

**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**ESCRUTINIO DE LA ACTIVIDAD MICROBICIDA DE
Eupatorium spp**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA

Q.F.B. EDGAR GARCÍA SÁNCHEZ

ASESORES:

**D. C. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO
D. C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES**

MORELIA, MICHOACÁN, DICIEMBRE 2008

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Los plaguicidas en el sector agrícola	2
I.2. Los plaguicidas en el sector salud	5
I.3. Organismos causantes de infecciones nosocomiales en México	8
I.4. Las plantas medicinales y sus derivados en el control de enfermedades	11
I.5. Generalidades de la familia Asteraceae	14
I.5.1. Tribus, géneros y especies de la familia Asteraceae	15
I.5.2. La familia Asteraceae en México	15
I.6. Características del género <i>Eupatorium</i>	18
I.6.1. Fitoquímica del género <i>Eupatorium</i>	18
I.6.2. Usos en medicina tradicional del género <i>Eupatorium</i>	18
II. JUSTIFICACIÓN	22
III. HIPÓTESIS	23
IV. OBJETIVOS	23
IV.1. Objetivo general	23
IV.2. Objetivos particulares	23
V. MATERIAL Y MÉTODOS	24
V.1. Organismos utilizados	24
V.1.1. Bacterias	24
V.1.2. Hongos	24
V.1.3. Oomicetos	24
V.2. Material vegetal	25
V.2.1. Plantas	25
V.2.2. Colecta de las planta	25
V.2.3. Obtención de extractos vegetales (partes aéreas)	26
V.2.4. Obtención de los extractos de raíz	26
V.3. Ensayos biológicos	27
V.3.1. Preparación de medios de cultivo	27
V.3.2. Preparación de cepas bacterianas	27

V.3.3. Estandarización del inóculo bacteriano	27
V.3.4. Preparación de los extractos y sustancias control	27
V.3.5. Método de difusión en agar para bacterias y levaduras	28
V.3.6. Método de difusión en agar para hongos filamentosos y oomicetos	30
V.4. Purificación y análisis de componentes mayoritarios	31
V.4.1. Desengrasado de extractos	31
V.4.2. Cromatografía en columna	31
V.4.3. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)	32
V.4.4. Espectroscopia de masas acoplado a cromatografía de gases	33
V.5. Análisis de resultados	33
VI. RESULTADOS	34
VI.1. Selección de la planta con el mejor efecto microbicida	34
VI.2. Efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento bacteriano	36
VI.2.1. Efecto bacteriostático de los extractos cloruro metilénicos	36
VI.2.2. Efecto bacteriostático de los extractos metanólicos	36
VI.2.3. Efecto bacteriostático de los extractos hexánicos	39
VI.2.4. Efecto bactericida de los extractos hexánicos	41
VI.3. Efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de hongos	42
VI.3.1. Efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de <i>Candida albicans</i>	42
VI.3.2. Efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de hongos filamentosos	44
VI.4. Efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de oomicetos	44
VI.5. Efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de <i>Saccharomyces boulardii</i>	49
VI.6. Efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de <i>Lactobacillus casei</i>	49
VI.7. Purificación e identificación de componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor	51
VI.7.1. Análisis espectroscópico del componente mayoritario A	53
VI.7.2. Análisis espectroscópico del componente mayoritario B	56
VI.8. Efecto bactericida del ácido catívico y ácido labdanólico	60
VI.9. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los ácidos catívico y labdanólico	62
VI.10. Determinación de la variación natural de los componentes microbicidas	63
VI.11. Efecto microbicida de dos extractos hexánicos totales de flor de <i>E. cardiophyllum</i> colectados en diferente tiempo	65

VII.	DISCUSIÓN	67
VIII.	RESUMEN DE RESULTADOS	72
IX.	CONCLUSIÓN	73
X.	LITERATURA CITADA	74
XI.	ANEXOS	83

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Producción de plaguicidas en México en el periodo de 1996 - 2006	3
Figura 2. Intoxicación por plaguicidas en el año 2002	4
Figura 3. Principales organismos causantes de infecciones nosocomiales en México	9
Figura 4. Esquema del método de difusión en agar para determinar el posible efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano y levaduriforme	30
Figura 5. Esquema del método de difusión en agar para determinar el posible efecto inhibitorio del crecimiento de hongos filamentosos y oomicetos	31
Figura 6. Especies vegetales utilizadas para el escrutinio microbiciada	35
Figura 7. Efecto bacteriostático de los extractos totales cloruro metilénicos de <i>E. cardiophyllum</i>	37
Figura 8. Efecto bacteriostático de los extractos metanólicos totales de <i>E. cardiophyllum</i>	38
Figura 9. Efecto de los extractos hexánicos totales sobre el crecimiento bacteriano	40
Figura 10. Efecto bacteriostático y bactericida de los extractos hexánicos totales de <i>E. cardiophyllum</i>	41
Figura 11. Efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de <i>C. albicans</i> a las 72 h	43
Figura 12. Efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de hongos filamentosos	45
Figura 13. Efecto de los extractos hexánicos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de hongos filamentosos	46
Figura 14. Efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de oomicetos	47
Figura 15. Efecto de los extractos hexánicos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de oomicetos	48
Figura 16. Efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de <i>S. boulardii</i>	49

Figura 17.	Bioensayo por difusión en agar de los extractos hexánicos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de <i>L. casei</i>	50
Figura 18.	Análisis de espectrometría de masas acoplado a gases del componente mayoritario del extracto hexánico de flor denominado “Compuesto A”	54
Figura 19.	Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del componente mayoritario del extracto hexánico de flor denominado “Compuesto A”	55
Figura 20.	Análisis de espectrometría de masas acoplado a gases del componente mayoritario del extracto hexánico de flor denominado “Compuesto B”	57
Figura 21.	Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del componente mayoritario del extracto hexánicos de flor denominado “Componente B”	58
Figura 22.	Efecto bactericida de los ácidos catívico y labdanólico	61
Figura 23.	Efecto bactericida de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor de <i>E. cardiophyllum</i>, los ácidos catívico y labdanólico	62
Figura 24.	Efecto microbicida de los ácidos catívico y labdanólico	64
Figura 25.	Bioensayo por difusión en agar de dos extractos hexánicos totales de flor de <i>E. cardiophyllum</i> colectados en diferente tiempo	66

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Resistencia intrínseca y mecanismos de acción	7
Cuadro 2. Algunas plantas importantes en la medicina tradicional mexicana	13
Cuadro 3. Principales familias de compuestos encontrados en las plantas	14
Cuadro 4. Número de géneros nativos de Asteraceae por tribu en los distintos continentes o partes de continentes	17
Cuadro 5. Las diez familias más diversas de Magnoliophyta en México	17
Cuadro 6. Algunos compuestos aislados de especies del género <i>Eupatorium</i>	20
Cuadro 7. Usos en medicina tradicional, nombre común, órganos utilizados y lugar de algunas especies del género <i>Eupatorium</i>	21
Cuadro 8. Rendimiento (%) y propiedades organolépticas de los extractos de <i>E. arsenei</i> , <i>E. pulchellum</i> y <i>E. cardiophyllum</i>	29
Cuadro 9. Mezclas de disolventes utilizados en la cromatografía en columna	32
Cuadro 10. Efecto microbicida de los extractos de <i>E. arsenei</i> , <i>E. puchellum</i> y <i>E. cardiophyllum</i>	36
Cuadro 11. Efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de <i>L. casei</i>	50
Cuadro 12. Resumen de efecto microbicida de los extractos de hexánicos totales de <i>E. cardiophyllum</i>	51
Cuadro 13. Condiciones de la cromatografía en columna	52
Cuadro 14. Componentes mayoritarios del extracto desengrasado de flor de <i>E. cardiophyllum</i>	53
Cuadro 15. Datos de resonancia magnética nuclear de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor, ácido catívico y ácido labdanólico	59
Cuadro 16. Datos de EIMS espectrometría de masas acoplado a gases de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor, ácido catívico y ácido labdanólico	60
Cuadro 17. Concentración Mínima Inhibitoria de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor, los ácidos catívico y labdanólico	63

Cuadro 18. Comparación de dos extractos hexánicos de flor de <i>E. cardiophyllum</i>	65
Cuadro 19. Efecto microbicida de dos extractos hexánicos totales de flor de <i>E. cardiophyllum</i> colectados en diferente tiempo	66
Cuadro 20. Resumen del efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento bacteriano	83
Cuadro 21. Resumen del efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de hongos filamentosos	84
Cuadro 22. Resumen del efecto de los extractos totales de <i>E. cardiophyllum</i> sobre el crecimiento de oomicetos	84

Resumen

La resistencia de microorganismos patógenos causada por el uso excesivo e inadecuado de plaguicidas de uso comercial, es un problema a nivel mundial, por lo que se ha hecho necesario la búsqueda de nuevas sustancias para que los controle, pero que además sea económico y tenga menos efectos adversos en el ser humano y al ambiente. Una alternativa es utilizar los componentes microbicidas de origen vegetal, ya que las plantas son una biofuente de componentes químicos biodegradables de los cuales es posible determinar su espectro microbicida. En el presente trabajo se determinó la eficacia de extractos y componentes puros derivados de plantas contra bacterias, hongos y oomicetos. Se seleccionaron tres plantas endémicas del Estado de Michoacán *Eupatorium arsenei* (*Ageratina arsenei* (Rob.) King & Rob.), *Eupatorium pulchellum* H. B. K. (*Chromolaena pulchella* (H.B.K.) King & Rob.) y *Eupatorium cardiophyllum* B.L. Rob. (*Ageratina cardiophylla* (B. L. Rob.) King & H. Rob.) a cuales se les realizó un escrutinio microbicida y se identificaron los extractos y componentes que inhibieron el crecimiento de bacterias, hongos y oomicetos. Los resultados mostraron que los extractos de *E. cardiophyllum* presentaron un mayor efecto microbicida al compararse con los extractos de *E. arsenei* y *E. pulchellum*, de tal forma se seleccionó a *E. cardiophyllum* para continuar con el escrutinio. Se observó que los extractos hexánicos de esta planta presentan mayor actividad contra bacterias, hongos y oomicetos. Con la finalidad de hacer una búsqueda biodirigida se seleccionó el extracto hexánico de flor de donde se aislaron, purificaron e identificaron dos componentes mayoritarios: los ácidos catívico y labdanólico. De estos componentes se determinó su efecto microbicida y se observó que afectan el crecimiento de bacterias Gram positivas, siendo más activo el ácido catívico. Por último no se observó variación natural local de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor de *E. cardiophyllum* al realizar extracciones en diferente año.

I. Introducción

En el desarrollo de la humanidad, el hombre ha buscado la forma de combatir plagas corporales o para facilitar las actividades agrícolas y mejorar la producción de alimentos para satisfacer a la población. Es por eso que se han producido una gran cantidad de sustancias tóxicas, la mayoría producidas por síntesis química, que no existen de manera natural, denominadas xenobióticos. Es en el siglo XX fue cuando se desarrolló una gran cantidad de compuestos sintéticos utilizados como plaguicidas (organoclorados y organofosforados) (Secretaría de Salud, acrónimo SS, 2006).

La definición de plaguicida ampliamente aceptada es “la sustancia o mezcla de ellas destinadas a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo los vectores de enfermedad humana y animal; así como también especies de plantas o animales no deseados que provocan un daño duradero u otras que interfieren en la producción, procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización de alimentos; también incluye los productos químicos utilizados para controlar insectos, arácnidos u otras plagas corporales” (FAO, 1997). Dentro de esta definición se incluyen insecticidas, herbicidas, fungicidas y antibacterianos del sector agrícola y todos los agentes antimicrobianos de uso en el sector salud.

Sandiumenge y col. (2006), establecieron que los plaguicidas de uso comercial ocasionan un daño irreversible a diversos sistemas bióticos (plantas y animales), abióticos (agua, aire y suelo) y uno muy importante es que son los responsables del desarrollo de cepas de microorganismos resistentes, además se bioacumulan tanto en plantas como animales y su permanencia en el ambiente es muy elevada, por ejemplo la estabilidad en el ambiente de los organoclorados es por arriba de los 50 años (Secretaría de Salud, 2006).

Es en esta área del conocimiento es en la que se desarrolló la presentación del texto que conforma la evidencia que apoya a esta tesis, se encontrará una reseña histórica general de los plaguicidas, del impacto negativo en el ecosistema y en la salud del hombre. Asimismo se plantea un panorama general de la importancia de los metabolitos secundarios vegetales en el desarrollo de nuevos fármacos y los factores etnobotánicos, de medicina tradicional y fitoquímicos que motivaron a buscar metabolitos microbicidas en especies de la Tribu Eupatoriae, tal como *Eupatorium arsenei* (*Ageratina arsenei* (Rob.) King & Rob.), *Eupatorium pulchellum* H. B. K. (*Chromolaena pulchella* (H.B.K.) King & Rob.) y *Eupatorium cardiophyllum* B.L. Rob. (*Ageratina cardiophylla* (B. L. Rob.) King & H. Rob.). Esta búsqueda de metabolitos

microbicidas se hizo siguiendo criterios específicos que condujeron a la obtención de extractos microbicidas y de igual forma permitieron el aislamiento, purificación e identificación de dos metabolitos secundarios con propiedades microbicidas.

I.1. Los plaguicidas en el sector agrícola

La historia de los plaguicidas se divide en tres etapas: la primera tuvo su origen en el siglo XIX en la que se descubrió la acción plaguicida de elementos naturales como el azufre, cobre, arsénico y fósforo. La segunda inició en 1922 con la utilización de diferentes aceites insecticidas derivados de petróleo y la tercera comienza con la producción de compuestos sintéticos que no habían sido diseñados en la naturaleza y para los cuales no existen mecanismos naturales de degradación (Damián Badillo y col., 2007). En esta etapa, se desarrollaron todos los plaguicidas que hoy en día son los responsables del daño ambiental y agentes causales de importantes afecciones humanas tales como el cáncer, mal de Parkinson y el síndrome de Alzheimer. El ejemplo clásico de beneficio/daño de estas sustancias surgió por primera vez en 1940 cuando Muller descubre las propiedades insecticidas en el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), el cual fue usado para eliminación del piojo humano que transmite enfermedades como el Tifo, a partir de este momento se origina la producción a gran escala de plaguicidas órgano-sintéticos, por ejemplo: los órgano-clorados, sustancias con átomos de Carbono, Cloro, Hidrógeno y en ocasiones Oxígeno que son estables en el ambiente o los órgano-fosforados, derivados del ácido fosfórico que tienen un átomo central de Fósforo, son inestables en el ambiente y extremadamente tóxicos (Secretaría de Salud; acrónimo SS, 2006). El uso intensivo de estos compuestos originó enormes problemas de contaminación ambiental, el DDT fue encontrado en diversos productos alimenticios, dando como resultado su prohibición en 1979, aún hoy en día se encuentra bioacumulado en grandes cantidades (SS, 2006). Otro ejemplo son el Helderin, Benceno, Clordano, sustancias que son mutagénicas y carcinogénicas.

Después que ellos aparecieron otros plaguicidas menos tóxicos como los carbamatos (ésteres de carbamato N- metilo), actualmente son los que están en uso y se encuentran en los insecticidas y en algunos herbicidas comerciales (SS, 2006).

El uso excesivo e inapropiado de plaguicidas en el campo mexicano y en países en vías de desarrollo ha provocado severos problemas en la salud humana, como son los cánceres. Aproximadamente tres millones de personas son envenenadas anualmente por este tipo de compuestos químicos, de ellos murieron aproximadamente 220,000

personas, de los cuales el 75% fueron trabajadores del sector agrícola (Konradsen y col., 2005). El Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) en el 2007 (Fig. 1), reportó que la producción de plaguicidas a nivel nacional de 1996 al 2006, se mantuvo por debajo de 40,000 toneladas anuales hasta el 2004, lo importante es observar que del 2004 al 2006 se disparó la producción por arriba de 45,000 toneladas anuales de estos plaguicidas y la tendencia va a la alza (INEGI, 2007). Cabe mencionar que en esta situación aún falta considerar la cantidad de plaguicidas que son importados a nuestro país.

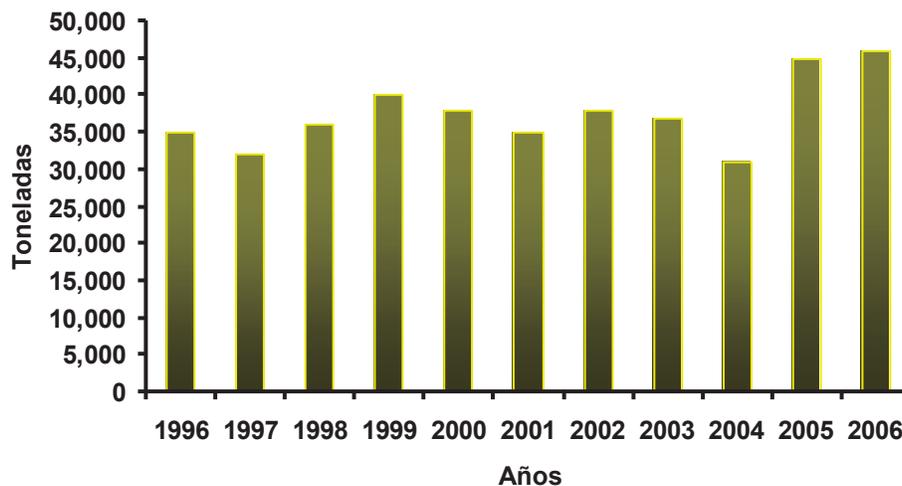


Figura 1. Producción de plaguicidas en México en el periodo de 1996 - 2006, Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, 2007.

Los microorganismos que afectan la salud de las plantas son la principal y crónica amenaza para la producción de alimentos y la estabilidad del ecosistema en el mundo entero. La producción agrícola se ha intensificado en las últimas décadas debido al uso de plaguicidas que protegen a los cultivos, logrando con esto una estabilidad económica. Sin embargo el incremento del uso de estos químicos causa severos daños por ejemplo, induce resistencia de los organismos patógenos y daños irreversibles al ambiente (Gerhardson, 2002). Además, el incremento en los costos de los plaguicidas y a la demanda de alimentos libres de ellos, trae como consecuencia que se busquen nuevas alternativas económicas, menos dañinas para el humano y el ambiente.

Por otro lado las enfermedades adquiridas durante el transporte y almacenaje de alimentos perecederos, producen una gran pérdida económica, debido a su gran

contenido de agua, nutrientes y pH, factores fisiológicos que los hace susceptibles al ataque de hongos. Al nivel mundial las pérdidas poscosecha de alimentos perecederos debido a hongos van del 10 al 50%. Los fungicidas que son usados hoy en día para controlar las enfermedades poscosecha de los alimentos son cancerígenos (Tripathi y col., 2004). El impacto tóxico de los plaguicidas en la salud de los trabajadores agrícolas se ejemplifica en un estudio realizado por la Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS 2002) (Fig. 2), En él se ubica al Estado de Michoacán en el tercer lugar a nivel nacional con 177 casos de intoxicaciones causadas por plaguicidas usados en la agricultura (COFEPRIS, 2002).

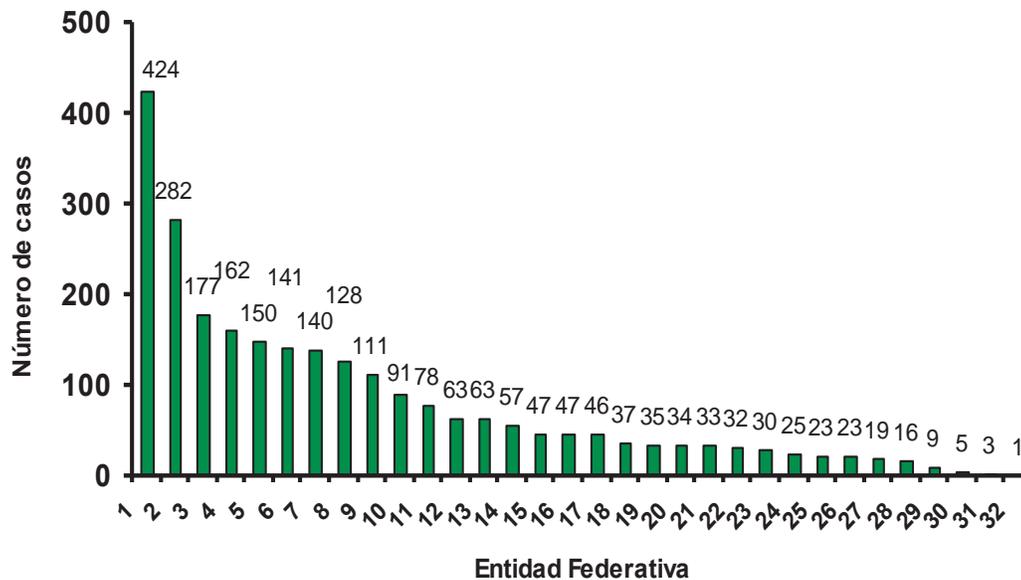


Figura 2. Intoxicación por plaguicidas en el año 2002., Comisión Federal de Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). 1 = Jalisco, 2 = Nayarit, 3 = Michoacán, 4 = Guanajuato, 5 = Chiapas, 6 = Veracruz, 7 = Sinaloa, 8 = Nuevo León, 9 = Puebla, 10 = Morelos, 11 = Estado de México, 12 = Querétaro, 13 = Chihuahua, 14 = B. C. Norte, 15 = San Luís Potosí, 16 = Quintana Roo, 17 = Guerrero, 18 = Coahuila, 19 = Aguascalientes, 20 = Tamaulipas, 21 = Campeche, 22 = Oaxaca, 23 = Tabasco, 24 = D. F., 25 = Zacatecas, 26 = Hidalgo, 27 = B.C. Sur, 28 = Sonora, 29 = Durango, 30 = Colima, 31 = Yucatán y 32 = Tlaxcala.

Los síntomas representativos que ocasionan los plaguicidas están en función de la cantidad y tiempo de exposición, van desde ligeros hasta severos. La intoxicación ligera incluye náusea, vómito, diarrea, pérdida de apetito, cansancio, sudoración, dolor abdominal; la intoxicación moderada incluye disnea, decremento de la fuerza muscular,

broncoespasmos, miosis, flacidez muscular, temblor, hipo o hipertensión, y bradicardia, la intoxicación severa puede dar origen al coma, parálisis respiratoria, cianosis, hipotensión sostenida, parálisis muscular y convulsiones (Iowa State University, 1995). También se les ha asociado con una gran variedad de cánceres, en donde sobresalen las leucemias y recientemente se la ha asociado con el mal de Parkinson (SS, 2006).

I.2. Los plaguicidas en el sector salud

La quimioterapia surgió a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, las dos personas importantes con este hecho por sus descubrimientos fueron Alexander Fleming y Luis Pasteur, por sus trabajos basados en las enfermedades infecciosas y su tratamiento. Un acontecimiento importante de muchos otros fue el descubrimiento de la penicilina, el éxito fue rápido y espectacular, y el impacto en la medicina fue extraordinario. La mortalidad y morbilidad infantiles se redujeron enormemente y muchas enfermedades que producían elevadas tasas de mortalidad se redujeron de manera considerable. Sin embargo, el uso excesivo y en la mayoría de las veces inadecuado de la penicilina y de otros antimicrobianos ha conducido al desarrollo rápido de resistencias específicas en los microorganismos patógenos (Madigan y col., 2004).

Otros usos indiscriminados de los antibióticos también contribuyen a la aparición de cepas multi-resistentes. Por ejemplo, los antibióticos que se emplean en agricultura y ganadería, utilizados como profilácticos pero que estimulan el crecimiento animal más que para prevenir la aparición de enfermedades o en el tratamiento de las existentes. Algunos de los últimos brotes de infecciones transmitidas por alimentos se han atribuido al uso de antibióticos en el ganado y en sus productos con valor agregado (Madigan y col., 2004).

