE MEDICINALIBUS INDORUM HERBIS**; Ciencia y Desarrollo; Vol. XVI, No. 95; México; pp. 17-67.

Lennette E .H. (1982) **MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLINICA**; Panamericana; Tercera Edición; Buenos Aires; pp. 119-124, 251-255, 273-276, 279-280, 287, 289 y 361-364.

Leven, M.; Dirk, A.; Vanden B., V.; Francis, M.; Vlietinck, A. and Lammens, E.; (1979) Screening of higher plants for biological activities I., Antimicrobial activity, **PLANTA MÉDICA** 36, pp.311-321.

Lewis, M.A., Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Rupprecht, J.,K., y Mclaughlin, J.L. (1993) Inhibition of respiration at site I by asimisin, an insecticidal acetogeniin of the pawpaw, *ASIMINA TRILOBA* (Annonaceae). **PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY** 45, pp. 15-23.

Lozoya, X.; Zolla C. (1986) **LA MEDICINA INVISIBLE**; Folios Ediciones; Tercera Edición; México; pp.257-260 y 268-269.

Martínez-Crovettom R. (1981) **PLANTAS UTILIZADAS EN MEDICINA EN EL NOROESTE DE CORRIENTES**. Ministerio de Cultura de la Nación, Tucuman, pp. 13-125.

Martínez, M. (1991) **LAS PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO**; Ediciones Botas V.; Sexta Edición; México, D.F.; pp. 2, 4, 9 y 10.

Mata, L.J.; Gangarosa, E.J.; Cáceres, A.; Perera D.R. and Mejicanos M.L. (1979) Epidemic Shiga bacillus dysentery in Central America. 1: Etiologic investigations in Guatemala. **JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES** 122, pp. 170-180.

Mata, R. (1993) Chemical studies and biological aspects of some Mexican plants used in traditional medicine. En: K.R. Downum, J.T. Romeo, H.A. Stafford (eds.), **PHYTOCHEMICAL POTENTIAL OF TROPICAL PLANTS. RECENT ADVANCES IN PHYTOCHEMISTRY**. Vol. 27, Plenum Press, New York, pp. 41-64.

Matthew J. Lynch, Stanley S. Raphael, Leslie D. Mellor (1977) **MÉTODOS DE LABORATORIO**; Interamericana; Segunda Edición; Tomo I; México; p. 107.

Mazuru Gundidza, Norrin Gaza (1993) Antimicrobial activity of Dalbergi melanoxylon extracts. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY** 40, pp. 127-130.

McLaughlin, J.L. (1991) Crown gall tumours on potato discs and bince shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. En: K. Hostettmann (ed). **METHODS IN PLANT BIOCHEMISTRY**. Assays for Bioactivity, Vol. 6, Academic Press, Great Yarmouth, Norfolk, pp. 1-32.

Medina, J.E., Rondina, V.D. and Coussio, J.D. (1977) Phytochemical screening of Argentine plants with potencial pharmacological activity (part VII). **PLANTA MÉDICA** 31, pp. 136-140.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. y McLaughlin, J.L. (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **PLANTA MÉDICA** 45, pp. 31-34.

Novelo, M., Cruz, J.G., Hernández, L., Pereda-Miranda, R., Chai, H., Mar, W. y Pezzuto, J.M. (1993) Cytotoxic constituents from *hyptis verticillata*. **JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS** 56, pp. 1728-1736.

Olukoya, D.K.; Idika N. and Odugbemi T. (1993) Antibacterial Activity of some medicinal plants from Nigeria. **JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY** 39, pp.69-72.

Olukoya, D.K.; Odugbemi, T.O. and Bamgbose, S.O.A. (1986) Some aspects of traditional therapy of gonorrhoea in Lagos Nigeria. **JOURNAL OF RESARCH IN ETHNOMEDICINE** 1, pp. 26-29.

Panizzi L.; Flamini G.; Cioni P.L. and Morelli I. (1993) composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. **JOURNAL OF ETNOPHARMACOLOGY** 39, pp. 167-170.

Perez Miravete, A. (1973) Tiofoidea en México. **REVISTA LATINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA** 15, pp. 61-68.

Pedersen, P.L. y Carafoli, E. (1987) Ion motive ATPases-ubiquity, properties, and significance to cell function. **TRENDS IN BIOCHEMICAL SCIENCES** 12, pp. 146-150.

Reinhold, L.; Harbornem, J.B. and Swain, J. (1981) Plant phenolics and plant diseases. **PROGRESS IN PHYTOCHEMISTRY** 7, p. 532.

Romero C.R. (1993) **MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA HUMANA**; Editorial Médica Panamericana; Primera Edición; México, D.F.; pp. 220-223, 251-252, 254-258, 265, 267-270, 277-278, 281, y 283-284.

Secretaría de Salud (1992) **MANUAL PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DEL COLERA EN MÉXICO**; Dirección General de Epidemiología; México.

Secretaría de Salud (1990) **GUIA PARA EL MANEJO EFECTIVO DEL NIÑO CON ENFERMEDAD DIARREICA**, Programa Nacional de Control de Enfermedades Diarreicas; Subsecretaría de Servicios de Salud; Dirección General de Medicina Preventiva Hospital Infantil de México Federico Gómez; México.

Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P. y Phillipson, J.D. (1993) A microwell cytotoxicity assay using *artemia salina* (brine shrimp). **PLANTA MÉDICA** 59, pp. 250-252.

Suffness, M. y Pezzuto, J.M. (1991) Assays related to cancer drug discovery. En: Hostettmann (ed.), **Methods in plant Biochemistry. ASSAYS FOR BIOACTIVITY**, Vol. 6, Academic Press, Great Yarmouth, Norfolk, pp 71-133.

Stoyanov, N. (1973) **OUR MEDICINAL PLANTS**; Nauka i Izkustwo, Sofia, part I; pp. 321-322.

Torres, M.F., Cano, F., González, C.L., Aguilar de Miranda, T. and Paniagua, F. (1991) **ETIOLOGIA Y DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE EL COLERA** Organización Panamericana de la Salud, Vol. 41; Guatemala; pp. 37-42.

Vaudaux, P. (1981) Peripheral inactivation of gentamicin. **J. ANTIMICROB CHEMOTHER** 8, suppl. A., pp. 517-525.

Verklin, R.M.; Jr. and Mandell, G.L. (1977) Alteration of effectiveness of antibiotics by anaerobiosis; **J.LAB. CLIN. MED.** 89, pp. 65-71.

Zimilis, V.M. and Jackson, G.G. (1973) Activity of aminoglycoside antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*: specificity and site of calcium and magnesium antagonism. J. INFECT. DIS. 127, pp. 663-669.