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos de uso comercial es un problema grave de salud pública que involucra a todos los países del mundo, puesto que una de las consecuencias es la alta morbilidad y mortalidad por cepas microbianas multi-resistentes, evidentemente que al sector salud y laboral causan grandes pérdidas económicas y morales, así como una disminución en la precaria calidad humana de los sectores sociales más desprotegidos (Díaz-Ramos, 2006). Uno de los impactos más relevantes que ha tenido la resistencia bacteriana es el económico. Se sabe, por ejemplo que las infecciones con microorganismos resistentes a la penicilina y meticilina tienen un costo anual de 530 billones de dólares en Norte América. Mientras que en países en vías en desarrollo se desconoce el impacto de las cepas multi-resistentes, pero se infiere

que ocurre una situación similar a la descrita puesto que los antibacterianos son caros y prácticamente inaccesibles para la población (Zurita y col., 2005).

Es importante distinguir la forma en que un organismo demuestra su resistencia a los antibacterianos, entendiendo que la resistencia bacteriana puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca se caracteriza por que es inherente a una especie en particular, estos organismos pueden perder sus sitios blancos o poseer barreras naturales evitando que el agente antibacteriano actúe. Es una propiedad innata de la bacteria y pueden estar involucrados uno o varios mecanismos de resistencia, como se ejemplifica en el Cuadro 1.

Resistencia de bajo nivel. Esta resistencia puede ser superada al asociar con un β -lactámico que actúe sobre la pared como ampicilina o vancomicina (Cuadro 1a). Producción de β -lactamasa de amplio espectro. Prácticamente todas las *Klebsiella pneumoniae* [Kpn] producen constitutivamente bajos niveles de esta enzima, es la SHV-1 [clase A de Ambler, grupo 2b de Karen Bush]. La presencia de esta enzima confiere resistencia a todo el grupo amino y carboxipenicilinas. Excepcionalmente puede encontrarse un aislamiento de Kpn con sensibilidad intermedia e incluso un muy pequeño número de sensibles, pero esto puede deberse a que el bajo nivel de enzima producido no es suficiente para inactivar completamente al antibacteriano. A pesar de esto, un aislamiento de Kpn sensible a ampicilina debe ser confirmado en cuanto su identificación bioquímica y su sensibilidad debido a que puede tratarse de un error en la identificación o en la prueba de susceptibilidad. En los aislados de Kpn sensibles a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina y ticarcilina pues son excepcionales. Esta enzima puede ser inhibida por los inhibidores de β -lactamasas como sulbactam y ácido clavulánico, (Cuadro 1b). Producción de β -lactamasa cromosómica del tipo AMP-C. Esta enzima pertenece a la clase C de Ambler grupo 1 de Karen Bush. En las cepas salvajes o silvestres, ésta se expresa en forma inducible. Es reversible y son resistentes a la inhibición por los inhibidores de β -lactamasas como son sulbactam, tazobactam y ácido clavulánico. Puede haber excepciones con las sulfonas, como sulbactam y tazobactam, (Cuadro 1c).

Cuadro 1. Resistencia intrínseca y mecanismos de acción.

Microorganismo	Mecanismo presente	Resistencia intrínseca
<i>Enterococcus</i>	Pobre afinidad a las proteínas fijadoras de penicilinas (PFP)	Cefalosporinas
<i>Enterococcus</i>	Resistencia de bajo nivel por la incapacidad del aminoglucósido de penetrar la pared celular ^a	Aminoglucósidos
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Producción de una β -lactamasa de espectro ampliado (BLEA) ^b	Ampicilina, amoxicilina, carbenicilina y licarcilina
<i>Enterobacter</i> spp. y <i>Serratia</i> spp.	Producción de una β -lactamasa cromosómica del tipo AMP-C ^c	Ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de primera y segunda generación y cefamicinas (cefoxilina)
<i>Providencia stuartii</i>	Presencia de una enzima modificante de localización cromosómica.	Gentamicina, tobramicina, netilmicina, dibekacina. No afecta a amikacina, ni kanamicina.
<i>Proteus penneri</i>	No determinado	Cloranfenicol
<i>Proteus</i> spp.	No determinado	Nitrofurantoína, polimixinas y tetraciclinas
Enterobacterias	Baja permeabilidad en su membrana externa	Penicilina, oxazoil penicilinas, clindamicina, lincomicina.
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Falta de producción de proteínas en la membrana externa	Aminoglucósidos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No determinado	Trímetoprim-sulfametoaxol
Anaerobios	Falta de producción de proteínas en la membrana externa	Aminoglucósidos
<i>Stenotrophomonas</i>	No determinado	Imipenem
Bacilos Gram negativos	Incapacidad de atravesar la membrana celular, la molécula de vancomicina es muy grande para atravesar los canales protéicos (porinas)	Vancomicina

Tomado de (Zurita y col., 2005)

La resistencia adquirida es una modificación en la composición genética de la bacteria de tal manera que si un antibacteriano, alguna vez fue activo sobre esa bacteria, al adquirir resistencia, éste ya no es activo para inhibir el crecimiento. La tolerancia a un antibacteriano también es considerada como resistencia adquirida (Zurita y col., 2005).

Estrategias por las cuales las bacterias evitan la acción de los antibacterianos son:

1. Logran limitar la concentración intracelular del antibacteriano a través del sistema de eflujo.
2. Pueden neutralizar al antibacteriano mediante enzimas “inactivantes”, ésta neutralización puede ser reversible o irreversible.
3. Impidiendo la penetración del antibacteriano al alterar el sitio blanco o crear nuevas vías metabólicas.
4. Alterando la permeabilidad de la membrana celular bacteriana limitando el ingreso del antibacteriano.

Las bacterias pueden utilizar uno o más mecanismos para eludir la acción del antibacteriano, por ejemplo: En *P. aeruginosa* la producción de una enzima puede conferir resistencia a un aminoglucósido en particular, pero la presencia del mecanismo de impermeabilidad confiere resistencia a toda la familia de aminoglucósidos. La producción de la enzima β -lactamasa de espectro extendido en *K. pneumoniae* confiere resistencia a todas las cefalosporinas de primera a cuarta generación. La presencia de la porina OprD en *P. aeruginosa*, confiere resistencia al antibacteriano Imipenem pero no al Meropenem ni Ceftazidima. La mutación que causa un cambio en sitio blanco de la pared celular del *S. aureus* debido a la presencia del gen *mecA* confiere resistencia no sólo a la oxacilina sino también a todos los β -lactámicos incluidas cefalosporinas e Imipenem (Zurita y col., 2005).

I.3. Organismos causantes de infecciones nosocomiales en México.

En México los principales organismos causantes de infecciones nosocomiales se muestran en la Figura 3, son datos estadísticos publicados en la Revista Latinoamericana de Microbiología en el 2003.

Cada uno de estos microorganismos tienen particularidades que requieren de un análisis específico, ejemplos bacterianos son los siguientes:

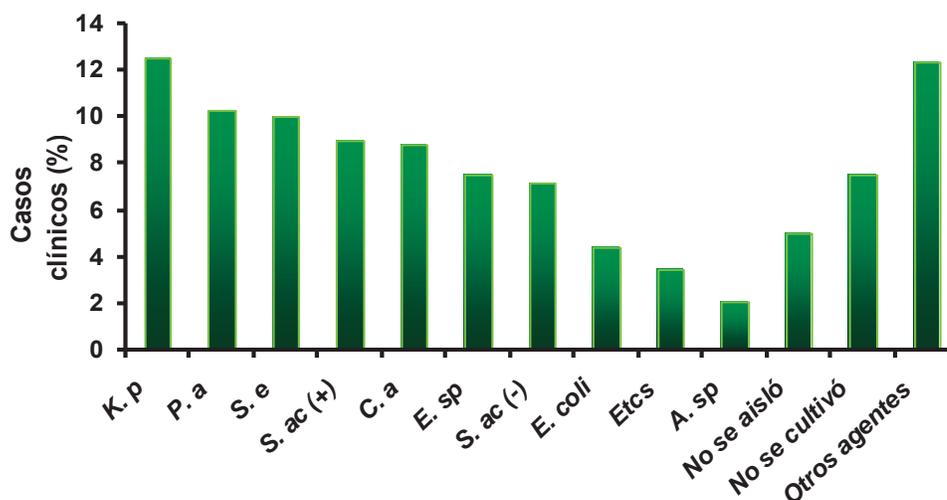


Figura 3. Principales organismos causantes de infecciones nosocomiales en México. *K. p* = *Klebsiella pneumoniae*, *P. a* = *Pseudomonas aeruginosa*, *S. e* = *Staphylococcus epidermidis*, *S. ac (+)* = *Staphylococcus aureus coagulasa (+)*, *C. a* = *Candida albicans*, *E. sp* = *Enterobacter sp* = *S. ac (-)* = *Staphylococcus aureus coagulasa (-)*, *E. coli* = *Escherichia coli*, *Etc's* = *Enterococcus*, *A. sp* = *Acinetobacter sp*. Revista Latinoamericana de Microbiología, México 2003 (Díaz-Ramos, 2006).

Staphylococcus aureus. Coloniza la piel sobre todo en sitios de inserción de cabello y mucosas del humano a que se le considera reservorio natural en el 20 y 50 % de la población normales. El hombre es portador intermitente en el 90 %, y del 10 al 20% de la población se consideran portadores permanentes. Se le ha aislado de secreciones nasofaríngeas, manos y fomites, se han detectado cepas con gran virulencia como *S. aureus* meticilina-resistente (SAMR) (Díaz-Ramos, 2006).

La adherencia a los tejidos del huésped o materiales implantados está mediada genéticamente por un receptor que involucra la interacción de proteínas del huésped, reguladas por el sistema *sar/agr* que dependen de la unión de fibronectina, colágena y fibrinógeno. Esta capacidad se relaciona con la producción de una biopelícula, que protege a la bacteria y facilita la adhesión a catéteres y otros sistemas implantados. Se asocia también a la producción de abscesos tempranos y a la producción de exoproteínas (coagulasa) y toxinas. Otros factores de virulencia son: la unión a plaquetas y a células fagocíticas, la interacción con células endoteliales, el depósito de complejos inmunes con la liberación de factor de necrosis tumoral y otras sustancias desencadenantes de choque y coagulación intravascular diseminada (Díaz-Ramos, 2006).

Pseudomonas aeruginosa. Es un bacilo Gram negativo no fermentador que no es exigente para crecer, el ambiente hospitalario es favorable para su permanencia y diseminación. Su patogenicidad depende de varias capacidades: el ataque a las células del huésped, la adhesión a epitelios a través de Pili (fimbrias), la producción de un polisacárido extracelular (biopelícula), toxinas extracelulares como la exotoxina A, responsable de la necrosis tisular, daño hepatocelular y choque anafiláctico; exoenzimas S, T, U, Y, que incrementan el daño tisular e incrementan la virulencia; elastasa y proteasa alcalina, que contribuyen a la adherencia, virulencia, necrosis tisular e inactivación del complemento (Díaz-Ramos, 2006). Dentro de los hongos patógenos para el ser humano el género *Candida* es uno de los más representativos al hablar de organismos fúngicos más resistentes a los antifúngicos comerciales.

Los hongos y oomicetos fitopatógenos son importantes por que destruyen cultivos de importancia económica a nivel mundial, es un problema que afecta a países desarrollados y en vías de desarrollo. De los hongos los géneros más representativos son *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Botrytis* y *Rhizoctonia*. Los cultivos más importantes para el Estado de Michoacán que se ven afectados por estos organismos son: aguacate, papa, mango, fresa y chile. Por ejemplo *C. gloeosporioides* destruye preferentemente cultivos de mango y aguacate. Tripathi y Dubey (2004), reportan que el mango es susceptible al ataque de estos organismos debido a la elevada humedad, bajo pH y la presencia de nutrientes presentes en el fruto, las pérdidas poscosecha de cultivos percederos asciende al 50 % a nivel mundial.

Los oomicetos son organismos eucariontes que su crecimiento es parecido al de los hongos filamentosos, en un inicio se clasificaron como hongos, posteriormente con análisis moleculares y bioquímicos se determinó que están más relacionados con las algas y se reubicaron dentro del Reino *Chromista*.

Un género importante de los oomicetos es *Phytophthora* del cual se conocen 60 especies. Dentro de las especies más representativas son *P. cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *P. infestans* por ser las que afectan con mayor frecuencia cultivos vegetales de importancia económica a nivel mundial como papa, frijol, chile, tomate, pepino y alfalfa (Fry y Goodwin, 1997).

Un acontecimiento importante del poder destructivo de estos organismos tuvo lugar en Europa en la mitad del siglo XIX con la destrucción total de cultivos de papa por *P. infestans*, causando pérdidas por arriba de cinco billones de dólares en la

producción de papa en el mundo entero, provocando miles de muertes humanas y promovió que la gente migrara a los Estados Unidos de Norte América (Duncan, 1999).

I.4. Las plantas medicinales y sus derivados en el control de enfermedades

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades humanas, incluidas las de etiología infecciosa producidas por microorganismos, que en estos tiempos continúan siendo un desafío para la medicina (Domingo y López Brea, 2003). Si se considera, por ejemplo, que en la parte aérea de las plantas, la filósfera y especialmente en las hojas, existen alrededor de 10^6 - 10^7 células/cm² de microorganismos principalmente bacterias (Andrews y Harris, 2000). La mayoría de estos organismos forman parte de la ecología vegetal, logrando una interacción planta-patógeno, que implica un lenguaje químico bidireccional para el reconocimiento dando lugar entonces a la presencia de sustancias con actividad antimicrobiana.

El uso de compuestos naturales obtenidos de plantas data de mucho tiempo atrás. Existen pruebas de que los hombres del Neandertal que ocuparon Irak hace 60,000 años usaron plantas con fines medicinales. Posteriormente, Hipócrates en la medicina griega, Avicena en la árabe y Paracelso en la centroeuropea fueron auténticos especialistas en la aplicación de las plantas medicinales (Gómez-Caamaño, 1990). Un ejemplo de compuestos de origen vegetal históricamente exitosos fue el primer antipalúdico, con el que se trató a la condesa de Chinchón Virreina del Perú en el siglo XVII, a la planta se le llamó *Cinchona officinalis* y el principio activo fue la quina (Domingo y López Brea, 2003).

En México desde tiempos muy remotos, en la época precolombina, la medicina tradicional ha curado las enfermedades con infusiones, enjuagues, emplastos y lociones hechos con hierbas y productos animales. La medicina tradicional mexicana tiene muchos usos, unos de los más representativos son ayudar a cicatrizar heridas, componer un hueso, ayudar a dar a luz, propiedades analgésicas y curar la depresión. También en esta medicina indígena, las drogas y bebidas con propiedades alucinantes se ingerían para comunicarse con los dioses, adivinar el futuro, eliminar la fatiga y el hambre. Otros productos se aplicaban para repeler insectos o aniquilar las plagas.

Martín de la Cruz (1552) fue el primero que agrupó a las plantas medicinales por su uso medicinal en función de la parte del cuerpo afectada. Por ejemplo, malestar de cabeza, pecho hasta los miembros inferiores. Tres fuentes sobre plantas medicinales

destacan; el trabajo de Fray Bernardino de Sahagún, con su Códice Florentino (1550-1585) e Historia general de las cosas de la Nueva España en el año de 1585, Martín de la Cruz con el Códice Badiano en 1566 y el trabajo de Francisco Hernández con la Historia de las Plantas en la Nueva España. Ximénez en 1615 utilizó el trabajo de Hernández, para realizar un trabajo más sintético y modificado. Personajes como Recho en 1649 y Gómez Ortega en 1700 se basan en el trabajo de Hernández. En la época de la colonia se menciona el Florilegio medicinal de Steinhoffer en 1712, su contenido esta basado la medicina indígena, superstición Europea y ciencia. En el siglo XIX sobresalen los trabajos de Sesse, Mocino y Alfredo Alzate (Luna, 2004).

En México las plantas fueron agrupadas por su filogenia y nombre alfabético utilizando su nombre común por Vicente Cervantes (1789 – 1832), se forman entonces las primeras farmacopeas. El Dr. Fernando Altamirano fundador del Instituto Médico Nacional realizó trabajos importantes de la utilidad e importancia de la medicina tradicional mexicana entre los que destacan; los anuales del Instituto Médico Nacional (1894 – 1912), Datos de la materia médica mexicana (1894 – 1913) y publicaciones sobre plantas medicinales en la revista de la Sociedad de Historia Natural llamada La Naturaleza (1870 – 1910), poco tiempo después el instituto fue clausurado. Otra obra importante es la de Maximino Martínez (1933) en la cual realizó una compilación de la información de las plantas medicinales conocidas desde el siglo XVI.

Después en 1979 aparece la primera obra donde se hace mención de la utilidad básica de las plantas medicinales esto por parte del Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales. Posteriormente, La Unidad de Investigación Biomédica en Medicina Tradicional (IMEPLAM) y la Herbolaria del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con las obras de Aguilar y Camacho (1984 – 1985) dieron auge al uso de plantas medicinales y realizaron estadísticas de las especies vegetales más utilizadas en México para varios padecimientos entre los más importantes los del aparato digestivo y respiratorio, debemos comentar que en el IMSS fue en donde se aplicaron por primera vez medicamentos de origen herbolario, en su forma natural, por citar algunos ejemplos: como antidiarreico las hojas de Guayaba (*Psidium* spp) y como expectorante las flores de Gordolobo (*Gnaphalium* spp) (Luna, 2004).

Algunas de las plantas más importantes por su uso medicinal mencionadas por Aguilera en 1985 y Damián Badillo en el 2007, en aquella época precolombina y que hoy en día se siguen usando se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Algunas plantas importantes en la medicina tradicional mexicana

Especie	Nombre común	Uso en la medicina tradicional mexicana
<i>Ludoviciana mexicana</i>	Estafiate o ajeno blanco	Expectorante, analgésico, infecciones urinarias, antidepresivo, desinflamante.
<i>Tagetes lucida</i>	Pericón	Tos, dolor de cabeza, anticoagulante y eliminación de tumores.
<i>Bursera jorullense</i>	Copal	Dolor de cabeza y dientes.
<i>Heliopsis longipes</i>	Chilcuague	Dolor de dientes.
<i>Satureja macrostema</i>	Nurite	Enfermedades gastrointestinales, favorece los movimientos peristálticos.
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	Parota	Salpullido, bronquitis, resfriado, diarrea.
<i>Prosopis juliflora</i>	Mezquite	Astringente, infecciones de los ojos, tiña y disminución del flujo menstrual.

Se estima que las plantas producen más de 100,000 productos naturales de bajo peso molecular, también conocidos como metabolitos secundarios (Dixon, 2001).

Por otra parte se cree que existen de 250,000 a 500,000 especies de plantas sobre la tierra (Borris, 1996). De las cuales 1,650 especies de plantas han sido usadas por grupos nativos de América como alimento y 2,564 se han usado como drogas (Klink, 1997). En tanto que del total de especies vegetales estimadas, solo el 6 % se conoce su actividad biológica y el 15 % se ha evaluado su fitoquímica (Verpoorte, 2000).

Se han aislado alrededor de 12,000 compuestos procedentes de organismos vegetales y se estima que constituye tan sólo el 10 % de los metabolitos secundarios (Schultes, 1978). Las principales familias de compuestos generados por las plantas son los representados en el cuadro 3.

Cuadro 3. Principales familias de compuestos encontrados en las plantas

Compuestos fenólicos simples				
Tipo	Planta	Compuesto activo	Usos	Referencia
Quinonas	<i>Hypericum perforatum</i>	Hiperacina	Antidepresivo	(Miskovsky, 2002)
Taninos	<i>Eucalyptus globulus</i>	-----	Inhiben crecimiento de hongos y bacterias	(Cruz y col., 2001)
Cumarinas	<i>Chrysanthemum cinariaefolium</i>	Cumarina, esculetina, umbeliferona y escopoletina	Antiinflamatorio, antitrombótico y vasodilatador.	(Yildirim y col., 2000)
Flavonas	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	glicirricina	antiviral	(Fukai y col., 2002)
	<i>Camellia sinensis</i>	catequinas	antibacteriana	(Yildirim y col., 2000)
Alcaloides	<i>Cinchona officinalis</i>	Quinina y quinidina	antimalaricos	(Domingo y López Brea, 2003)

Ha sido bien documentado que muchos compuestos volátiles de plantas poseen un amplio espectro contra hongos (Meepagala y col., 2002; Morales López y col., 2007; Damián Badillo y col., 2008). Por estas observaciones las plantas son una biofuente aparentemente inagotable para la búsqueda de estos compuestos ya que cuentan con un amplio arsenal químico, donde es posible explotar las diferentes propiedades biológicas de compuestos derivados de plantas que potencialmente pueden coadyuvar a la salud y confort humano (Wain, 1977; Tripathi y col., 2004). Como ha sido demostrado para los aceites esenciales de algunas plantas que han inhibido el crecimiento de hongos y afectado el ciclo de vida de algunos insectos plaga, incluso causándoles la muerte (Varma y Dubey, 1999).

I.5. Generalidades de la familia Asteraceae

Una de las familias vegetales más representativas en la medicina tradicional de los pueblos es la familia Asteraceae, comprende más de 1,700 géneros y unas 24,000-30,000 especies distribuidas por todo el mundo, excepto en la Antártida. Se han encontrado ejemplares desde pequeñas hierbas de 1 cm de altura hasta árboles de más

de 30 m. Las características representativas son la estructura reproductiva, el capítulo donde las flores se disponen en forma sécil sobre un receptáculo ensanchado (Katinas y col., 2007).

Teofrasto hace 2,300 años, reconoció a la familia Asteraceae, que después conocida con el nombre de Compositae por Giseke en 1792. El nombre de Asteraceae también es reconocido por el código internacional de nomenclatura botánica (Greuter y col., 2000). Henri Cassini en 1816, hizo estudios importantes de esta familia de 1812 a 1831 se describe su morfología y estableció 19 tribus, tiempo después (Lessing, 1832) redujo a ocho el número de tribus y Candolle a tres. Sin embargo George Bentham (1873) y Joseph Dalton, establecieron 13 tribus que hoy en día se conservan (Katinas y col., 2007).

Otro acontecimiento importante en la historia de la taxonomía de las asteráceas fue la- denominada Nueva Sinanterología pues los especialistas en asteráceas se llaman sinanterólogos por que se basan para clasificar a las plantas en la morfología de las anteras, en donde resaltan los botánicos Harlod Robinson y Robert M. King (King y Robinson, 1970), pero además se basan en microcaracteres (anatómicos, citológicos y químicos) en lugar de los macrocaracteres para la clasificación taxonómica.

Otros hechos importantes en la clasificación y filogenia de las asteráceas fue con los estudios moleculares de ADN de Cansen & Palmer en 1987 (Katinas y col., 2007).

El primer cladograma de la familia fue elaborado en 1987 por el botánico sueco Kare Bremer basándose caracteres morfológicos y más tarde publicó un tratado de la familia (Bremer, 1994). La clasificación de Bremer en 1994, incluye los avances en el conocimiento de la filogenia de la familia.

I.5.1. Tribus, géneros y especies de la familia Asteraceae

El cuadro 4 nos muestra las tribus, géneros y especies distribuidos en los distintos continentes, en donde se observa que el continente americano cuenta con el mayor número de especies de esta familia, después se encuentra Asia y África.

I.5.2. La familia Asteraceae en México

México es un país rico en biodiversidad; su flora se estima que es aproximadamente entre 20,000 – 30,000 especies (Rzedowski, 1978; Toledo, 1988), así ocupa el cuarto lugar a nivel mundial en diversidad florística (Mittermeier, 1988;

Mittermeier y Goettsch, 1992), entre el 52 % y 65 % de especies florísticas son endémicas (Rzedowski, 1978; Ramamoorthy y Lorente, 1987; Rzedowski, 1991). En una revisión taxonómica y florística en varios herbarios, se estima que la Asteraceae es la familia más amplia dentro de la flora mexicana (Cuadro 5).

En México existen 371 géneros de la familia Asteraceae, 67 (18 %) son endémicos, los Estados más ricos florísticamente en el sureste mexicano son Chiapas, Oaxaca y Veracruz. En el oeste son Jalisco y Michoacán (Villaseñor y col., 1997). En este estudio encontraron al género *Ageratina* en 27 Estados y *Chromolaena* en 30 de ellos.

El género *Eupatorium* comprende cerca de 1200 especies (Zhang y col., 2008) distribuidas principalmente en regiones tropicales de América. Ha sido ampliamente usado por sus propiedades medicinales (Guilherme y col., 2002), en 1967 y 1976 King y Robins publicaron 167 trabajos científicos sobre Eupatorieae.

Un número grande de compuestos naturales bioactivos se han identificado en extractos de este género, lo cual promete ser una biofuente para la búsqueda de nuevas drogas (Sharma y col., 1998).

Cuadro 4. Número de géneros nativos de Asteraceae por tribu en los distintos continentes o partes de continentes.

Subfamilias y tribus	América Central y del Sur	América del Norte	África	Europa	Asia	Oceanía
Subfamilia Barnadesioideae						
Barnadesieae	9					
Subfamilia Cichorioideae						
Arctoteae			14		2	1
Cardueae	2	3	35	38	77	3
Lactuceae	10	26	32	47	59	7
Liabeae	14					
Mutisieae	59	8	3		9	1
Vernonieae	66	2	27		12	1
Subfamilia Asteroideae						
Anthemideae	4	10	69	32	52	3
Astereae	39	69	32	9	32	30
Calenduleae			9	1	2	
Eupatorieae	128	53	3	1	3	2
Gnaphalieae	21	10	66	9	19	84
Helenieae	28	99	4	1	10	4
Heliantheae	128	100	17		7	16
Inuleae	8	3	22	4	22	2
Plucheeae			16		9	8
Senecioneae	40	24	37	10	29	12

Tomado de (Katinas y col., 2007).

Cuadro 5. Las diez familias más diversas de Magnoliophyta en México

Familia	Género	Especies*
Asteraceae	402	3084
Poaceae	207	1317
Fabaceae s. I.	164	2028
Orchidaceae	156	1062
Cactaceae	76	836
Euphorbiaceae	56	816
Rubiaceae	94	639
Lamiaceae	42	530
Solanaceae	34	458
Cyperaceae	22	438

Tomado de (Villaseñor y col., 1997) * Incluye miembros no nativos

I.6. Características del género *Eupatorium*

El género *Eupatorium* pertenece a la tribu Eupatoriae, una de las trece tribus de la familia Asteraceae, y comprende casi 1200 especies distribuidas principalmente en regiones tropicales de América, Europa, África, y Asia (Zhang y col., 2008).

Eupatorium spp son hierbas generalmente perennes, arbustos o arbolitos bajos, con hojas opuestas o en ocasiones alternas; capítulos homógamos, generalmente pequeños, dispuestos en inflorescencias corimbiformes o paniculiformes, rara vez solitarios; involucreo cilíndrico, turbinado, campanulado o hemisférico, sus brácteas en número variable, dispuestas en dos o más series, imbricadas, de longitud similar y entonces a menudo con cálculo, otras veces desiguales y graduadas; receptáculo plano, convexo o cónico, desnudo; flores pocas o numerosas, todas hermafroditas, blancas, rosadas, moradas o azulosas; corola tubulosa, tubo corto, limbo brevemente pentalobulado o pentadentado, anteras con la base obtusa y el apéndice del conectivo reducido o bien desarrollado; ramas del estilo largas y sobresalientes, lineares o claviformes, a veces coloreadas, su ápice obtuso, sin pelos y cubierto de numerosas papilas cortas; aquenios prismáticos de ápice truncado, con cuatro a seis costillas bien definidas, glabros o pilosos, vilano de pocas o numerosas cerdas capilares persistentes y libres de la base (Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

I.6.1. Fitoquímica del género *Eupatorium*

Los constituyentes químicos reportados en el género *Eupatorium* son bastantes sin embargo, Zhang y col. (2008) reportan 149, incluyen monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonoides, alcaloides del tipo pyrrolizidina, aceites esenciales y algunos de ellos se describen en el cuadro 6.

I.6.2. Usos en medicina tradicional del género *Eupatorium*

Especies de plantas del género *Eupatorium* (Asteraceae) han sido usadas por muchas décadas como agentes antimaláricos (Lang y col., 2002), antibacterianos (Caceres y col., 1995), antifúngicos (Navarro y col., 2003), anti-inflamatorios (Habtemariam, 2001), hepatoprotectores (Lexa y col., 1989) e inmunoestimulantes (Fernández y col., 2002).

Sin embargo desde el punto de vista químico y biológico el género *Eupatorium* ha sido poco estudiado, a pesar de ello, se han aislado compuestos con actividad biológica. De *E. aschenbornianum* se han aislado dos nuevos benzofuranos que son

activos contra *Trycophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Rios y col., 2003); el aceite esencial de *E. laciniatum* en donde su componente mayoritario es Metiltimol (23%), presentó actividad moderada contra *T. mentagrophytes* (Inouye y col., 2006); de *E. brevipes* se aisló una sustancia conocida como brevipenina, la cual presenta actividad mulsquicida, espermatocida, antitumoral, antimicrobiana y sobre la germinación de semillas (Guerrero y col., 1988).

El aceite esencial de *E. cannabinum* protege al fruto de mango del ataque de los hongos fitopatógenos, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botryodiplodia theobromae*, inhibiendo el crecimiento de estos hongos hasta un 100% (Dubey y col., 2007).

El extracto metabólico de *E. capillifolium* contiene flavonoides y sesquiterpenoides los cuales son los responsables de la actividad citotóxica, esto cuando fueron probados contra la línea celular Hela (Huo y col., 2006; Sadhu y col., 2006).

El timol y carvacrol aislados de *Ageratina ibaguensis* son las sustancias responsables de la actividad antimicrobiana (Sanabria-Galindo y col., 1999).

E. arnottianum conocida como “clavel” o “uoué” es un subarbusto usado en medicina tradicional Argentina contra dolor de estómago, antiinflamatorio. Los extractos acuosos- y cloruro metilénicos presentan propiedades analgésicas (Clavín y col., 2000) y propiedades inmunomodulantes (Fernández y col., 2002). Cimenol, α -pineno, timol acetato y β -cariofileno han sido identificados como los principales componentes del aceite esencial (Zigadlo y col., 1995). Actividades antimicrobianas, antivirales y antinociceptivas (contra el dolor) han sido bien reportadas en diferentes extractos de esta planta (Clavín y col., 2002).

E. buniifolium es usado contra problemas reumáticos (Rios y col., 1993) y como desinfectante (Rojas-Acosta, 1905); especies comúnmente conocidas como “romerillo”, “romerillo colorado” o “chilca” muestran la presencia de flavonoides y derivados del ácido hidroxicinámico (Muschiatti y col., 1990), actividades antioxidantes (Paya y col., 1996) y antivirales (García y col., 1990), se han identificado al menos tres compuestos con actividad antiinflamatoria (Muschiatti y col., 2001), es considerada una planta medicinal en la región central y noreste de Argentina. Las partes aéreas son usadas como colorante, propiedades hepatoprotectoras y desinfectantes. Los extractos de *E. buniifolium* han sido bien reportados que presentan actividad antiviral (García y col., 1990) (Cuadro 7).

Cuadro 6. Algunos compuestos aislados de especies del género *Eupatorium*.

Clase y nombre del compuesto	Fuente	Referencia
Monoterpenos		
8,9-Dihidroxitimol	<i>E. fortunei</i>	Tori y col., 2001
10-Acetoxi-8,9-dihidroxi-3- <i>O</i> -isobutiriltimol.	<i>E. glechonophyllum</i>	Monache y col., 1984
9-Acetoxi-3- <i>O</i> -angeloil-8,10-epoxitimol	<i>E. kiirunense</i>	Shen y col., 2005
Guaianos (sesquiterpenos)		
8 β -(Angeloxi)-3 β ,4 β ,14-trihidroxi-5 α H,6 β H,7 α H-guaia 1(10),11(13)-dien-12,6-olido (Eupachinilide A)	<i>E. chinense</i>	Zhang y col., 2008
3-Diacetileupalinina A	<i>E. lindleyanum</i>	Zhang y col., 2008
3 β -Hidroxi-8 β -(tigloiloxi)-1 α ,10 α -epoxi-6 β H,7 α H- helianga-4,11(13)-dien-12,6-olida (Heliangine)	<i>E. kiirunense</i>	Shen y col., 2005
Germacrenos (sesquiterpenos)		
1 β -Hidroxi-8 β -(tigloiloxi)-2 β ,3:4 β ,5-diepoxi-6 β H,7 α H- germacra-10(14).11(13)-dien-12,6-olido (Eupakirusina A)	<i>E. kiirunense</i>	Shen y col., 2005
2 β -Acetoxiepitulipinolida	<i>E. glehni</i>	Motoo y col., 2002
Cadinanos (Sesquiterpenos)		
3 β -Acetoxi-6 β H,8 β H,10 β H-cadina-4,7(11)-dien-12,8- olida (Eupatoranolida)	<i>E. adenophorum</i>	Wang y col., 2006
Diterpenos		
Ácido-15-hidroxi-ent-labda-8(20)-en-18-oico	<i>E. bunifolium</i>	Carreras y col., 1998
Triterpenos		
3-Acetoxidammara-20,24-dieno	<i>E. glutinosum</i>	El-Seedi y col., 2002
Flavonoides		
Quercetagetin - <i>O</i> -(6''-acetil- β -D-glucopiranosido)	<i>E. glandulosum</i>	Zhang y col., 2008
Quercetina	<i>E. lindleyanum</i>	Zhang y col., 2008
Alcaloides del tipo pirrolizidina		
Supinina	<i>E. fortunei</i>	Liu y col., 1992
Rinderina	<i>E. clematideum</i>	Zhang y col., 2008
Neotusilagina	<i>E. semialatum</i>	Zhang y col., 2008
Modificado de Zhang y col., 2008		

Cuadro 7. Usos en medicina tradicional, nombre común, órganos utilizados y lugar de algunas especies del género *Eupatorium*

Algunas especies del género <i>Eupatorium</i>	Nombre común	Uso en medicina tradicional	Parte usada	Lugar	Referencia
<i>E. buniifolium</i>	Romerillo romerito	Antiprotozorario, desinfectante y para tratar desordenes del Sistema Nervioso Central, digestivo, tratamiento del hígado	Partes aéreas	Argentina	Chiari y col., 1996
<i>E. candolleianum</i>	Tabaco del monte	Laxante	Partes aéreas	Argentina	Zardini, 1984; Rondina y col., 2003
<i>E. lindleyanum</i>	-----	Antihistamínico y antibacterial	-----	China	Editorial Committee of the Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine (1998)
<i>E. capillifolium</i>	Dogfennel	Aplicado externamente en picaduras de insectos y reptiles	-----	Asia	Usher, 1974
<i>E. inulaefolium</i>	Sanalotodo	Lavar enconos y heridas	-----	Colombia	Ferraro y col., 1977
<i>E. glandulosum</i>	-----	Desinfectar heridas y para desparasitar	Hojas	India	Sasikumar y col., 2005
<i>E. ayapana</i>	-----	Estimulante cardiaco, laxante y anticoagulante	Hojas	India	Gupta y col., 2002
<i>E. glutinosum</i>	Matico Serrano	Astringente, antirreumático, antimicrobiano, para tratar la ulcera, diarrea y dolor de cabeza	Hojas y tallos	Ecuador y Perú	Solis, 1992
<i>E. arnottianum</i>	Clavel o uoué	Dolores gástricos, antimicrobiana, antiviral y anticonceptiva	Hojas	Argentina	Clavin y col., 2000
<i>E. hecatanthum</i>	Uoué	Analgésico, antitusivo y antiespasmódico	Partes aéreas	Argentina	Filipov, 1994
<i>E. salvia</i>	Salvia macho, pagajosa, pega-pega	Antiséptico y tratamiento de piquetes de insectos	Planta completa	Chile	Zin y Weiss, 1980
<i>E. aschenbornianum</i>	Axihuitl	Problemas de piel, tumores, heridas y aftas	-----	México	Argueta y col., 1994; Avilés y Suárez, 1994; Fuentes y Avilés, 1997; Monroy y Castillo, 2000

II. Justificación

Una de las consecuencias importantes de los plaguicidas de uso comercial, es que son los responsables directos de inducir cepas de organismos resistentes a este tipo de compuestos químicos y aunado con la habilidad de los organismos de mutar para hacerse resistentes, es entonces sumamente importante continuar la búsqueda de nuevos compuestos contra estos organismos. Es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de origen natural para controlar bacterias, insectos, hongos y oomicetos. Las plantas son una buena alternativa para la búsqueda de nuevos principios activos ya que cuentan con un amplio espectro de metabolitos secundarios, debido a que son organismos que carecen de movimiento y están expuestos a una gran variedad de organismos, por tal motivo desarrollan un arsenal químico como defensa. Entonces es posible aislar a partir de las plantas compuesto que inhiban una gran variedad de organismos que afectan cultivos vegetales de importancia económica, así como también aquellos organismos patógenos para el ser humano.

México es uno de los países considerado como uno de los más ricos florísticamente, ya que cuenta con más de 30,000 especies vegetales, los estados con mayor biodiversidad vegetal son Chiapas, Jalisco, Michoacán, Oaxaca y Veracruz.

Michoacán cuenta con cerca de cinco mil especies vegetales, dentro de las cuales abundan gran variedad de especies de un género importante de la familia Asteraceae son los siguientes: *Eupatorium arsenei* (*Ageratina arsenei* (Rob.) King & Rob.), *Eupatorium pulchellum* H. B. K. (*Chromolaena pulchella* (H.B.K.) King & Rob.) y *Eupatorium cardiophyllum* B.L. Rob. (*Ageratina cardiophylla* (B. L. Rob.) King & H. Rob.), esto por su utilidad en medicina tradicional.

El género *Eupatorium* es uno de los más abundantes de la familia Asteraceae, esta presente en regiones tropicales de América, muchas especies de este género tienen un uso en la medicina tradicional en diferentes partes del mundo, del cual se han aislado metabolitos con actividades farmacológicas interesantes, que motivan la búsqueda de sustancias bioactivas con efecto microbicida.

III. Hipótesis

Los extractos de *E. arsenei*, *E. pulchellum* y *E. cardiophyllum* contienen compuestos que inhiben el crecimiento microbiano.

IV. Objetivos

IV.1. Objetivo general

Determinar la actividad microbicida de los extractos de *E. arsenei*, *E. pulchellum* y *E. cardiophyllum*.

IV.2. Objetivos particulares

1. Seleccionar la planta con mejor efecto microbicida.
2. Seleccionar el extracto más activo de la planta con mejor efecto microbicida.
3. Purificar el componente mayoritario del extracto seleccionado.
4. Determinar la variación natural del compuesto microbicida.

V. Material y Métodos

V.1. Organismos utilizados

V.1.1. Bacterias

Las bacterias utilizadas fueron trece aislados clínicos, nueve bacterias Gram negativas y cuatro Gram positivas todas ellas obtenidas del Hospital Civil “Dr. Miguel Silva” de la ciudad de Morelia, Mich, Méx. fueron las siguientes, Gram negativas: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp*, y *Shigella sonnei*, Gram positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*, caracterizados bioquímicamente.

Así como también una cepa de *Lactobacillus casei* variedad *rhamnosus*, la cual fue recuperada de un producto comercial “Liolactil” (obtenido de IVAX®) esta cepa fue útil para la selección del extracto que no afecte el crecimiento de éste microorganismo.

V.1.2. Hongos

Levaduras. Las levaduras utilizadas fueron *Candida albicans* y *Saccharomyces boulardii*, la primera es un aislado clínico la cual fue obtenida del Hospital Civil “Dr. Miguel Silva” de esta ciudad, mientras que *Saccharomyces boulardii* fue recuperada de un producto comercial “Floratil” (obtenido de MERCK®).

Filamentosos. Los hongos filamentosos utilizados fueron *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*, todos aislados silvestres obtenidos de frutos y plantas de aguacate infectadas.

V.1.3. Oomicetos

Los oomicetos utilizados fueron *Phytophthora cactorum*, *P. capsici* y *P. cinnamomi*, aislados de plantas infectadas de fresa, chile y aguacate.

V.2. Material vegetal

V.2.1. Plantas

Eupatorium arsenei (*Ageratina arsenei* (Rob.) King & Rob.), *Eupatorium pulchellum* H. B. K. (*Chromolaena pulchella* (H.B.K.) King & Rob.) y *Eupatorium cardiophyllum* B.L. Rob. (*Ageratina cardiophylla* (B. L. Rob.) King & H. Rob.) fueron identificadas toxonómicamente por el D.C. J. Rzedowski, conservando un ejemplar de cada especie vegetal en el herbario del Instituto de Ecología de Pátzcuaro y uno más en el herbario del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

V.2.2. Colecta de las plantas

La planta *E. arsenei* fue colectada el 27 de octubre del 2005 en el kilómetro 25 de la carretera Morelia-México, vía Mil Cumbres, a una altitud de 2076 msnm y una latitud de N 19° 39.938', W 101° 00.300'. *E. pulchellum* fue colectada en el kilómetro 61 de la carretera Morelia-Zacapu, a una altitud de 2069 msnm y una latitud N 19° 49.380', W 101° 39.518' y *E. cardiophyllum* fue colectada el 22 de febrero del 2006 en el kilómetro 53 de la carretera Morelia-Zacapu, a una altitud de 2266 msnm, latitud N 19° 42.821' y W 101° 36.711', El segundo lote colectado el día 06 de febrero del 2008, en el kilómetro 51 de la carretera Morelia-Zacapu, a una altitud de 2247 msnm, latitud N 19° 42.216' y W 101° 35.962'.

Una vez colectadas las plantas se separaron sus órganos hoja, flor, tallo y raíz, después fueron secadas a la sombra durante 10 días. Los extractos de las partes aéreas de *E. arsenei*, *E. pulchellum* y *E. cardiophyllum* fueron obtenidos por maceraciones sucesivas a temperatura ambiente hasta agotar componentes, mientras que los extractos de raíz se obtuvieron mediante reflujos sucesivos.

V.2.3. Obtención de los extractos de las partes aéreas de *E. arsenei*, *E. cardiophyllum* y *E. pulchellum*

Para la obtención de los extractos de las partes aéreas de *E. arsenei*, se pesaron 285 g de flor y 105 g de hoja, de *E. pulchellum* 355 g de flor, 120 g de hoja y 260 g de tallo, para la obtención de los extractos de *E. cardiophyllum* se pesaron 240 g de flor, 110 g de hojas y 115 g de tallos.

Cada una de las partes de la planta se colocó en recipientes de vidrio por separado y se sometió al siguiente procedimiento de extracción: Se les adicionó hexano, se dejaron macerar por tres días a temperatura ambiente protegidos de la luz, después se filtraron y concentraron en un rotavapor a 55 °C. El proceso anterior se realizó tres veces con la finalidad de agotar componentes no polares, entonces se dejó evaporar el hexano y al resto vegetal se adicionó cloruro de metileno, se dejaron macerar por tres días a temperatura ambiente y protegidos de la luz, después se filtraron y concentraron en un rotavapor a 35 °C, este proceso se hizo tres veces hasta agotar componentes de polaridad intermedia, una vez obtenidos los extractos cloruro metilénicos, se dejó evaporar el disolvente sobrante y entonces al resto vegetal se adicionó metanol, se maceraron nuevamente por tres días a temperatura ambiente y después se filtraron y concentraron en un rotavapor a 65 °C, este procediendo se hizo tres veces para agotar componentes polares, de esta manera obtuvimos los extractos polares (cuadro 8).

V.2.4. Obtención de los extractos de raíz

La cantidad de raíz utilizada para la obtención de los extractos de cada una de las especies vegetales fue la siguiente, 1065 g de raíz de *E. arsenei*, 605 g de raíz de *E. pulchellum* y 440 g de raíz *E. cardiophyllum*.

Cada una de las raíces de *Eupatorium* spp fueron molidas, en un molino de cuchillas, hasta la obtención de un polvo, las muestras se colocaron en matraces balón de 5,000 ml y se adicionó el primer disolvente que fue hexano suficiente para cubrir el polvo de raíz. Se hizo un reflujo durante 4 h, después se dejó enfriar para posteriormente filtrar y concentrar en un rotavapor a 55 °C, este procedimiento se realizó tres veces hasta agotar componentes, después el matraz se dejó destapado toda una noche para evaporar el disolvente de la muestra, se adicionó cloruro del metileno un volumen suficiente para cubrir la muestra, se hizo un reflujo por cuatro horas, se dejó enfriar, para después filtrar y concentrar en rotavapor a 35 °C, este procedimiento se

hizo, tres veces hasta agotar componentes, los extractos metanólicos de raíz se hicieron de la misma manera, este procedimiento se realizó para cada una de las especies.

Una vez obtenidos los extractos hexánicos, cloruro metilénicos y metanólicos de cada una de las especies, fueron llevados hasta peso constante y con ello asegurar que el disolvente se había evaporado, una vez en peso constante los extractos fueron empacados y almacenados en refrigeración a 4 °C hasta su uso. La descripción de los extractos de *Eupatorium* spp esta en el cuadro 8.

V.3. Ensayos biológicos

V.3.1. Preparación de medios de cultivo

Se utilizó agar Mueller Hinton (MH) de la casa comercial BIOXON, en cajas de Petri de 100 X 55 mm, se adicionaron 25 ml de agar MH por placa, como lo indica el manual de procedimientos de la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005), una vez vertido el agar se dejó solidificar, se rotularon las placas y se les realizó la prueba de esterilidad, incubándolas 16 h a 37 °C.

V.3.2. Preparación de las cepas bacterianas

Cada una de las cepas bacterianas fue resembrada en placas de agar MH y utilizadas entre 16 y 20 h de crecimiento con la finalidad de trabajar con células jóvenes como lo marca el manual de procedimientos para la manipulación de microorganismos del CLSI 2005.

V.3.3. Estandarización del inóculo bacteriano

De un cultivo bacteriano joven en medio sólido MH, se tomó una colonia aislada y se inoculó en caldo MH, se incubó a 37 °C y cada hora se determinó la turbidez a 600 nm en el espectrofotómetro hasta lograr una turbidez de 0.5, de cada una de las trece cepas.

V.3.4. Preparación de los extractos y de las sustancias control

Cada uno de los 36 extractos se disolvieron en etanol al 96 % (1 g/ 1 ml), control positivo cefotaxima y control negativo etanol al 96 %. De cada uno se agregó un volumen de 6 µl teniendo las siguientes concentraciones: extracto (1 mg/µl), cefotaxima (0.125 mg/µl) y etanol (0.8 mg/µl).

V.3.5. Método de difusión en agar para bacterias y levaduras

Una vez crecidas las bacterias en caldo MH y con la turbidez de 0.5, se inocularon en cajas de agar MH con ayuda de un hisopo estéril, después se colocaron seis discos de papel filtro estériles por placa, en cuatro de ellos los extractos de las partes de la planta (1 mg/ μ l), un control positivo cefotaxima (0.125 mg/ μ l) y control negativo etanol (0.8 mg/ μ l). Se incubaron a 37 °C/18 h y se reportó en halo de inhibición (Fig. 4).

Las levaduras utilizadas *C. albicans* y *S. boulardii* fueron resembradas en Agar Dextrosa Sabouraud de la casa comercial BIOXON e incubadas a 37 °C durante 24 horas, con la finalidad de obtener cultivos jóvenes. En el caso particular de *S. boulardii*, fue recuperada de un producto liofilizado “Floratil” pediátrico y se partió de 200 mg de polvo.

Cuadro 8. Rendimiento (%) y propiedades organolépticas de los extractos de *E. arsenei*, *E. pulchellum* y *E. cardiophyllum*. 1 = Hexano, 2 = Cloruro de metileno, 3 = Metanol

Especie vegetal	Extracto	Rendimiento (%)	Propiedades organolépticas	
			Color	Olor
<i>E. arsenei</i>	Hoja 1	3.8	Café oscuro	Menta-alcanfor
	Hoja 2	ND	Verde oscuro	Desagradable
	Hoja 3	ND	Verde oscuro	Menta-alcanfor
	Flor 1	ND	Amarillo claro	Menta-alcanfor
	Flor 2	ND	Verde oscuro	Desagradable
	Flor 3	ND	Verde oscuro	Desagradable
	Tallo 1	NE	NE	Menta-alcanfor
	Tallo 2	NE	NE	Desagradable
	Tallo 3	NE	NE	Menta-alcanfor
	Raíz 1	1.04	Amarillo canario	Aromático
	Raíz 2	ND	Café oscuro	Menta-alcanfor
	Raíz 3	ND	Café oscuro	Menta-alcanfor
<i>E. pulchellum</i>	Hoja 1	11.6	Café oscuro	Menta-alcanfor
	Hoja 2	ND	Verde oscuro	Desagradable
	Hoja 3	ND	Verde oscuro	Menta-alcanfor
	Flor 1	6.36	Café claro	Menta-alcanfor
	Flor 2	ND	Verde oscuro	Aromático
	Flor 3	ND	Verde oscuro	Menta-alcanfor
	Tallo 1	ND	ND	Aromático
	Tallo 2	ND	ND	Menta-alcanfor
	Tallo 3	ND	ND	Menta-alcanfor
	Raíz 1	0.16	Café oscuro	Aromático
	Raíz 2	ND	Café claro	Desagradable
	Raíz 3	ND	ND	Menta-alcanfor
<i>E. cardiophyllum</i>	Hoja 1	4.36	Verde oscuro	Aromático
	Hoja 2	6.8	Verde oscuro	Desagradable
	Hoja 3	15.06	Verde oscuro	Aromático
	Flor 1	10.25	Amarillo oscuro	Aromático
	Flor 2	2.66	Verde oscuro	Desagradable
	Flor 3	16.92	Verde oscuro	Menta-alcanfor
	Tallo 1	3.38	Naranja claro	Aromático
	Tallo 2	2.84	Amarillo oscuro	Menta-alcanfor
	Tallo 3	3.31	Amarillo oscuro	Menta-alcanfor
	Raíz 1	1.28	Rosa mexicano	Dulce
	Raíz 2	1.78	Amarillo ámbar	Menta-alcanfor
	Raíz 3	6.31	Amarillo ámbar	Menta-alcanfor

ND = No se determinó, NE = No se elaboró.

El procediendo de obtención fue el siguiente: un poco del liofilizado de *S. boulardii* fue adicionado a un microtubo de 1.5 ml y se adicionaron aproximadamente 1 ml de agua tridestilada estéril, se homogenizó con la ayuda de un vortex y se sembró por estría en placas de agar dextrosa Sabouraud, se incubó 24 h en una atmósfera de CO₂.

Una vez obtenidos los cultivos jóvenes, se inocularon colonias aisladas de cada una de las levaduras a caldo papa dextrosa y se incubaron a 37° C, hasta lograr una turbidez de 0.5, logrado con la ayuda de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

Una vez obtenida la turbidez de 0.5, se inocularon en placas de agar Mueller Hinton con la ayuda de un hisopo estéril, después se colocaron seis discos en cada placa en cuatro de ellos 6 µl los extractos de cada una de las partes de la planta (1 mg/µl), el control positivo utilizado fue fluconazol (0.002 mg/µl), se adicionó un volumen de 12 µl y un control negativo etanol (0.8 mg/µl). Posteriormente se incubaron a 37 °C durante 24 h y el crecimiento fue monitoreado a las 24, 48 y 72 h. (Fig. 4).

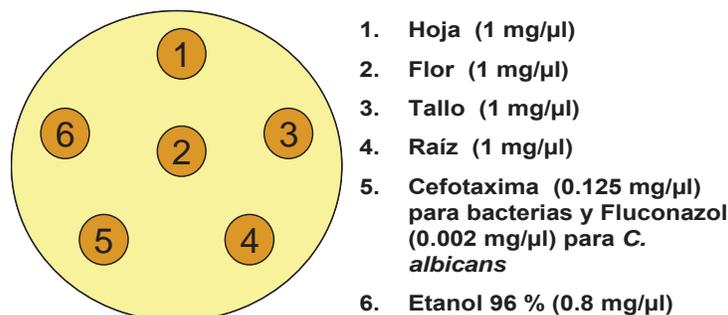


Figura 4. Esquema del método de difusión en agar para determinar el posible efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano y levaduriforme.

V.3.6. Método de difusión en agar para hongos filamentosos y oomicetos

Los hongos filamentosos utilizados fueron *C. acutatum*, *F. oxysporum* y *R. solani* y los oomicetos *P. cactorum*, *P. capsici* y *P. cinnamomi* fueron resembrados en placas de agar papa dextrosa, se crecieron por siete días a temperatura ambiente y protegidos de la luz.

Las placas con los patógenos fueron cuadrículadas con ayuda de un bisturí estéril en cubos de 5 mm³, después en placas de agar papa dextrosa se colocaron seis discos de papel filtro por placa, en cuatro de ellos se colocaron los extractos de cada una de las partes de la planta (1 mg/µl), un control positivo que fue tiabendazol [2-(tiazol-4-

il benzimidazol] (0.001 mg/μl), para el caso de los hongos filamentosos. Mientras que para los oomicetos se utilizó el ácido-(R)-2{(2,6-dimetilfenil)-metoxiacetilamino}metil éster propiónico (Mefenoxam 0.001 mg/μl) y un control negativo que fue el etanol al 96 % (0.8 mg/μl), de todos ellos se agregaron un volumen de 6 μl a cada disco. Se incubaron a temperatura ambiente, protegidos de la luz y se determinó el índice de crecimiento (IC) al segundo, tercer y cuarto día (Fig. 5).

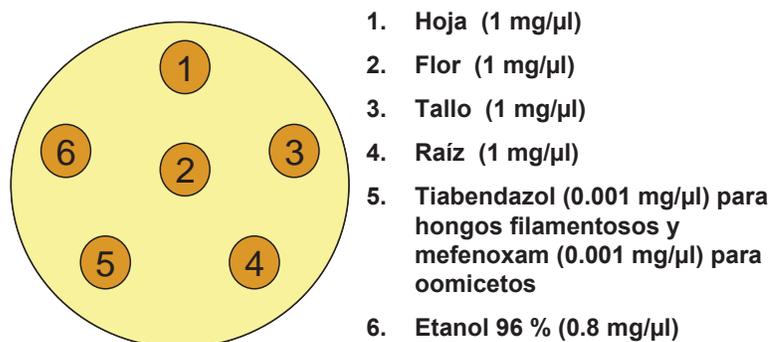


Figura 5. Esquema del método de difusión en agar para determinar el posible efecto inhibitorio del crecimiento de hongos filamentosos y oomicetos.

V.4. Método de purificación de componentes mayoritarios

V.4.1. Desengrasado de extractos

El extracto hexánico total de flor fue desengrasado con metanol, al adicionar un volumen suficiente para cubrir el extracto para precipitar las grasas, las cuales fueron eliminadas al filtrar con papel filtro el extracto, el filtrado se concentró en un rotavapor, para eliminar el metanol, después el extracto fue monitoreado hasta que presentó peso constante, lo cual nos asegura que el metanol restante se halla evaporado.

V.4.2. Cromatografía en columna

La columna de vidrio se lavó con cloruro de metileno, se adicionaron 20 g gel de sílice (70X230 MERCK) previamente humedecidos con hexano para eliminar el aire, entonces se adicionó el gel de sílice a la columna de vidrio y quedó una columna de 2 x 22 cm de longitud. En seguida se adicionó 1 g de extracto desengrasado disuelto en la mínima cantidad de hexano, se colocó un algodón con la finalidad de que las mezclas de disolventes utilizadas no lleguen directamente a la muestra y el corrimiento sea homogéneo. Como fase móvil fueron usadas mezclas de hexano y acetato de etilo en

polaridad ascendente como se muestra en el cuadro 9. Se colectaron 180 fracciones de diez mililitros cada una y cada cinco fracciones se analizaron mediante resonancia magnética nuclear (RMN), con la finalidad de conocer los compuestos presentes en el fraccionamiento.

Cuadro 9. Mezclas de disolventes utilizados en la cromatografía en columna.

Polaridad		Volumen (ml)
Hexano	Acetato de etilo	
100	0	100
95	5	200
90	10	200
85	15	200
80	20	200
75	25	200
70	30	100
65	35	100
60	40	100
55	45	100
50	50	50
40	60	50
30	70	50
20	80	50
10	90	50
0	100	50

V.4.3. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C fueron obtenidos en un equipo Varian Mercury plus 400, los espectros de Hidrógeno (^1H) se obtuvieron a 400 MHz en ocho repeticiones, la ventana espectral fue de 6,000 Hz, el disolvente utilizado fue cloroformo deuterado (CDCl_3) y el disolvente de referencia interna fue tetrametilsilano (TMS), los espectros de Carbono (^{13}C) se obtuvieron a 100 MHz en 2,000 repeticiones, la ventana espectral fue de 25,000 Hz, el disolvente utilizado fue cloroformo deuterado (CDCl_3) y el disolvente de referencia interna fue cloroformo deuterado, todos obtenidos a temperatura ambiente.

V.4.4. Espectroscopía de masas acoplado a cromatografía de gases

Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrómetro de masas Hewlett Packard modelo 5989B, utilizando un detector de iones (multiplicador de electrones), una temperatura de la fuente de iones de 200 °C, un filtro de masas a una temperatura de 100 °C, energía de ionización de 70 eV.

El equipo utilizado para obtener los cromatogramas de gases fue un cromatógrafo de gases de la marca Hewlett Packard modelo 5890 Serie II plus. El método utilizado fue MSA, con una temperatura inicial del horno cromatográfico de 50 °C durante cinco minutos, después cada minuto subió 20 °C hasta llegar a 200 °C, en esta temperatura permaneció cinco minutos, posteriormente y de igual manera cada minuto se incrementó la temperatura por 20 °C, hasta llegar a 250 °C y ahí permaneció durante 10 minutos, el tiempo total de corrida fue de 30 minutos. La temperatura del inyector y de la interfase fue de 240 °C y 260 °C, respectivamente.

Se utilizó como fase móvil (gas de arrastre) Helio y una columna no polar Hp-5 MS, como la fase estacionaria fue el (5-fenil) metilpolisiloxano, con 30 m de longitud, diámetro interno de 0.25 mm y la capa de la fase estacionaria de 0.25 µm y el banco de datos para la comparación de las señales espectrales fue NIST.

V.5. Análisis de resultados

Todos los experimentos se hicieron tres veces de forma independiente, por triplicado cada uno de ellos. El programa Statistic 7.0, fue usado para calcular la significancia de los datos experimentales con la prueba de Tukey $\alpha = 0.05$. El efecto de los extractos sobre el crecimiento de bacterias y hongos levaduriformes se determinó con la medición (mm) de los halos incluyendo el disco, mientras que para hongos filamentosos y oomicetos se determinó el Índice de Crecimiento (IC) de la siguiente manera:

$$IC = Ct / Cc$$

En donde:

Ct = Crecimiento del hongo filamentosos u oomiceto con extracto.

Cc = Crecimiento del hongo filamentosos u oomiceto con etanol.

VI. RESULTADOS

VI.1. Selección de la planta con el mejor efecto microbicida

Se seleccionaron tres plantas de la región, considerando los antecedentes fitoquímicos, uso medicinal y similitud de uso con otras especies vegetales ya descritas con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioomicéticas, además de fácil acceso en la región, para hacer un búsqueda de posibles metabolitos microbicidas, con los criterios mencionados se seleccionaron *E. arsenei*, *E. pulchellum* y *E. cardiophyllum*.

De estas plantas se obtuvieron doce extractos a los que se les determinó su posible capacidad inhibitoria del crecimiento microbiano. En el escrutinio se usaron las bacterias *K. pneumoniae* (gran negativa) y *B. subtilis* (gran positiva), los hongos *C. albicans* (dimórfico) y *R. solani* (monomórfico micelial) y el oomiceto *P. capsici*.

Se observó que los extractos de *E. cardiophyllum* son los mejores para inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y oomicetos, ya que presentaron un efecto bactericida sobre *K. pneumoniae* y *B. subtilis*, fungicida contra *C. albicans* y *R. solani*, así como oomiceticida frente a *P. capsici*. En segundo lugar de importancia se encuentra *E. arsenei*, sus extractos presentaron un efecto bactericida sobre el crecimiento de *K. pneumoniae* y *B. subtilis*, pero no inhiben el crecimiento de los hongos, *C. albicans* y *R. solani*.

Los extractos de *E. pulchellum* son los menos efectivos, ya que únicamente presentan un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de *K. pneumoniae* y *B. subtilis*, no inhibieron el crecimiento de los hongos, pero son interesantes debido a que inhiben el crecimiento de *P. capsici* (Cuadro 10).



Figura 6. Especies vegetales utilizadas para el escrutinio microbiciada. **A)** *E. arsenei*, **B)** *E. cardiophyllum* y **C)** *E. pulchellum*.

Cuadro 10. Efecto microbicida de los extractos de *E. arsenei*, *E. pulchellum* y *E. cardiophyllum*.

	Bacterias		Hongos		Oomiceto
	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. albicans</i>	<i>R. solani</i>	<i>P. capsici</i>
<i>E. arsenei</i>	bc	bc	neg	neg	oc
<i>E. cardiophyllum</i>	bc	bc	fc	fc	oc
<i>E. pulchellum</i>	bt	bt	neg	neg	oc

bc = bactericida, bt = bacteriostático, fc = fungicida, oc = oomicetida y neg = no se observó inhibición del crecimiento.

VI.2. Efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento bacteriano

VI.2.1. Efecto bacteriostático de los extractos cloruro metilénicos

El extracto cloruro metilénico de hoja presenta un efecto bacteriostático sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* observándose un halo de inhibición de 16 mm (Fig. 7), mientras que el extracto de flor es activo contra *S. epidermidis* mostrando un halo de 12 mm y *P. aeruginosa* con un halo de inhibición de 14 mm, mientras que los extractos de tallo y raíz son activos sobre el crecimiento de *B. subtilis* y *P. aeruginosa*, observándose un halo de inhibición de 14 y 12 mm respectivamente para el extracto de tallo y 17 y 22 mm para el caso del extracto de raíz, respectivamente (Fig. 7).

VI.2.2. Efecto bacteriostático de los extractos metanólicos de *E. cardiophyllum*

Los extractos metanólicos de hoja, flor y raíz presentan actividad bacteriostática contra *P. aeruginosa* observándose un halo de inhibición de 25 mm, 23 mm y 21 mm, respectivamente, mientras que el extracto metanólico de tallo presenta actividad bacteriostática contra *B. subtilis* y *P. aeruginosa* siendo más sensible *P. aeruginosa* con un halo de inhibición 26 mm y un halo de inhibición de 12 mm para *B. subtilis* (Fig. 8).

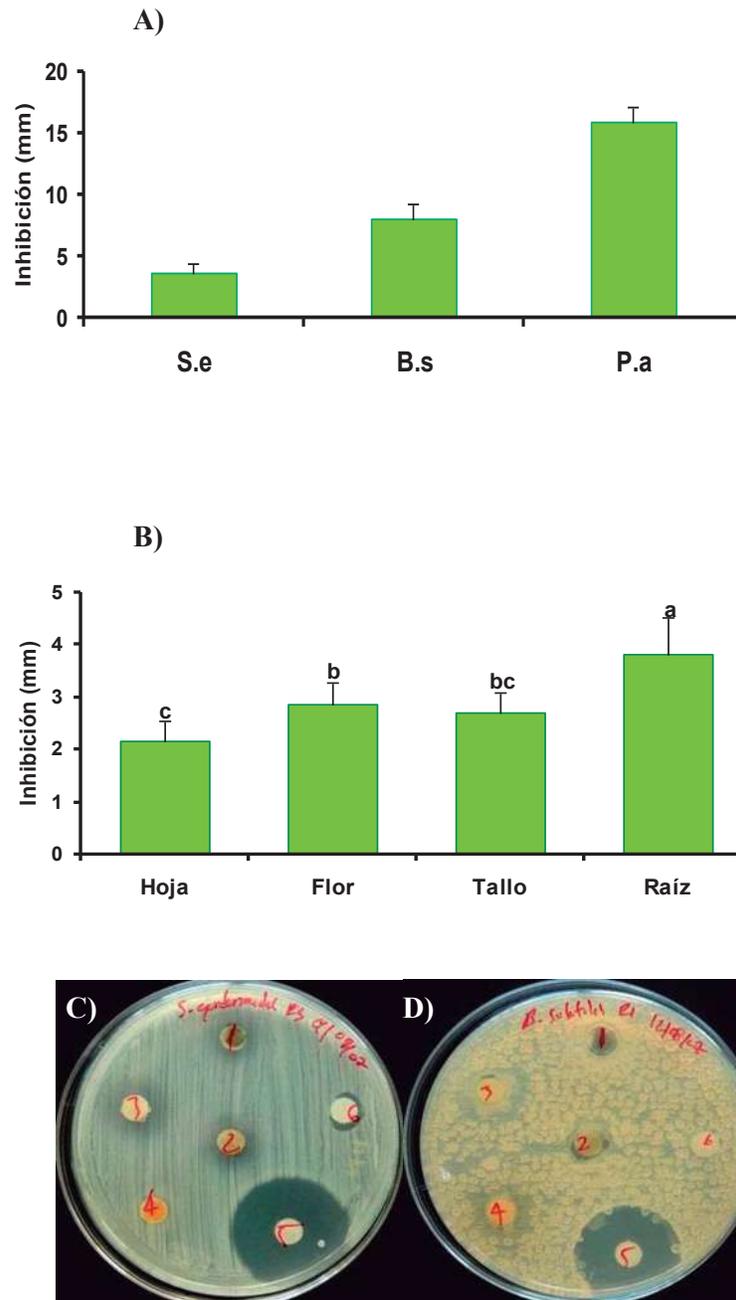


Figura 7. Efecto bacteriostático de los extractos totales cloruro metilénicos de *E. cardiophyllum*. **A)** Bacterias sensibles a los extractos de *E. cardiophyllum*. S. e = *Staphylococcus epidermidis*, B. s = *Bacillus subtilis* y P. a = *Pseudomonas aeruginosa*. **B)** Efecto bacteriostático por extracto. Bioensayo por difusión en agar **C)** *S. epidermidis* y **D)** *B. subtilis* los extractos y controles se indican de la siguiente manera 1 = hoja, 2 = flor, 3 = tallo, 4 = raíz, 5 = cefotaxima y 6 = etanol. Los valores presentados son promedio de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno, n = 3, Tukey $\alpha = 0.05$

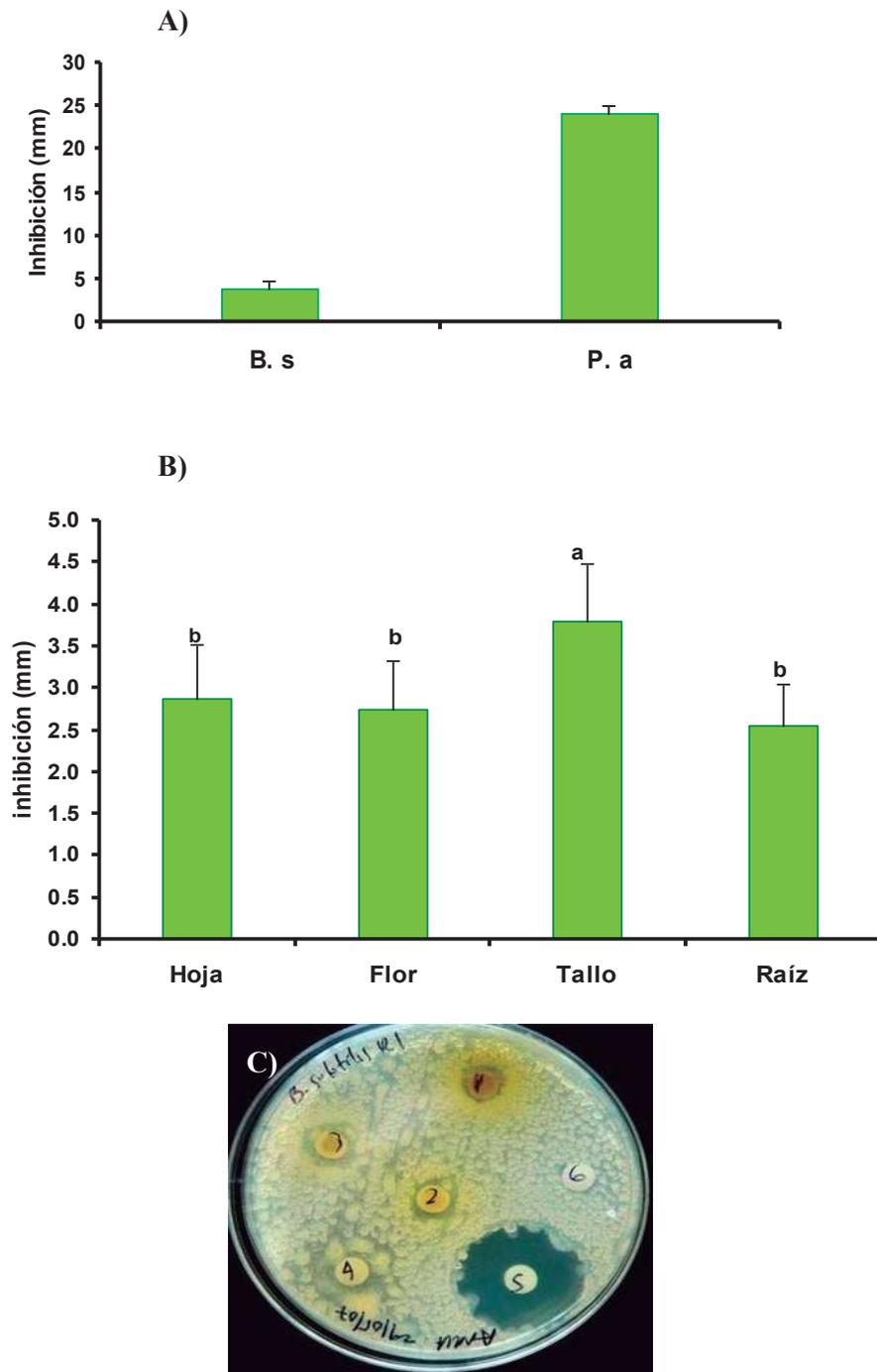


Figura 8. Efecto bacteriostático de los extractos metanólicos totales de *E. cardiophyllum*. **A)** Bacterias sensibles a los extractos **B)** Efecto bacteriostático por extracto. **C.** *B. subtilis*, los extractos y controles se indican de la siguiente manera: 1 = hoja, 2 = flor, 3 = tallo, 4 = raíz, 5 = cefotaxima, 6 = etanol. Los valores presentados son promedio de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno, n = 3, Tukey $\alpha = 0.05$

VI.2.3. Efecto bacteriostático de los extractos hexánicos

El extracto hexánico de hoja presenta actividad bacteriostática contra *B. subtilis*, *P. mirabilis* y *S. epidermidis*, siendo más sensible *B. subtilis* con un halo de inhibición 17 mm, *P. mirabilis* y *S. epidermidis* con un halo de 13 mm.

El extracto hexánico de flor ejerce un efecto bacteriostático contra cuatro aislados bacterianos que son: *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae* y *Shigella sonnei*. Siendo más sensible *B. subtilis* con un halo de inhibición de 20 mm, *S. epidermidis* con 17 mm, *K. pneumoniae* con 10 mm y *S. sonnei* con 11 mm.

El extracto hexánico de tallo es activo contra seis aislados bacterianos, el más sensible es *B. subtilis* con un halo de inhibición de 17.5 mm, *S. aureus* 15 mm, *K. pneumoniae* 14mm, *E. coli*, *C. freundii* y *S. epidermidis* con un halo de inhibición de 12.5 mm.

El extracto hexánico de raíz es activo contra dos aislados bacterianos *B. subtilis* observándose un halo de inhibición de 17 mm y *P. mirabilis* con un halo de 12 mm.

Una vez que se hizo el análisis factorial tenemos que la bacteria más sensible a los extractos hexánicos con efecto bacteriostático, en orden de sensibilidad es, *B. subtilis* con 18 mm, *S. epidermidis* con 11 mm, *K. pneumoniae* con 7 mm, *P. mirabilis* con 6 mm, *C. freundii*, *E. coli* y *S. aureus* con 4 mm.

La parte de la planta con mayor actividad bacteriostática en orden de importancia es: tallo, flor, hoja y raíz (Fig. 9 y 10).

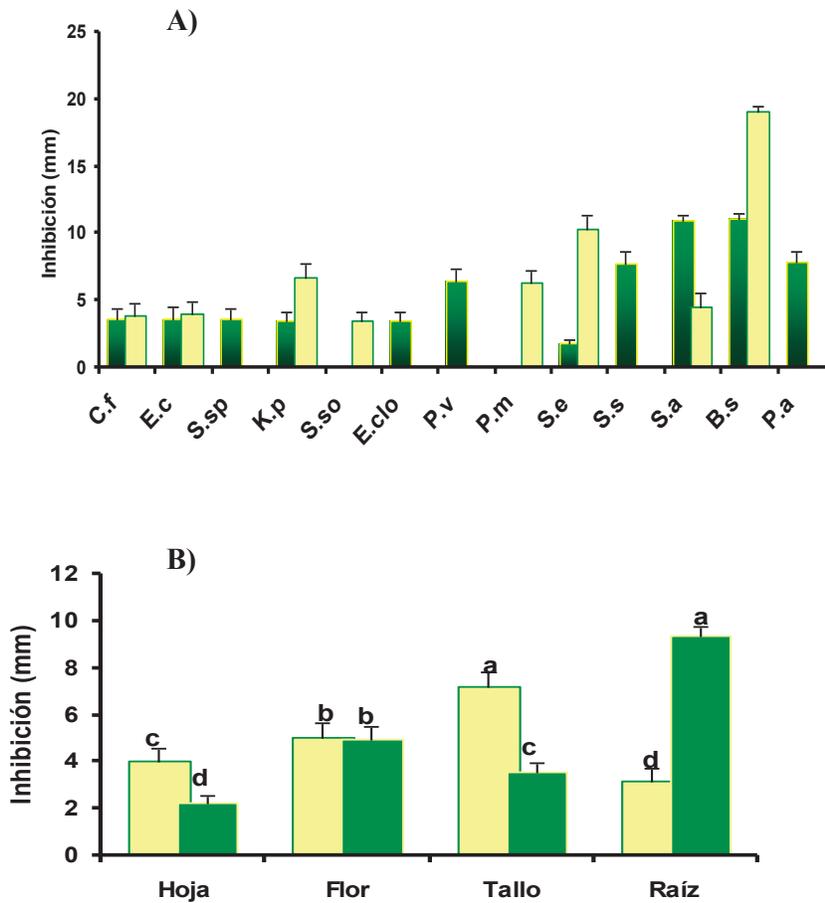


Figura 9. Efecto de los extractos hexánicos totales sobre el crecimiento bacteriano. **A)** Efecto bacteriostático y bactericida de los extractos hexánicos totales de *E. cardiophyllum*. C. f = *Citrobacter freundii*, E. c = *Escherichia coli*, S. sp = *Salmonella* sp., K. p = *Klebsiella pneumoniae*, S. so = *Shigella sonnei*, E. clo = *Enterobacter cloacae*, P. v = *Proteus vulgaris*, P. m = *P. mirabilis*, S. e = *Staphylococcus epidermidis*, S. s = *S. saprophyticus*, S. a = *S. aureus*, B. s = *Bacillus subtilis* y P. a = *Pseudomonas aeruginosa*. **B)** Efecto bacteriostático y bactericida por parte de la planta. Efecto bactericida (barras verdes) y efecto bacteriostático (barras crema) Los valores presentados son promedio de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno, n = 3, Tukey $\alpha = 0.05$

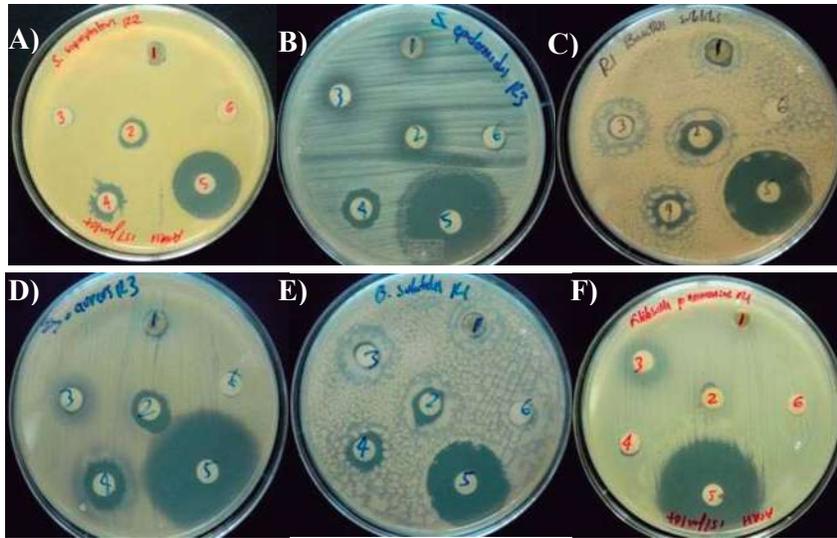


Figura 10. Efecto bacteriostático y bactericida de los extractos hexánicos totales de *E. cardiophyllum* sobre *Staphylococcus saprophyticus* **A)**, *S. epidermidis* **B)**, *Bacillus subtilis* (**C** y **E**), *S. aureus* **D)** y *Klebsiella pneumoniae* **F)**, extractos y controles: 1 = hoja, 2 = flor, 3 = tallo, 4 = raíz, 5 = cefotaxima y 6 = etanol.

VI.2.4. Efecto bactericida de los extractos hexánicos de *E. cardiophyllum*

El extracto hexánico de hoja es activo contra dos bacterias Gram positivas *S. aureus* y *B. subtilis*, se observa un halo de inhibición de 9.4 mm y 8.8 mm respectivamente.

El extracto de flor es activo contra tres bacterias Gram positivas y dos Gram negativas, son las siguientes: *B. subtilis* con un halo de inhibición de 12.11 mm, *S. saprophyticus* con 11.98, *S. aureus* con 11.55, *P. vulgaris* con 11.52 y *P. aeruginosa* con 9.71.

El extracto hexánico de tallo es activo contra tres bacterias Gram positivas y una Gram negativa, son las siguientes: *B. subtilis* con un halo de inhibición de 10.77 mm, *P. aeruginosa* con 10.22 mm, *S. aureus* con 9.56 mm y *S. saprophyticus* con 7.12 mm de halo de inhibición.

El extracto hexánico de raíz es el más activo de todos los extracto probados tiene un efecto bactericida contra once aislados bacterianos de los trece con los que fue probado.

Los datos son los siguientes: *S. aureus* con un halo de inhibición de 13.22 mm, *B. subtilis* con 12.41 mm, *P. vulgaris* con 12.20 mm, *E. coli* con 11.67 mm, *Salmonella* sp. con 11.63 mm, *C. freundii* con 11.35 mm, *K. pneumoniae* con 10.76 mm, *E. cloacae* con 10.74 mm, *S. saprophyticus* con 10.66 mm, *P. aeruginosa* con 10.36 mm y *S. epidermidis* con 4.29 mm de halo de inhibición.

Las bacterias más sensibles a los extractos hexánicos son *B. subtilis* y *S. aureus*, la parte de la planta más activa responsable de este efecto bactericida es el extracto hexánico de raíz (Fig. 9 y 10).

VI.3. Efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de hongos

VI.3.1. Efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de *C. albicans*

Los extractos hexánicos de hoja, flor, tallo y raíz, todos inhiben el crecimiento de esta levadura observándose los siguientes halos de inhibición 17.88 mm, 20 mm, 22.5 mm y 24 mm, respectivamente. Los extractos hexánicos son los más efectivos para inhibir el crecimiento de esta levadura, observándose un efecto fungicida.

De estos extractos hexánicos el de flor es el mejor a las 72 h, ya que no se observó disminución en el halo de inhibición (Fig 11). Los extractos cloruro metilénicos de hoja, flor y tallo inhiben el crecimiento de *C. albicans* con los halos de inhibición 4 mm, 10 mm y 1.7 mm, respectivamente, el extracto cloruro metilénico de raíz no presenta inhibición del crecimiento de esta levadura.

Los extractos metanólicos de hoja, flor, tallo y raíz totales de *E. cardiophyllum*, no inhiben el crecimiento de *C. albicans* (Fig. 11).

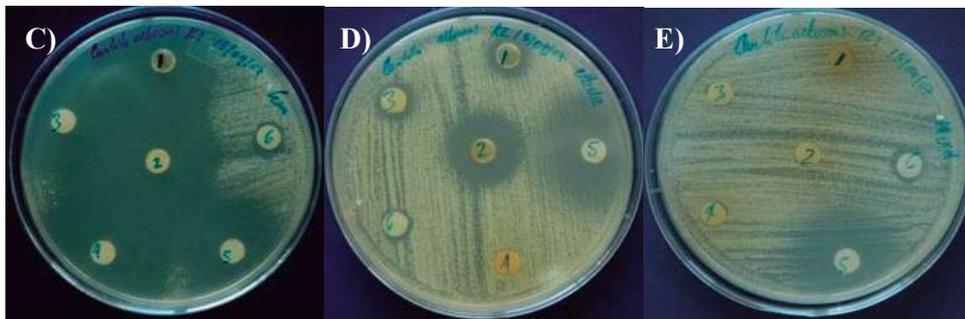
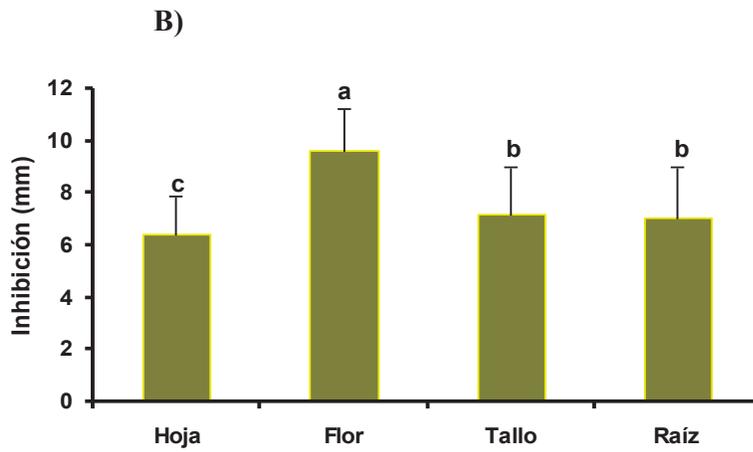
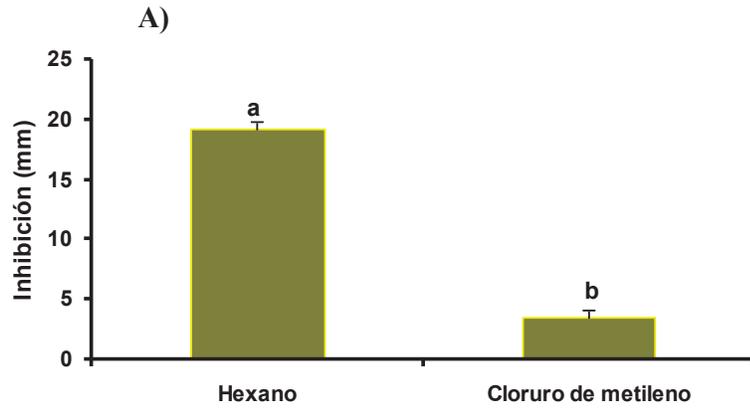


Figura 11. Efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de *C. albicans* a las 72 h. **A)** Efecto de los extractos hexánicos y cloruro metilénicos totales de *E. cardiophyllum* **B)** Efecto por parte de la planta de los extractos de *E. cardiophyllum*. Bioensayo por difusión en agar, **C)** Extractos hexánicos, **D)** Extractos cloruro metilénicos y **E)** Extractos metanólicos. Extractos y controles: 1 = hoja, 2 = flor, 3 = tallo, 4 = raíz, 5 = fluconazol y 6 = etanol. Los valores presentados son promedio de tres experimentos independientes por triplicado cada uno, n = 3, Tukey $\alpha = 0.05$

VI.3.2. Efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de hongos filamentosos

El experimento fue monitoreado al tercer y sexto día, *R. solani*, es el más sensible con un índice de crecimiento (IC) de 0.56 y 0.64, le sigue *F. oxysporum* con un IC de 0.64 y 0.73, y por último *C. acutatum* con un IC de 0.71 y 0.79. Los extractos hexánicos son los más activos contra los tres hongos filamentosos, seguido de los cloruro metilénicos y por último los metanólicos.

En cuanto a la parte de la planta, la hoja, la flor y el tallo ejercen un efecto similar al tercer y sexto día de crecimiento de los hongos con un IC entre 0.7 y 0.8 y el extracto hexánico de raíz no ejerce un efecto en la inhibición del crecimiento de los hongos (Fig. 12 y 13).

VI.4. Efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de oomicetos.

Los oomicetos, *P. cactorum*, *P. cinnamomi* y *P. capsici*, son sensibles a los extractos de *E. cardiophyllum*, el primero de ellos es el más sensible con los índices de crecimiento (IC) bajos tanto al segundo, tercer y cuarto día que fue monitoreado el experimento y son como sigue para *P. cactorum* 0.36, 0.42 y 0.48, *P. cinnamomi* 0.44, 0.55 y 0.55 y *P. capsici* 0.50, 0.62 y 0.63.

El efecto por tipo de disolvente, los extractos hexánicos son los más activos para inhibir el crecimiento de los oomicetos con índices de crecimiento (IC) de 0.41, 0.40 y 0.39, le siguen los cloruro metilénicos con (IC) de 0.33, 0.49 y 0.54 y los metanólicos con (IC) de 0.56, 0.70 y 0.73 (Fig. 14). El efecto por parte de la planta tenemos que los extractos hexánicos de hoja, flor y tallo presentan un efecto oomiceticida, mientras que los extracto de raíz no afectan el crecimiento de estos oomicetos (Fig. 14 y 15).

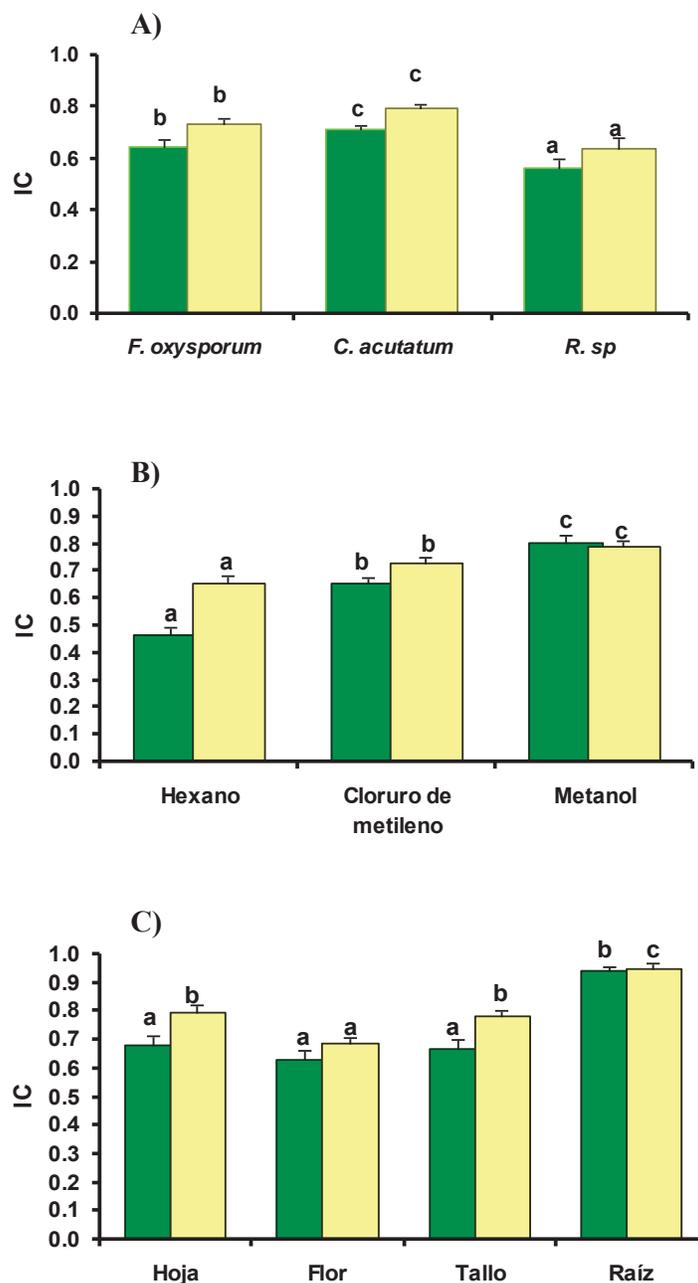


Figura 12. Efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de hongos filamentosos. **A)** Sensibilidad de los hongos a los extractos. **B)** Efecto por tipo de disolvente. **C)** Efecto por parte de la planta. Tercer día (barras verdes), sexto día (barras amarillas). Los valores presentados son promedio de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno, $n = 3$. Tukey $\alpha = 0.05$

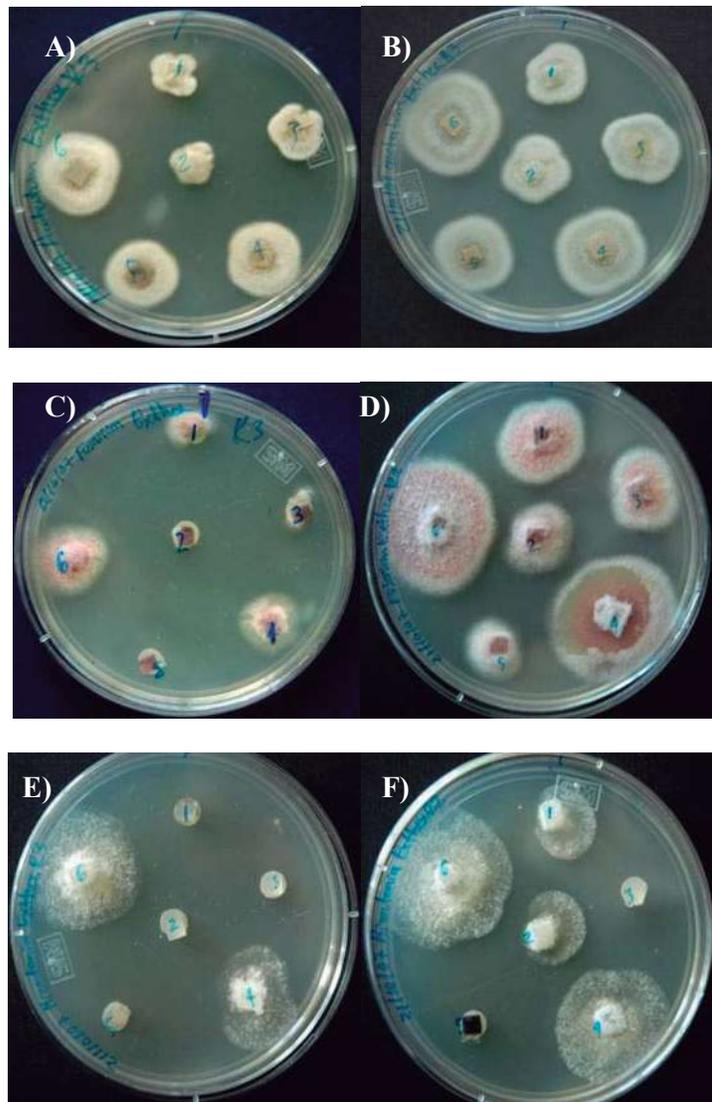


Figura 13. Efecto de los extractos hexánicos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de hongos filamentosos. **A)** *C. acutatum* al tercer día de crecimiento. **B)** *C. acutatum* al sexto día de crecimiento. **C)** *F. oxysporum* al tercer día de crecimiento. **D)** *F. oxysporum* al sexto día de crecimiento. **E)** *Rhizoctonia sp.* al tercer día de crecimiento y **F)** *Rhizoctonia sp.* al sexto día de crecimiento. Extractos y controles: 1 = hoja, 2 = flor, 3 = tallo, 4 = raíz, 5 = tiabendazol y 6 = etanol.

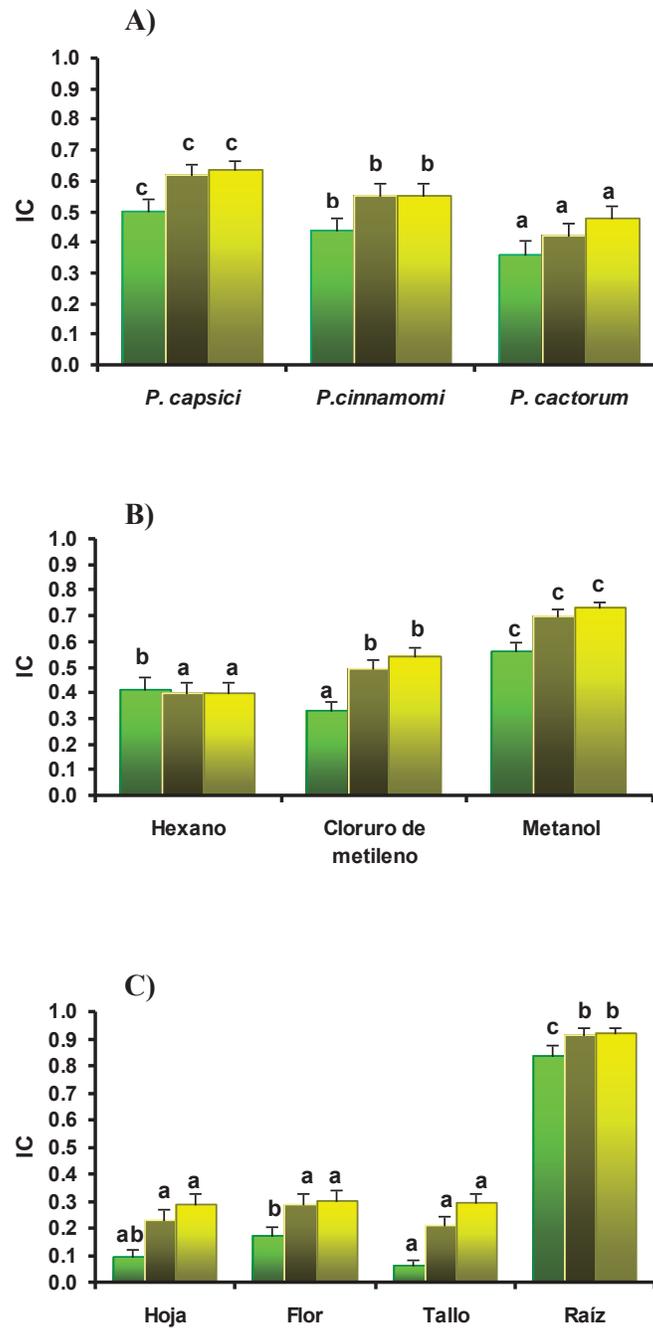


Figura 14. Efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de oomicetos. **A)** Sensibilidad de los oomicetos a los extractos. **B)** Efecto por tipo de disolvente. **C)** Efecto por parte de la planta. Crecimiento al segundo día (barras verdes), crecimiento al tercer día (barras café) y crecimiento al cuarto día (barras amarillas). Los valores presentados son promedio de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada uno, n = 3, Tukey $\alpha = 0.05$

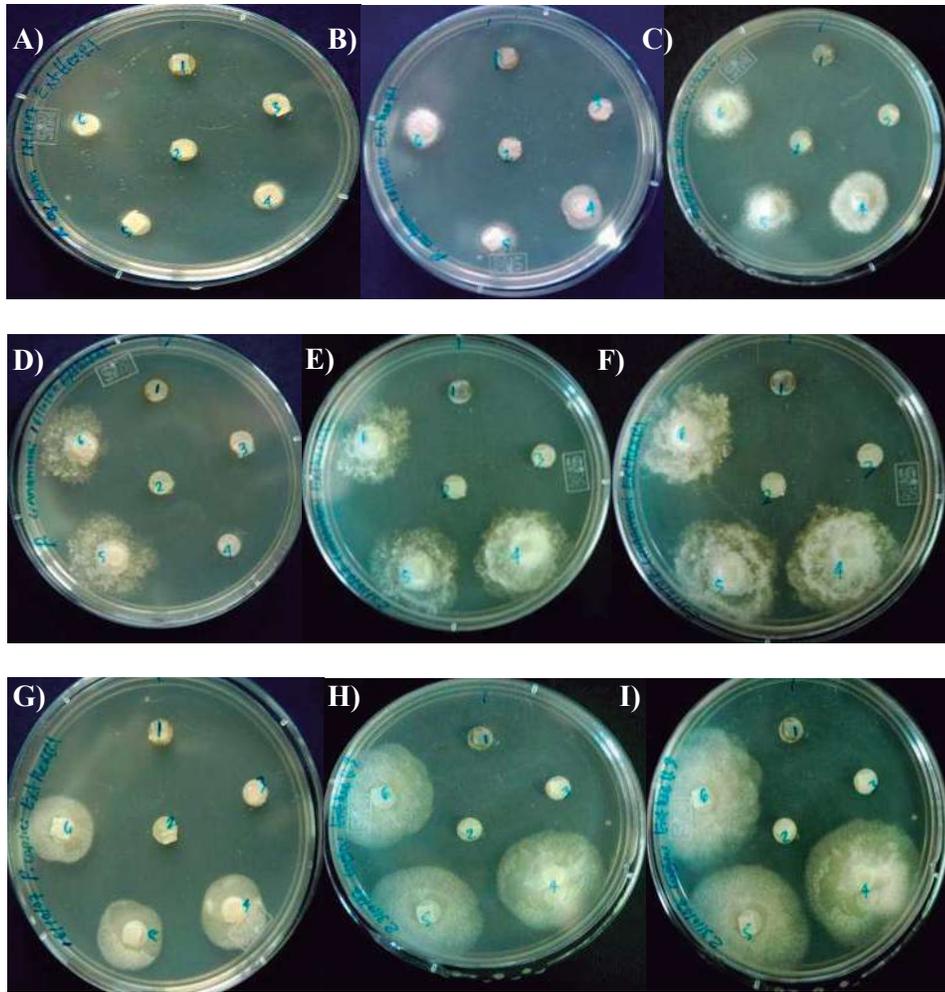


Figura 15. Efecto de los extractos hexánicos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de oomicetos al segundo, tercero y cuarto día de crecimiento. **A), B)** y **C)** *P. cactorum*. **D), E)** y **F)** *P. cinnamomi*. **G), H)** e **I)** *P. capsici*. Extractos y controles: 1 = hoja, 2 = flor, 3 = tallo, 4 = raíz, 5 = mefenoxam y 6 = etanol.

VI.5. Efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de *S. boulardii*.

Con el objetivo de seleccionar el extracto más efectivo, aquel que inhiba el crecimiento del mayor número de microorganismos patógenos pero que no afecte el crecimiento de microorganismos benéficos para el humano, así se determinó el efecto de los extractos de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de dos microorganismos *S. boulardii* y *L. casei*.

Observamos que los extractos hexánicos de hoja, flor, tallo y raíz ejercen un efecto fungicida contra esta levadura, un efecto similar al observado con *C. albicans*, en cuanto a los extractos cloruro metilénicos de hoja, flor y tallo son más activos contra esta levadura, mientras que los extractos metanólicos de hoja, flor, tallo y raíz no afectan el crecimiento, en este caso no fue posible hacer una selección de un extracto (Fig. 16).

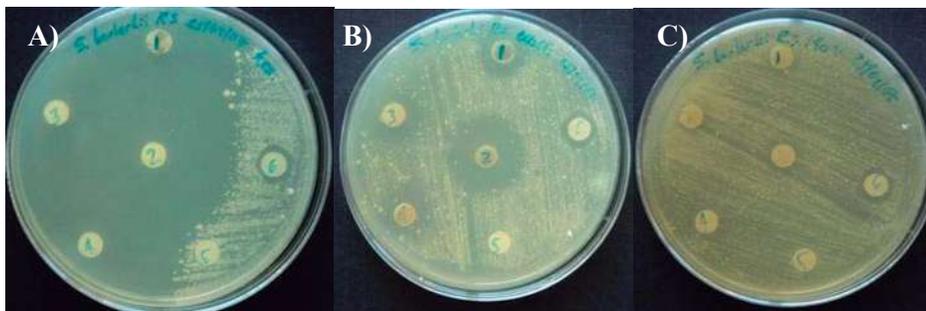


Figura 16. Efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de *S. boulardii*. **A)** Extractos hexánicos. **B)** Extractos cloruro metilénicos. **C)** Extractos metanólicos. Extractos y controles: 1 = hoja, 2 = flor, 3 = tallo, 4 = raíz, 5 = fluconazol y 6 = etanol.

VI.6. Efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de *L. casei*.

Con el objetivo de seleccionar el extracto más activo contra los patógenos probados, pero que no afecte al crecimiento de microorganismos benéficos para el humano, se determinó la sensibilidad de *L. casei* a los extractos de *E. cardiophyllum*, se observó que los extractos cloruro metilénicos y metanólicos de hoja, flor, tallo y raíz no afectan el crecimiento de esta bacteria, mientras que de los extractos hexánicos el único que inhibió el crecimiento fue el de raíz (Cuadro 11 y Fig. 17).

Por tal motivo el extracto seleccionado fue el extracto hexánico de flor (Cuadro 12).

Cuadro 11. Efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de *L. casei*.

Parte de la planta	Disolvente	Sensibilidad
Hoja	Hexano	-
Flor	Hexano	-
Tallo	Hexano	-
Raíz	Hexano	+
Hoja	Cloruro de metileno	-
Flor	Cloruro de metileno	-
Tallo	Cloruro de metileno	-
Raíz	Cloruro de metileno	-
Hoja	Metanol	-
Flor	Metanol	-
Tallo	Metanol	-
Raíz	Metanol	-



Figura 17. Bioensayo por difusión en agar de los extractos hexánicos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de *L. casei*. 1 = hoja, 2 = flor, 3 = tallo, 4 = raíz, 5 = cefotaxima y 6 = etanol.

Cuadro 12. Resumen de efecto microbicida de los extractos de hexánicos totales de *E. cardiophyllum*.

Parte de la planta	Bacterias	Hongos	Oomicetos
Flor	5/14	5/5	3/3
Hoja	2/14	5/5	3/3
Raíz	12/14	2/5	0/3
Tallo	4/14	5/5	3/3

VI.7. Purificación e identificación de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor

Para la purificación e identificación de metabolitos secundarios vegetales se siguió un procedimiento de separación cromatográfico que consideró los siguientes criterios: *i*, se asume que el o los componentes mayoritarios del extracto son los responsables de la actividad microbicida y *ii*, estudiar aquellos espectros de resonancia magnética nuclear que contengan señales interpretables.

Mediante cromatografía en columna con la adición de un gramo de extracto hexánico desengrasado de flor y utilizando como fase móvil mezclas de hexano-acetato de etilo en polaridad ascendente y apoyados en espectroscopía de resonancia magnética nuclear, se logró purificar e identificar los siguientes compuestos: en los primeros 100 ml de hexano se observaron grasas, en la polaridad 95:5 se identificaron timoles, en 90:10 un compuesto denominado “A”, en 85:15 el compuesto “A” más una cumarina, en 80:20 un compuesto exocíclico más un compuesto que denominamos “B”. De la polaridad de 75-25 a 40-60 se observó el compuesto “B”, el resto de las fracciones cromatográficas que estuvieron en la polaridad 30-70 a 0-100, en ellas se obtuvieron espectrogramas con señales no interpretables que comúnmente son denominadas en este tipo de análisis como “descomposición” (Cuadro 13).

Así se purificaron dos componentes el primero de ellos se obtuvo de la fracción 27 a la 40, con la polaridad 90:10 (hexano:acetato de etilo) un componente que denominamos compuesto “A”. El segundo componente mayoritario salió de la fracción 102 a la 165, con la polaridad de 75:25 a la 40:60 (hexano-acetato de etilo) (Cuadro 14).

Cuadro 13. Condiciones de la cromatografía en columna

Polaridad		Metabolito	Volumen (ml)
Hexano	Acetato de etilo		
100	0	Grasa	100
95	5	Timoles	200
90	10	Componente A	200
85	15	Componente A + Cumarina	200
80	20	Componente exocíclico + Componente B	200
75	25	Componente B	200
70	30	Componente B	100
65	35	Componente B	100
60	40	Componente B	100
55	45	Componente B	100
50	50	Componente B	50
40	60	Componente B	50
30	70	Descomposición	50
20	80	Descomposición	50
10	90	Descomposición	50
0	100	Descomposición	50

Cuadro 14. Componentes mayoritarios del extracto desengrasado de flor de *E. cardiophyllum*.

Fracción	Polaridad	Metabolito
27 - 40	90:10	Componente A
102 - 165	75:25 – 40:60	Componente B

VI.7.1. Análisis espectroscópico del componente mayoritario A

Los componentes mayoritarios puros se identificaron utilizando técnicas de espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases y de resonancia magnética nuclear. En la figura 18 se muestra el cromatograma de gases del componente mayoritario “A”, donde se observa un pico prominente con un tiempo de retención de 20.97 y con un enriquecimiento por arriba del 90 %. El espectro de masas del componente mayoritario denominado hasta este momento compuesto “A”, nos muestra un ión molecular de 306 uma y un patrón de fragmentación que comparado con la base de datos NIST nos dice con un 99 % de certeza que se trata de un componente con una fórmula química condensada $C_{20}H_{34}O_2$ (Fig. 18). Estos datos se corroboraron con la resonancia magnética nuclear de Hidrógeno y Carbono-13. La figura 19 nos muestra el espectro de hidrógeno del componente mayoritario “A”, que corresponde al ácido catívico, El espectro de 1H -RMN a 400 MHz muestra una señal múltiple en 5.38 ppm correspondiente a un hidrógeno vinílico, en 2.39 se observa una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de $J=15.01$ y 5.86 Hz, en 2.15 se observa otra señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de $J=15.01$ y 8.42 Hz, señales correspondientes a los hidrógenos 14 y 14' los cuales al estar en una posición α a un grupo carboxilo presentan este desplazamiento. En 1.65 ppm se observa una señal simple ancha que integra para 3 hidrógenos que corresponde al metilo vinílico 17, en 0.99 ppm se observa una señal doble que integra para 3 hidrógenos que corresponde al metilo secundario 16, en 0.87, 0.85 y 0.75 ppm se observan tres señales simples correspondientes a los metilos terciarios correspondientes a los H18, 19 y 20 respectivamente. El espectro de ^{13}C presenta 20 señales, en 179.51 ppm se observa una señal correspondiente carbonilo del ácido carboxílico, en 135.26 y 122.20 ppm se observan las señales correspondientes a un doble enlace (Fig. 19).

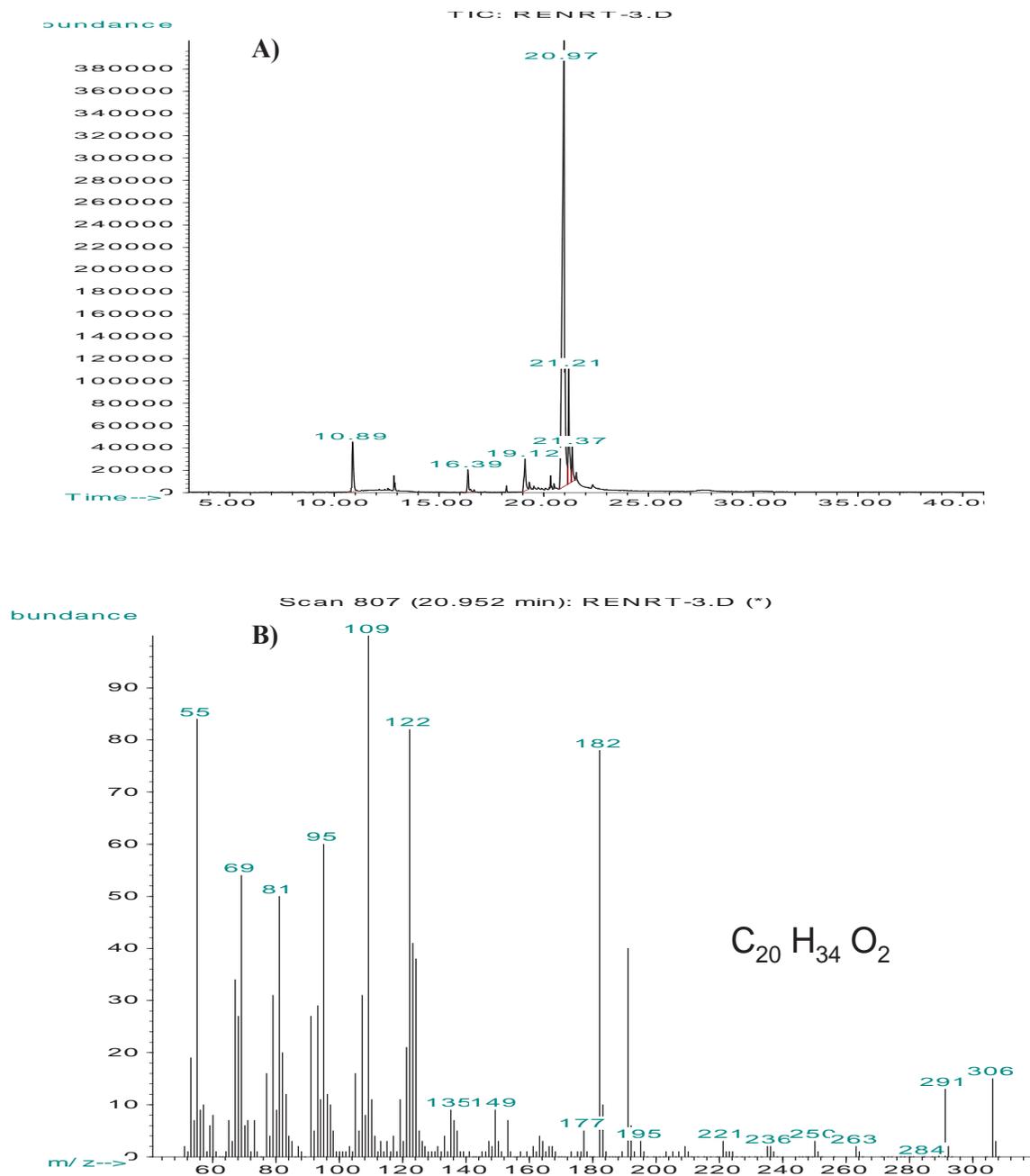


Figura 18. Análisis de espectrometría de masas acoplado a gases del componente mayoritario del extracto hexánico de flor denominado “Compuesto A”. **A)** Cromatograma de Gases del “Compuesto A”. **B)** Espectro de masas del primer componente mayoritario denominado “Compuesto A”

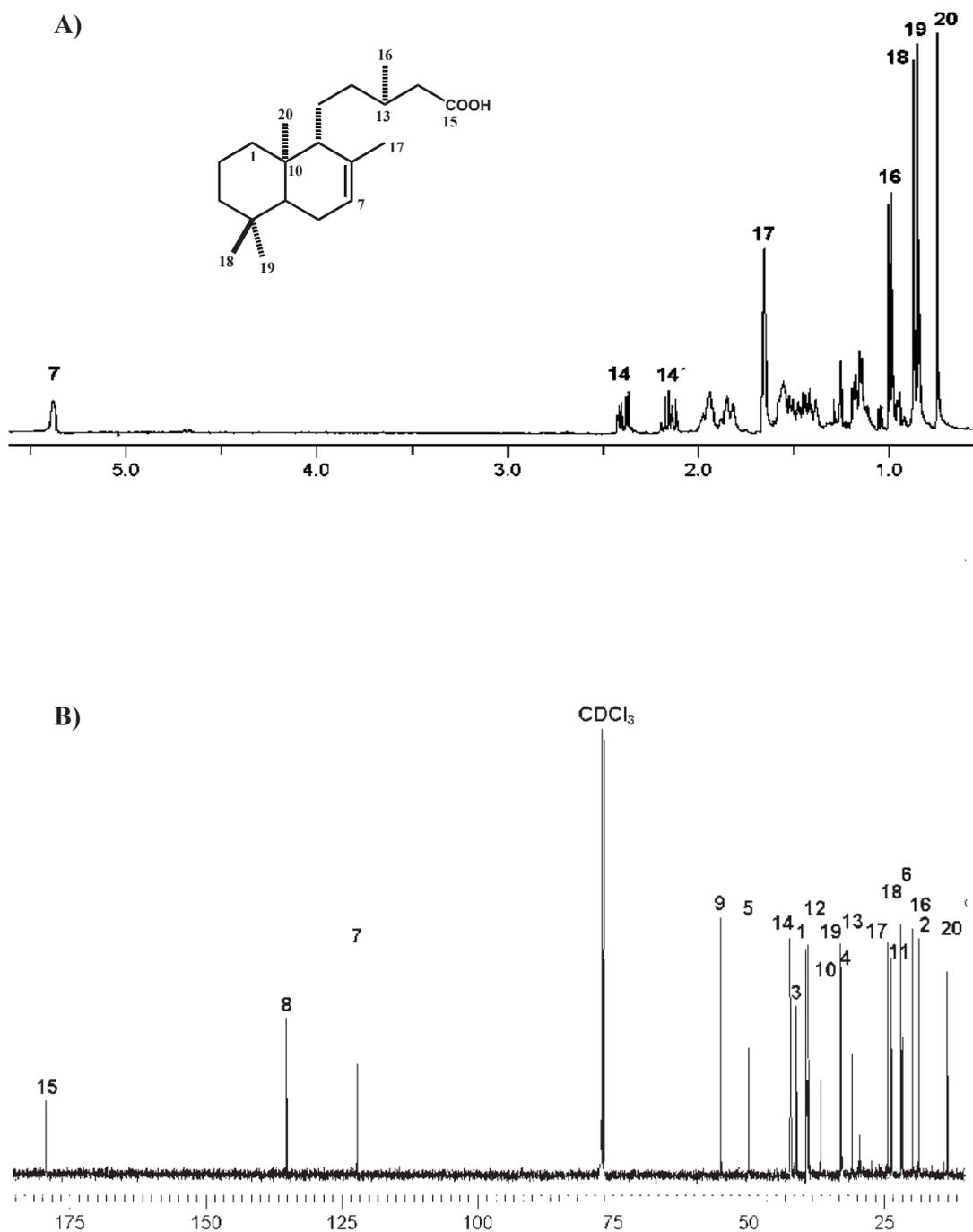


Figura 19. Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del componente mayoritario del extracto hexánico de flor denominado “Compuesto A”. **A)** Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H . **B)** Espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C , las señales corresponden al ácido catínico.

VI.7.2. Análisis espectroscópico del componente mayoritario B

Una vez purificado el componente mayoritario “B” se identificó mediante espectrometría de masas acoplado a gases y resonancia magnética nuclear, en la figura 20 se presenta el cromatograma de gases del componente mayoritario “B”, en donde se observa un pico prominente y agudo con un tiempo de retención 22.43 y un enriquecimiento por arriba del 90 %.

En la figura 20 se presenta el espectro de masas del componente “B”, el cual nos muestra un ión molecular de 324 y un patrón de fragmentación que comparado con la base de datos NIST nos dice con un 99 % de certeza que el compuesto corresponde a la fórmula química condensada $C_{20}H_{36}O_3$.

Una vez analizado el componente “B” mediante espectrometría de masas, se procedió a corroborar por técnicas de resonancia magnética nuclear de Hidrógeno y Carbono-13.

El espectro de 1H -RMN a 400 MHz mostró un patrón de señales similares a las observadas en el ácido catívico, en 2.40 ppm una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de $J = 14.64$ y 6.60 Hz, en 2.14 ppm se observa una señal doble de dobles con constante de acoplamiento de $J = 14.64$ y 7.87 Hz señales correspondientes a los H14 y 14', cabe mencionar que no se observaron señales de protones vinílicos, por lo tanto la señal simple en 1.15 ppm correspondiente al metilo 17 se ve modificado este desplazamiento químico. En 0.98 ppm se observa una señal doble que integra para tres hidrógenos correspondiente al metilo secundario 16, en 0.86 ppm se observa una señal simple correspondiente al metilo terciario 18, en 0.78 ppm se observa una señal simple que integra para 6 hidrógenos correspondientes a los metilos 19 y 20 que se encuentran sobrepuesto (Fig. 21). El espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C presenta 20 señales, lo que nos indica que se trata de un compuesto diterpénico, en 177.76 ppm se observa la señal correspondiente a la señal del ácido carboxílico, en 74.70 ppm se observa la señal de un carbono cuaternario base de oxígeno en el carbono 8, se trata del ácido labdanólico (Fig. 21). Los datos de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas acoplado a gases de ambos componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor, ácido catívico y ácido labdanólico se describen en los cuadros 15 y 16.

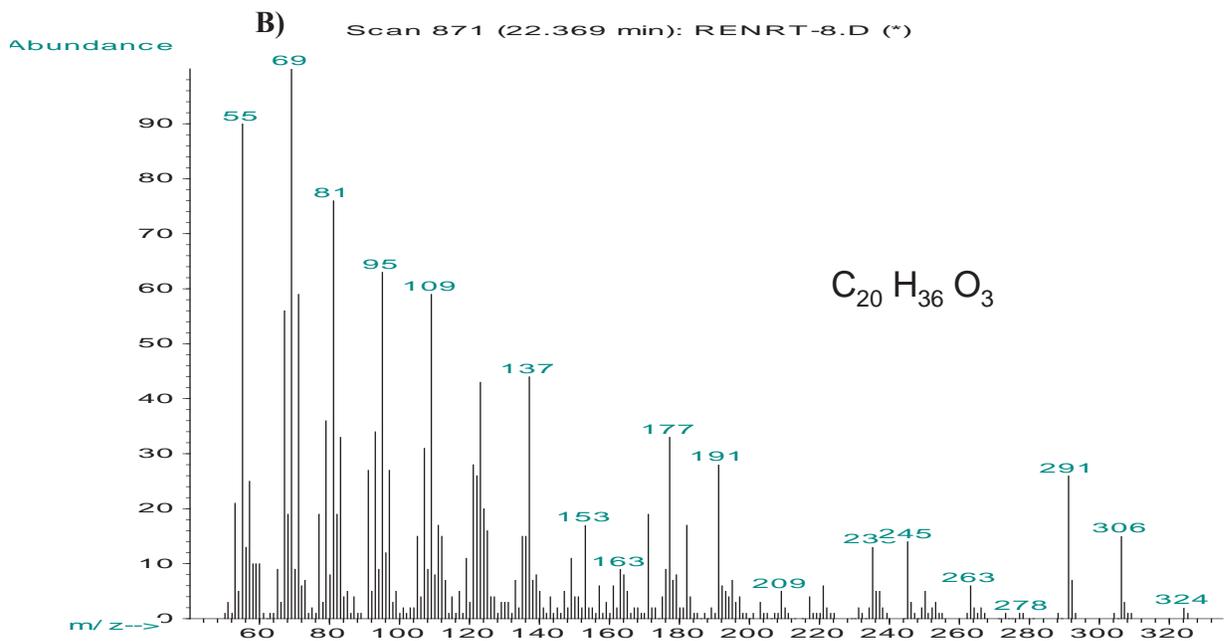
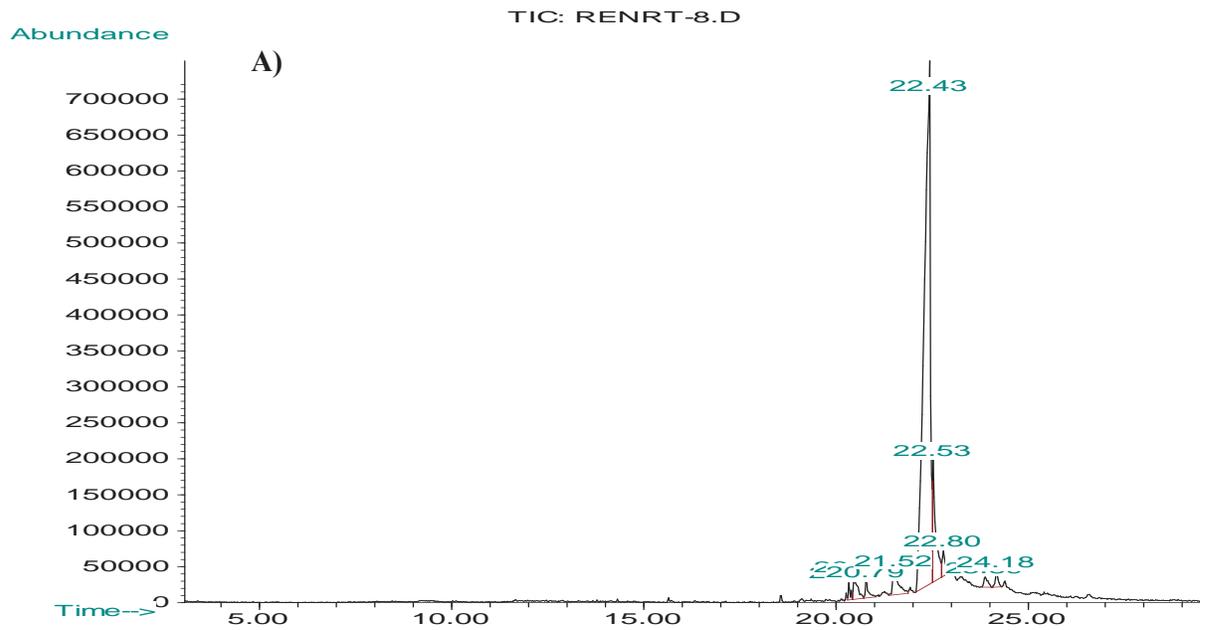


Figura 20. Análisis de espectrometría de masas acoplado a gases del componente mayoritario del extracto hexánico de flor denominado “Compuesto B”. **A)** Cromatograma de gases del “Componente B”. **B)** Espectro de masas del “Componente B”.

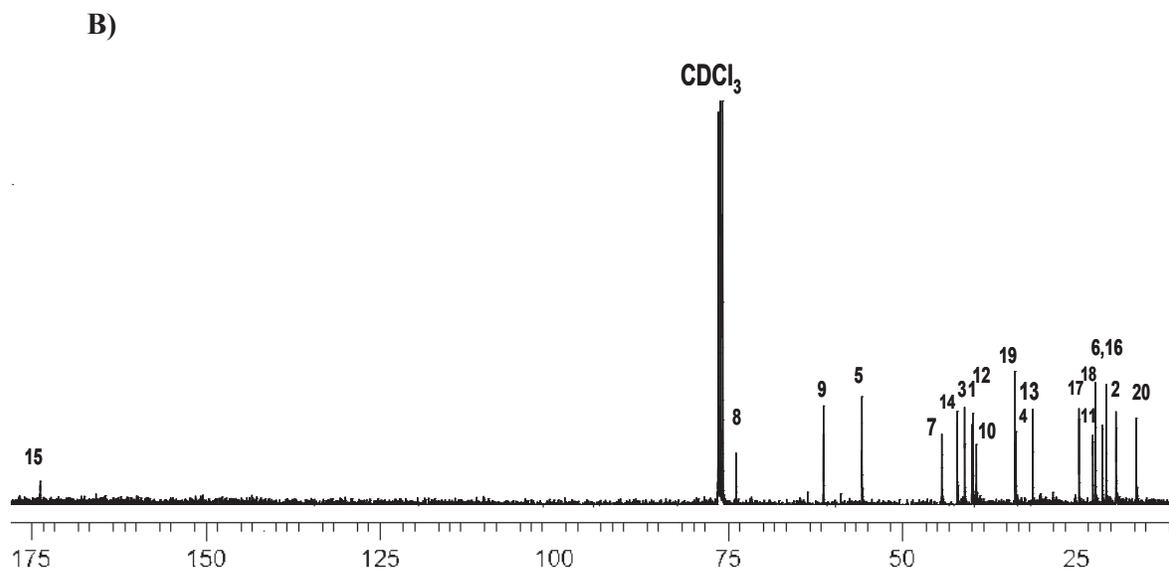
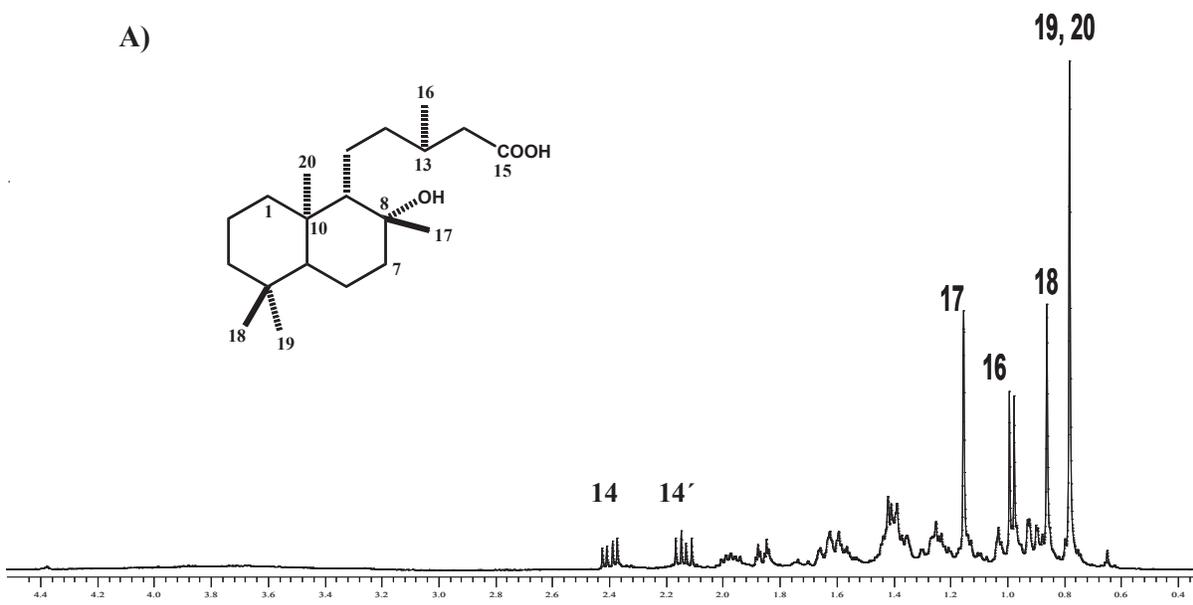


Figura 21. Análisis de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) del componente mayoritario del extracto hexánico de flor denominado “Componente B”. **A)** Espectro de resonancia magnética nuclear de ^1H . **B)** Espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C . Las señales corresponden al ácido labdanólico.

Cuadro 15. Datos de resonancia magnética nuclear de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor, ácido catívico y ácido labdanólico.

Ácido catívico		Ácido labdanólico	
¹ H – RMN, 400 MHz, CDCl ₃			
δ _H	Señal	δ _H	Señal
5.38	1H, sa, H-7	-----	-----
2.39	1H, dd, <i>J</i> = 15.01 Hz, <i>J</i> = 5.86 Hz, H-14	2.40	1H, dd, <i>J</i> = 14.64 Hz, <i>J</i> = 6.60 Hz, H-14
2.15	1H, dd, <i>J</i> = 15.01 Hz, <i>J</i> = 8.42 Hz, H-14'	2.14	1H, dd, <i>J</i> = 14.64 Hz, <i>J</i> = 7.87 Hz, H-14'
1.65	3H, sa, H-17	1.15	3H, s, H-17
0.99	3H, d, <i>J</i> = 6.5 Hz, H-16	0.98	3H, d, <i>J</i> = 6.5 Hz, H-16
0.87	3H, s, H-18	0.86	3H, s, H-18
0.85	3H, s, H-19	-----	-----
0.75	3H, s, H-20	0.78	6H, s, H-19, H-20
Nota: El resto de las señales del esqueleto se encuentran sobrepuestas de 2.0 a 0.9 ppm.			
¹³ C – RMN, 100 MHz, CDCl ₃			
179.5	C, C-15	177.76	C, C-15
135	C, C-8	74.70	C, C-8
122.20	CH, C-7	61.74	CH, C-9
55.20	CH, C-5	56.04	CH, C-5
50.13	CH, C-9	44.22	CH ₂ , C-7
42.29	CH ₂ , C-14	41.92	CH ₂ , C-3
41.26	CH ₂ , C-3	40.84	CH ₂ , C-1
39.33	CH ₂ , C-17	39.77	CH ₂ , C-12
39.12	CH ₂ , C-1	39.63	CH ₂ , C-14
36.83	C, C-10	39.10	C, C-10
33.15	CH ₃ , C-19	33.37	CH ₃ , C-19
32.94	C, C-4	33.22	C, C-4
31.05	CH, C-13	30.75	CH, C-13
24.45	CH ₂ , C-6	23.89	CH ₃ , C-17
23.79	CH ₂ , C-11	21.85	CH ₂ , C-11
22.08	CH ₃ , C-17	21.47	CH ₃ , C-18
21.84	CH ₃ , C-18	20.47	CH ₂ , C-6
19.87	CH ₃ , C-16	19.89	CH ₃ , C-16
18.79	CH ₂ , C-2	18.42	CH ₂ , C-2
13.53	CH ₃ , C-20	15.45	CH ₃ , C-20

Cuadro 16. Datos de EIMS espectrometría de masas acoplado a gases de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor, ácido catívico y ácido labdanólico.

Ácido catívico		Ácido labdanólico	
Int. Relativa	<i>m/z</i>	Int. Relativa	<i>m/z</i>
18	306[M ⁺]	2	324[M ⁺]
16	291	16	306
44	191	24	291
80	182	29	191
84	122	35	177
100	109	17	153
62	95	44	137
50	81	44	123
55	69	60	109
84	55	77	81
		100	69
		90	55

VI.8. Efecto bactericida del ácido catívico y ácido labdanólico

Ya aislados y purificados los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor, los ácidos catívico y labdanólico, se procedió a verificar si estos componentes mayoritarios eran los responsables de la actividad microbica observada en el extracto total de flor.

Los componentes mayoritarios purificados fueron disueltos en etanol y se probaron con los trece aislados bacterianos en donde se observa un efecto selectivo, tienen un efecto bactericida contra bacterias Gram positivas *B. subtilis* y *S. aureus* (Fig. 22).

El ácido catívico es más activo, observándose un halo de inhibición mayor con los aislados bacterianos mencionados (Fig. 23).

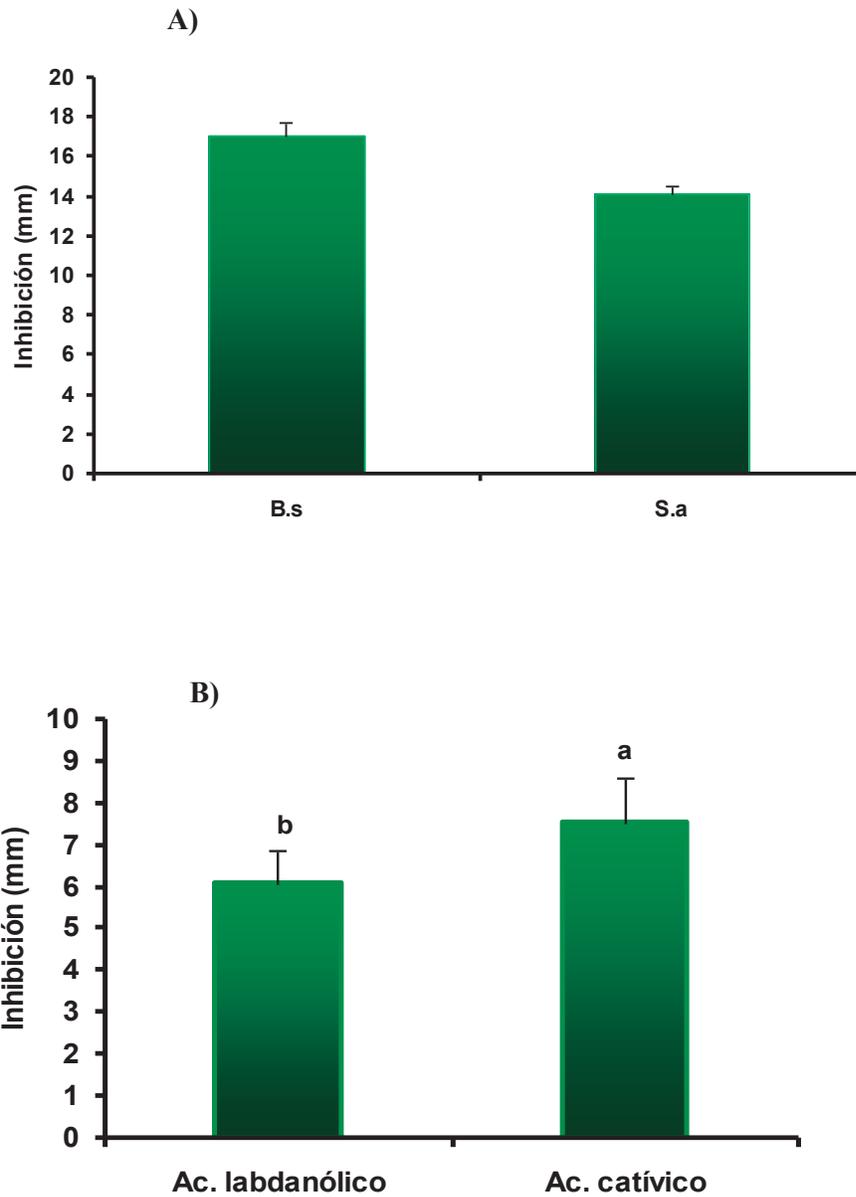


Figura 22. Efecto bactericida de los ácidos catívico y labdanólico. **A)** Aislados bacterianos sensibles a los ácidos catívico y labdanólico, B.s = *Bacillus subtilis* y S.a = *Staphylococcus aureus*. **B)** Efectividad bactericida de los ácidos catívico y labdanólico. n = 3, Tukey $\alpha = 0.05$.

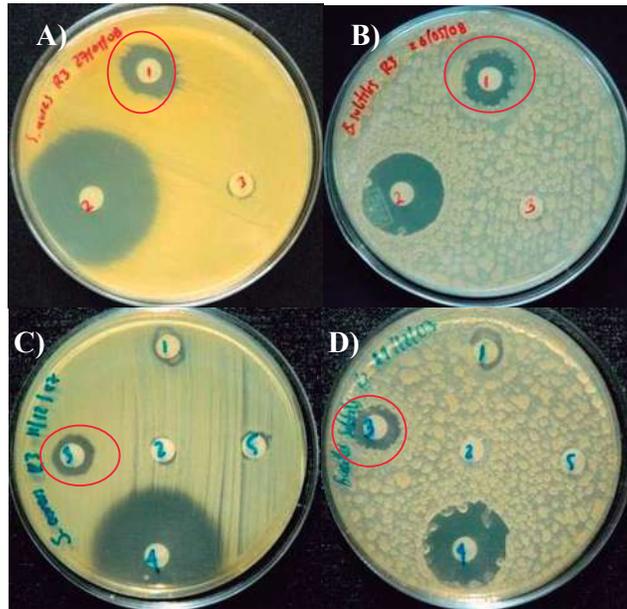


Figura 23. Efecto bactericida de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor de *E. cardiophyllum*, los ácidos catívico y labdanólico. **A)** *S. aureus* y **B)** *B. subtilis*, 1 = ácido catívico (50 µg/µl), 2 = cefotaxima (125 µg/µl) y 3 = etanol (800 µg/µl). **C)** *S. aureus* y **D)** *B. subtilis*, 3 = ácido labdanólico (50 µg/µl), 4 = cefotaxima (125 µg/µl) y 5 = etanol (800 µg/µl), a las 18 h de crecimiento.

VI.9. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los ácidos catívico y labdanólico.

Los ácidos catívico y labdanólico son activos contra bacterias Gram positivas, *B. subtilis* y *S. aureus*. El ácido catívico es más activo, presenta concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 146 µg/ml para *B. subtilis* y 780 µg/ml para *S. aureus*. Mientras que el ácido labdanólico presenta CMI de 1,560 µg/ml para *B. subtilis* y 2,340 µg/ml para *S. aureus*.

La CMI observada para ambos ácidos frente a *C. albicans* fue de 50,000 µg/ml, con lo cual podríamos decir que no son efectivos si los comparamos con los antifúngicos comerciales. Un comportamiento similar se observó en hongos filamentosos y oomicetos en donde las CMI para ambos ácidos fue mayor igual a 250,000 µg/ml (Cuadro 17) y (Fig. 24).

Cuadro 17. Concentración Mínima Inhibitoria de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor, los ácidos catívico y labdanólico

Patógeno	CMI ($\mu\text{g/ml}$)	
	Ac. catívico	Ac. labdanólico
<i>B. subtilis</i>	146	1,560
<i>S. aureus</i>	780	2,340
<i>C. albicans</i>	50,000	50,000
<i>C. acutatum</i>	> 250,000	> 250, 000
<i>F. oxysporum</i>	> 250,000	Nd
<i>P. capsici</i>	> 250,000	250,000
<i>P. cinnamomi</i>	62,500	250,000

Nd = No determinado

VI.10. Determinación de la variación natural de los componentes microbicidas

La variación natural de metabolitos secundarios se refiere a que algunos compuestos secundarios de las plantas se encuentran presentes solo en una etapa estacional, con la finalidad de conocer si los componentes mayoritarios purificados están presentes en la época de florecimiento pero en diferente tiempo se hicieron dos colectas en la carretera Morelia-Zacapu, la primera fue el 22 de febrero del año 2006 en el Km 53, altitud 2266 msnm, latitud N 19° 42.821' y W 101° 36.711'y una realizada el día 06 de febrero del 2008 en el Km 51, altitud 2247 msnm, latitud N 19° 42.216' y W 101° 35.962'.

Se observó que la cantidad de extraíbles es similar en ambas colectas, encontrando una cantidad de extracto total hexánico de flor de 10.25 % en el primer lote y 9.97 % en el segundo; en cuanto a los componentes mayoritarios y responsables de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas observamos al ácido catívico en primer y segundo lote con 90 y 100 mg/g de extracto, respectivamente, el ácido labdanólico también se identificó en el primer y segundo lote con 100 y 120 mg/g de extracto, respectivamente (Cuadro18).

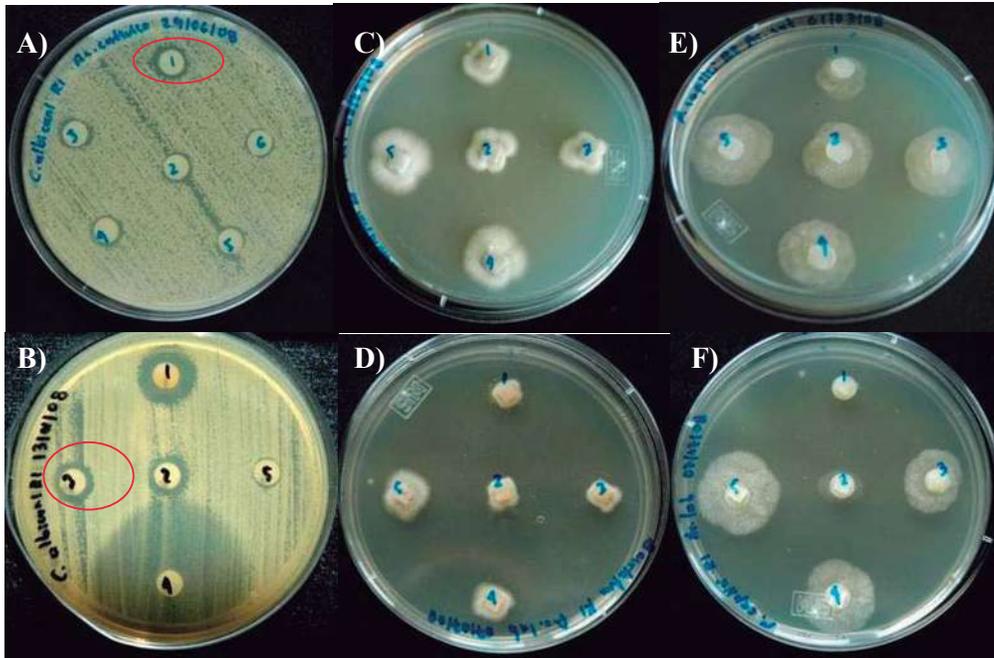


Figura 24. Efecto microbicida de los ácidos catívico y labdanólico. **A)** Circulo rojo, Concentración Mínima Inhibitoria del ácido catívico (50,000 $\mu\text{g/ml}$) para *C. albicans*. **B)** Circulo rojo Concentración Mínima Inhibitoria del ácido labdanólico (50,000 $\mu\text{g/ml}$) para *C. albicans*. **C)** Efecto del ácido catívico sobre el crecimiento de *C. acutatum*. 1 = 250,000 $\mu\text{g/ml}$, 2 = 125,000 $\mu\text{g/ml}$, 3 = 62,500 $\mu\text{g/ml}$, 4 = 31,250 $\mu\text{g/ml}$, 5 = 15,625 $\mu\text{g/ml}$. **D)** Efecto del ácido labdanólico sobre el crecimiento de *C. acutatum*. 1 = 250,000 $\mu\text{g/ml}$, 2 = 125,000 $\mu\text{g/ml}$, 3 = 62,500 $\mu\text{g/ml}$, 4 = 31,250 $\mu\text{g/ml}$, 5 = 15,625 $\mu\text{g/ml}$. **E)** Efecto del ácido catívico sobre el crecimiento de *P. capsici*. 1 = 250,000 $\mu\text{g/ml}$, 2 = 125,000 $\mu\text{g/ml}$, 3 = 62,500 $\mu\text{g/ml}$, 4 = 31,250 $\mu\text{g/ml}$, 5 = 15,625 $\mu\text{g/ml}$. **F)** Efecto del ácido labdanólico sobre el crecimiento de *P. capsici*. 1 = 250,000 $\mu\text{g/ml}$, 2 = 125,000 $\mu\text{g/ml}$, 3 = 62,500 $\mu\text{g/ml}$, 4 = 31,250 $\mu\text{g/ml}$, 5 = 15,625 $\mu\text{g/ml}$.

Cuadro 18. Comparación de dos extractos hexánicos de flor de *E. cardiophyllum*

Datos de colecta	Rendimiento		
	Extracto hexánico de flor (%)	Ac. catívico (mg/g de extracto)	Ac. labdanólico (mg/g de extracto)
22/02/2006			
2266 msnm, latitud N 19° 42.821' y W 101° 36.711'	10.25	90	100
06/02/2008			
2247 msnm, latitud N 19° 42.216' y W 101° 35.962'	9.97	100	120

VI.11. Efecto microbicida de dos extractos hexánicos totales de flor de *E. cardiophyllum* colectados en diferente tiempo

Una vez obtenidos ambos extractos de diferente fecha de colecta y coordenadas se determinó su efecto microbicida, lo cual fue un experimento relevante por que observamos el mismo efecto microbicida, afectando el crecimiento de cinco bacterias dos Gram negativas y tres Gram positivas, cinco hongos y tres oomicetos (Cuadro 19 y Fig. 25).

Cuadro 19. Efecto microbicida de dos extractos hexánicos totales de flor de *E. cardiophyllum* colectados en diferente tiempo

Extractos hexánicos totales de flor	Bacterias	Hongos	Oomicetos
Primer lote	2/2	5/5	3/3
Segundo lote	2/2	5/5	3/3

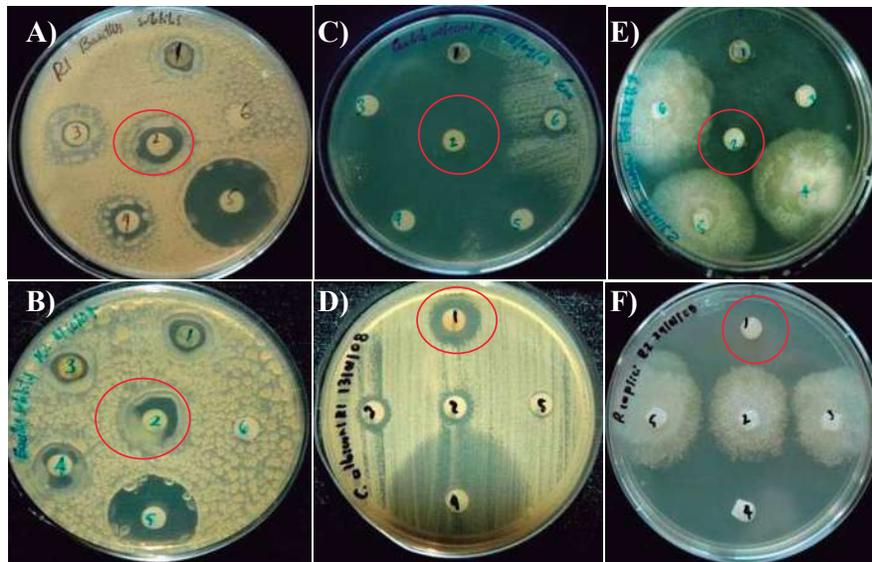


Figura 25. Bioensayo por difusión en agar de dos extractos hexánicos totales de flor de *E. cardiophyllum* colectados en diferente tiempo. **A)** *B. subtilis*, círculo rojo, extracto hexánico de flor primer lote. **B)** *B. subtilis*, círculo rojo, extracto hexánico de flor segundo lote. **C)** *C. albicans*, círculo rojo, extracto hexánico de flor primer lote. **D)** *C. albicans*, círculo rojo, extracto hexánico de flor segundo lote. **E)** *P. capsici*, círculo rojo, extracto hexánico de flor primer lote. **F)** *P. capsici*, círculo rojo, extracto hexánico de flor segundo lote.

VII. Discusión

La fitoquímica y el espectro bioactivo de metabolitos secundarios de especies del género *Eupatorium* se empieza a conocer. Se han encontrado moléculas potencialmente útiles como microbicidas y citotóxicas, que motivan a continuar la búsqueda de estas moléculas en este género.

México posee varias especies endémicas de este género por lo que se requirió de utilizar criterios de escrutinio para encontrar moléculas microbicidas. Uno de los criterios que se utilizaron para seleccionar la planta con mejor efecto microbicida fue que al menos un extracto de cada una de las especies vegetales presentara un efecto microbicida contra los microorganismos probados.

Los extractos de *E. cardiophyllum* son mejores para inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y oomicetos que los de *E. arsenei* y *E. pulchellum*, de tal manera que se seleccionó a la planta *E. cardiophyllum*. Sin embargo, *E. arsenei* y *E. pulchellum* son especies interesantes debido a que inhiben el crecimiento de bacterias y oomicetos. Pero en función del criterio establecido únicamente nos enfocaremos en el estudio de la planta *E. cardiophyllum*.

Los extractos más activos que afectaron el crecimiento bacteriano son los extractos hexánicos; de estos, el extracto de raíz presentó un efecto bactericida contra once de los trece aislados bacterianos. En segundo lugar de importancia bactericida fue el extracto hexánico de flor, activo contra cinco aislados bacterianos tres de ellos Gram positivos (Cuadro 20). Le sigue el extracto hexánico de tallo, que presentó un efecto bactericida contra tres aislados bacterianos, dos Gram positivos y un Gram negativo; mientras que los extractos cloruro metilénicos y metanólicos solo presentaron un efecto bacteriostático contra dos aislados bacterianos de los trece con los que se probaron (Cuadro 20).

Esta observación es comparable con lo que reporta Gupta y col., (2002), quienes de hojas de *E. ayapana*, hicieron extracciones con metanol y éter de petróleo observaron que los extractos con éter de petróleo presentaron un mayor espectro antibacteriano con concentraciones mínimas inhibitorias de 250 a 1000 µg/ml, con un efecto diferencial, únicamente afectando el crecimiento de bacterias Gram positivas.

Sasikumar y col., (2005), determinaron la actividad antibacteriana de las hojas de *E. glandulosum*, los extractos no polares contienen compuestos de tipo terpénico e inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas, *B. subtilis*, *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes*, así como también de bacterias Gram negativas, *E. coli*, *K.*

pneumoniae, *P. aeruginosa* y *S. typhi*, a concentraciones mínimas inhibitorias de 1 mg/ml.

Los extractos hexánicos de *E. cardiophyllum* son más activos para inhibir el crecimiento de los tres hongos filamentosos, se infiere que componentes no polares presentes en los extractos hexánicos son más potentes para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos y levaduriformes (Fig. 11, 12 y 13). Los extractos hexánicos de flor, hoja y tallo se comportaron de manera similar al tercer día de crecimiento, pero al sexto día el cultivo microbiano con extracto hexánico de flor presentó el menor índice de crecimiento. Sin embargo el extracto hexánico de raíz no inhibió el crecimiento de hongos filamentosos, inferimos que únicamente los componentes no polares presentes en la hoja, la flor y el tallo son los responsables de inhibir el crecimiento de los hongos o que existe mayor cantidad de componentes en los órganos mencionados que en raíz (Fig. 11, 12 y 13).

Milosavljević y col., (2007) observaron que el aceite esencial de las partes aéreas de la planta *Seseli annuum* presentó actividad contra 15 hongos filamentosos patógenos para el ser humano, en donde los componentes mayoritarios de ese aceite, son compuestos no polares de tipo terpenoide: el β -ocimeno (monoterpeno) y el germacreno D (sesquiterpeno). Estos datos son importantes por dos razones, primera hay más plantas de diferente género que afectan el crecimiento de hongos patógenos y segunda los componentes mencionados son de tipo terpenoide, lo cual es interesante por que los componentes mayoritarios identificados en el extracto hexánico de flor son de la misma naturaleza.

Los extractos hexánicos obtenidos de la hoja, la flor y el tallo son los más activos para inhibir el crecimiento de los tres oomicetos probados, el efecto observado fue oomiceticida. Sin embargo el extracto hexánico de raíz no inhibe el crecimiento de estos organismos, inferimos que los componentes no polares presentes en hoja, flor y tallo, presentan un efecto oomiceticida y no así los componentes presentes en raíz (Fig. 15 y 16).

El objetivo de probar los extractos contra *L. casei* y *S. boulardii* fue para seleccionar el extracto que afecte el crecimiento de la mayoría de los patógenos probados, pero que no inhiba el crecimiento de estos dos microorganismos, esto con la finalidad de encontrar compuestos selectivos, que no afecten el crecimiento de microorganismos benéficos para el ser humano.

Los extractos totales hexánicos y cloruro metilénicos de *E. cardiophyllum* inhiben el crecimiento de *S. boulardii*, los extractos metanólicos no afectan el crecimiento de esta levadura. En cuanto a *L. casei*, el único extracto que inhibe el crecimiento de esta bacteria que es parte de nuestra microbiota intestinal, es el extracto hexánico obtenido de la raíz (Fig. 17 y 18).

En función de los criterios establecidos, que son identificar señales interpretables y que sean de componentes mayoritarios, esto asumiendo que los componentes mayoritarios son los responsables del efecto observado en el extracto total, se purificaron dos compuestos de tipo terpénico, el ácido catívico y ácido labdanólico, a partir del extracto hexánico. Estos componentes presentaron un efecto selectivo, ya que inhibieron el crecimiento de las bacterias Gram positivas *B. subtilis* y *S. aureus*.

La planta *E. glutinosum* nombre común “Matico Serrano” ha sido usada por mucho tiempo en la medicina tradicional en Ecuador y Perú, es un arbusto que crece en una altitud de 3000 msnm en estos países. La decocción de hojas y tallos es utilizada como astringente, antirreumático, antimicrobiano, para curar la ulcera estomacal, diarrea y dolor de cabeza (Solis, 1992).

El-Seedi y col., (2002) estudiaron las propiedades antimicrobianas de los extractos hexánicos de hojas y tallos *E. glutinosum*, probándolos contra dos bacterias Gram positivas y dos Gram negativas. Al realizar un fraccionamiento del extracto, encontraron dos componentes bioactivos de tipo terpénico: ácido 15-hidroxi-7 labden-17-oico y su acetato. Ambos componentes presentaron actividad contra las bacterias Gram positivas, *S. aureus* y *B. cereus*, y bacterias Gram negativas *E. coli* y *P. aeruginosa* reportaron concentraciones mínimas inhibitorias de 256 a 512 µg/ml para las bacterias antes mencionadas.

De *E. salvia* una planta utilizada en la medicina tradicional chilena por sus propiedades antisépticas, conocida como “salvia macho” “pegajosa” o “pega pega”, aislaron del extracto cloruro metilénico de hojas y tallos dos componentes de tipo labdano: el ácido 7-hidroxi-8(17)-labden-15-oico (ácido sálvico) y su acetato. Se observó que estos componentes presentaron actividad inhibitoria del crecimiento de bacterias Gram positivas, *B. cereus*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus* y *B. subtilis*, presentando concentraciones mínimas inhibitorias de 250-1000 µg/ml.

El ácido catívico únicamente ha sido aislado de árboles resinosos del género *Prioria* y *Eperua*, Urzua y col., (1998).

Amusant y col., (2007) hicieron un análisis químico de los componentes presentes en el duramen de *Eperua falcata* (muy durable) y *Eperua grandiflora* (durable), identificaron varios compuestos diterpénicos: ácido eperuico, ácido catívico, ácido copálico, ácido 7-oxalabda-8-en-15-oico y ácido 4,7-oxalabda-8,13-E-dien-15-oico.

Las fracciones cloruro metilénicas son activas para inhibir el crecimiento del hongo de la pudrición de la madera *Coriolus versicolor*, los autores comentan que es debida a las fracciones ácidas, es decir a la mezcla de componentes antes mencionados.

Nicolson y col., (1999) purificaron el totarol, un diterpeno aislado del árbol “totara” (*Podocarpus totara*) el cual es nativo de Nueva Zelanda, observando que este diterpeno potencia la actividad de la metilicina contra cepas de *S. aureus* resistentes a metilicina (SAMR), reduciendo 256 veces la concentración mínima inhibitoria de la metilicina, en cuanto al mecanismo de acción, observaron que no inhibe la síntesis de DNA, tampoco la síntesis de peptidoglicanas, pero si reduce la respiración en un 70 % en *S. aureus*.

Estos autores concluyen que el blanco primario del totarol es la cadena respiratoria y cuando está en mezcla con metilicina se da una inhibición de la expresión de las proteínas de unión a penicilinas tipo 2a.

Los componentes de tipo terpénico están dentro de los metabolitos más abundantes que producen las plantas, se han reportado cerca de 25,000 estructuras terpénicas, pero muy poco se conoce de sus actividades biológicas de estos componentes (Gershenzon y Dudareva, 2007). Ha inicios de los años 1970's cuando se empezaron a identificar algunas de las funciones biológicas de estos compuestos tales como toxinas, repelentes de insectos o atrayentes y se infirió que tienen alguna función ecológica, antagónica o mutualista con otros organismos (Langenheim, 1994).

Los terpenos de las plantas también son importantes en la resistencia de enfermedades causadas por bacterias y hongos, por ejemplo, las saponinas triterpénicas son terpenos glicosilados con propiedades detergentes que son tóxicos para hongos por su habilidad para formar complejos con los esteroides de las membranas fúngicas, lo que conduce a una pérdida de la integridad de la membrana (Morrisey y Osbourn, 1999).

Además los compuestos de tipo terpénico cumplen importantes funciones en las plantas por ejemplo, el grupo de los terpenos es uno de los más abundantes de los componentes volátiles de flores y frutos en las plantas, estos se encargan de atraer

agentes polinizadores para dispersar el polen y distribuir la semilla (Knudsen y col., 2006).

Los frutos y flores no son los únicos órganos involucrados en la comunicación de volátiles con otros organismos, se ha encontrado que cuando organismos herbívoros se alimentan de follaje, este follaje emite componentes volátiles en donde los principales son compuestos terpénicos, esto ayuda para la atracción de predadores y parásitos que atacan a los herbívoros (Kessler y Baldwin, 2001).

Estos compuestos que son liberados por las plantas también estimulan el crecimiento de hongos micorrízicos arbusculares, los cuales producen asociaciones simbióticas que pueden ayudar a la planta para la adquisición de nutrientes (Akiyama y col., 2005).

La razón de que las plantas los produzcan en mezclas probablemente podría deberse ha que están expuestas a un amplio número de organismos patógenos y una combinación diversa de estos compuestos podría ayudar a una protección simultánea contra predadores, parásitos y competidores. Las mezclas también podrían estar sugiriendo limitar a los enemigos para que desarrollen resistencia (Pimentel y Bellotti, 1976).

También se ha inferido que al estar sintetizando grandes cantidades de mezcla de compuestos terpénicos, es con la finalidad de potenciar el efecto de algunos de esos componentes, al presentar un efecto sinergista contra los enemigos, por citar un ejemplo, la actividad antifúngica de dos glicoalcaloides esteroideos a partir de papa fue potenciada varias veces en presencia de terpenos en comparación con el efecto observado con los compuestos únicos (Fewell y Roddick, 1993).

Este es el primer estudio de la fitoquímica y actividad microbicida de *E. cardiophyllum*, por primera vez reportamos del extracto hexánico de flor de *E. cardiophyllum* un arbusto que crece abundantemente en el Estado de Michoacán, dos compuestos de tipo terpénico, los ácidos catívico y labdanólico que presentan un efecto bactericida selectivo, ya que inhiben únicamente el crecimiento de bacterias Gram positivas. Así como también inferimos que el efecto fungicida y oomicético observado por este extracto es debido a componentes minoritarios o bien que todos aquellos compuestos presentes en el extracto de flor tienen un efecto sinergista con los ácidos catívico y labdanólico.

Fue entonces importante realizar este estudio para conocer si estos componentes están presentes año con año y entonces tener una biofuente constante de estos

componentes, esto es interesante pensando en una utilidad industrial y farmacéutica de estos componentes. No existe variación natural local de la cantidad de extracto hexánico total de flor, así como tampoco de los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor que son los ácidos catívico y labdanólico, ya que se encuentran en cantidades similares en ambas colectas. Por otra parte, no fue posible realizar un estudio estacional de esta planta debido a que su etapa de florecimiento es en febrero y marzo, pero sí pudimos detectar que los componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor están presentes cada año de floración de la planta. Estos estudios estacionales son útiles para monitorear la presencia y variabilidad de componentes de bajo peso molecular durante un año.

El efecto microbicida de extractos hexánicos totales de flor se mantiene en extractos que se hicieron de colectas hechas en años diferentes, se infiere que están presentes los mismos componentes en los extractos debido a que el efecto bactericida, fungicida y oomiceticida se presentan en ambos extractos (Fig. 25).

VIII. Resumen de resultados.

- Los extractos de *E. cardiophyllum* presentan mayor actividad microbicida que los extractos de *E. arsenei* y *E. pulchellum*.
- Los extractos hexánicos totales de *E. cardiophyllum* presentan mayor actividad contra bacterias, hongos y oomicetos, que los extractos cloruro metilénicos y metanólicos.
- Se identificó, aisló y evaluó la actividad microbicida de dos componentes mayoritarios del extracto hexánico de flor que correspondieron al ácido catívico y ácido labdanólico.
- El ácido catívico es más activo que el ácido labdanólico contra bacterias Gram positivas, *B. subtilis* y *S. aureus*.
- El ácido labdanólico tiene un efecto oomiceticida a una concentración de 250 mg/ml.
- No se observó variación natural local de los componentes mayoritarios de los extractos hexánicos de flor de *E. cardiophyllum*.

IX. Conclusión

Los extractos de *E. arsenei*, *E. pulchellum* y *E. cardiophyllum* tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los microorganismos probados. El extracto hexánico de flor de *E. cardiophyllum* es el más activo y contiene dos componentes de tipo terpénico, el ácido catívico y el ácido labdanólico, responsables del efecto inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram positivas.

X. Literatura citada

1. Aguilera C. 1985. Flora y Fauna Mexicana. Mitología y tradiciones. En: Colección Raíces Mexicanas. Editorial Everest Mexicana, S. A. Pag. 101-155.
2. Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435: 824-827.
3. Amusant N., Moretti C., Richard B., Prost E., Nuzillard J. M., Thévenon M. F. 2007. Chemical compounds from *Eperua falcata* and *Eperua grandiflora* heartwood and their biological activities against wood destroying fungus (*Coriolus versicolor*). *Holz Roh und Werkstoff*, 65:23-28.
4. Andrews J.H., Harris R.F. 2000. The ecology and bioecography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*, 38:145-180.
5. Argueta, A., Cano, L., Rodarte, M., 1994. Tomo 1-3. Instituto Nacional Indigenista En: Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, México D.F. pp. 1786.
6. Avilés, M., Suárez G., Catálogo de Plantas Medicinales Jardín Etnobotánico Centro. 1994. INAH, Cuernavaca, Morelos, México, pp 47.
7. Borris R. P. 1996. Natural products research: perspectivas from a major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol.* 5:29-38.
8. Bremer K. 1994. Tribe Eupatorieae. En: *Asteraceae: Cladistics and classification*. Timber Press, Portland, Oregon. 23 chapter, 625-680 pp.
9. Caceres A., Menendez H., Mendez E., Cohobon E., Samatoa B.E., Jauregui E., Peralta E., Carrillo G. 1995. *Journal of Ethnopharmacology*. 48:85-88.
10. Carreras C.R., Rossomando P.C., Giordano O. S. Ent-labdanes in *Eupatorium buniifolium*. 1998. *Phytochemistry*. 48(6), 1031-1034.
11. Chiari E., Duarte D., Raslan D., Saude D., Perry K., Boaventura MA., Grande T., Stehmann J., Anjos A., Oliveira A. In Vitro Screening of Asteraceae plant species against *Tripanosoma cruzi*. 1996. *Phytother Res.* 10; 636-638.
12. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Reference Method for diffusion disk Susceptibility. CLSI document M2-A8.
13. Clavín M., Gorkzalczany S., Miño J., Martino V., Ferraro G., Acevedo C. 2002. Antinociceptive effect of some Argentine medicinal species of *Eupatorium*. *Phytotherapy Research*. 14:275-277.

14. Clavín M., Gorzalczany S., Miño J., Kandarian C., Martino V., Ferraro G., Acevedo C., 2000. Antinociceptive effect of some Argentine medicinal species of *Eupatorium*. *Phytotherapy Research*. 14, 275-277.
15. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). 2002. Primer Diagnóstico Nacional de Salud Ambiental y Ocupacional. www.cofepris.gob.mx
16. Cruz J.M, Domínguez J.M., Dominguez. H., Parajo J.C. 2001. Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. *J. Agric. Food Chem*. 49:2459-2464.
17. Damián Badillo Luz María. 2007. Tesis Doctoral "Efecto antifúngico y antioomiceto de los extractos de plantas medicinales de la región centro occidente de México". Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
18. Damián-Badillo Luz María, Salgado-Garciglia Rafael, Martínez-Muñoz Rosa Elisa, Martínez Pacheco Mauro Manuel. Antifungal Properties of Some Mexican Medicinal Plants. 2008. *The Open Natural Products Journal*. 1: 27-33.
19. Díaz Ramos R. 2006. Principales microorganismos causantes de enfermedades nosocomiales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48:105-112.
20. Dixon R.A. 2001. Natural Products and plant disease resistance. *Nature*. 411: 843-847.
21. Domingo D., López-Brea M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*. 16: 385-393.
22. Dubey R. K., Kumar R., Dubey N. K. 2007. Evaluation of the *Eupatorium cannabinum* Linn. oil in enhancement of shelf life of mango fruits from fungal rotting. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23: 467-473.
23. Duncan J.M. 1999. *Phytophthora* - an abiding threat to our crops. *Microbiology Today* 26: 114-116.
24. Editorial Committee of the Administration Bureau of Traditional Chinese Medicine. 1998. *Chinese Materia Médica (Zhonghua Benchao)*, Vol. 7. Shanghai Science and Technology Press, Shanghai. pp. 839-841.
25. El-Seedi H.R., Ohara T., Sata N., Nishiyama S. 2002. Antimicrobial diterpenoids from *Eupatorium glutinosum* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 81: 293-296.
26. Food and Agriculture Organization FAO 1997. Límites máximos del CODEX para residuos de plaguicidas. www.fao.org/waicent/faostat/Pest-Residue/pest-s.htm

27. Fernández, T., Cerda Zolezzi, P., Risco, E., Martino, V., López, P., Clavín M., Hnatyszyn, O., Cañigüeral, S., Hajos, S., Ferraro, G., Alvarez, E., 2002. Immunomodulating properties of Argentine plants with ethnomedicinal use. *Phytomedicine*, 9:546-552.
28. Ferraro G.E., Martino V.S., Cousio J. D. New flavonoids from *Eupatorium inulaefolium*. 1977. *Phytochemistry*. 16: 1618-1619.
29. Fewell A.M., Roddick J.G. 1993. Interactive antifungal activity of the glycoalkaloids a-solanine and a-chaconine. *Phytochemistry*. 33: 323-328.
30. Filipov A. Medicinal plants of the Pilagá of Central Chaco. 1994. *Journal of Ethnopharmacology* . 44: 181-193.
31. Fry W.E., Goodwin S.B. 1997. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Disease*. 81: 1349-1357.
32. Fuentes, M., Avilés, M. Informe Registro de las Plantas Medicinales Reportadas en el Estado de Morelos. 1997. Centro INAH, Cuernavaca, Morelos, México, pp 125.
33. Fukai T., Marumo A., Kaitou K., Kanda T., Tereda S., Nomura T. 2002. Antimicrobial activity of licorice flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*. 73: 536-539.
34. Funk, V. A., R. J. Bayer, S. Keeley, R. Chan, L. Watson, B. Gemeinhoizer, E. Schilling, J. L. Panero, B. G. Baldwin, N. García-Jacas, A. Susanna & R. K. Jansen. 2005. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biol. Skr.* 55: 343-374.
35. García G., Campos R., de Torres R., Broussalis A., Ferraro G., Martino V., Coussio J., 1990. Antiherpetic activity of Argentine medicinal plants. *Fitoterapia*, 6: 542-546.
36. Gerhardson B. 2002. Biological substitutes for pesticides. *Trends Biotechnology*. 20: 338 - 343.
37. Gershenzon, Jonathan., Dudareva, Natalia. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*.. 3: 408-414.
38. Gómez Caamaño J.L. 1990. En: Páginas de historia de la farmacia. Sociedad Nestlé A.E.P.A. (Ed.), Madrid. pag .29-229.
39. Greuter W., McNeill J., Barrie F.R., Burdet H.M., Demoulin V., Filgueiras T.S., Nicolson D.H., Silva P.C., Skog J.E., Trehane P., Turland N.J., Hawksworth D.L. 2000. International Code of Botanical Nomenclature (St. Louis Code), adopted by the Sixteenth International Botanical Congress, St. Louis, Missouri, July-August 1999. *Regnum Vegetabile* 138. Koeltz Scientific Books, Königstein.

40. Guerrero C., Campos G., Tabeada J. 1988. Estudio químico de *Eupatorium brevipes* y algunas actividades biológicas de la brevipenina. *Revista Latinoamericana de Química*. 19: 147-149.
41. Guilherme S., Gracas M., Andrade E., da Silva M., Luz A., da Silva J. 2002. Essential oils composition of *Eupatorium* species growing wild in the Amazon. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30:1071-1077.
42. Gupta M., Mazumder U.K., Chaudhuri I., Chaudhuri R.K., Bose P., Bhattacharya S., Manikandan L., Patra S. 2002. Antimicrobial activity of *Eupatorium ayapana* *Fitoterapia*, 73: 168-170.
43. Habtemariam, Solomon. 2001. Antiinflammatory activity of the antirheumatic herbal drug, gravel root (*Eupatorium purpureum*): Further biological activities and constituents. *Phytotherapy Research*.15: 687-690.
44. Huo J, Yang SP, Ding J, Yue JM. 2006. Two new cytotoxic sesquiterpenoids from *Eupatorium lindleyanum* DC. *Journal of Integrative Plant Biology*. 48: 473-477.
45. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 2007. El Sector Alimentario en México. Serie de Estadísticas Sectoriales.Insumos. Volumen de producción de fertilizantes, insecticidas y plaguicidas por tipo de producto del 2001 al 2006. (INEGI). www.onegi.org.mx
46. Inouye S., Uchida K., Abe S. 2006. Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 12: 210-216.
47. Iowa State University: Safe farm: promoting agricultural health and safety. 1995.
<http://www.cdc.gov/nasd/docs/d000001-d000100/d000045/d000045.html>
48. Katinas L., Gutiérrez D.G., Grossi M.A., Crisci J.V. 2007. Panorama de la Familia Asteraceae (= Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 42: 113 –129.
49. Kessler A., Baldwin I.T. 2001. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science*, 291: 2141-2144.
50. King R.M., Robinson H. 1970. The new synantherology. *Taxon*. 19: 6-11.
51. Klink B. 1997. Alternatives medicines: is natural really better? *Drug Top.*?? 141: 99-100.
52. Knudsen J.T., Eriksson R., Gershenzon J., Stahl B. 2006. Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review*. 72: 1-120.
53. Konradsen, F., Van der Hoek, W., Gunnell, D., Eddleston, M. 2005. Missing deaths from pesticide self-poisoning at IFCS Forum IV. *World Health Organization*, February, 85: 157-158.

54. Lang G., Passreiter C.M., Wright C.W., Filipowicz N.H., Addae-Kyereme J., Medinilla B.E., Castillo J.J. 2002. Zeitschrift fur Naturforsch C, 57:282-286.
55. Langenheim J.H. 1994. Higher plant terpenoids: a phytocentric overview of their ecological roles. Journal of Chemical Ecology, 20:1223-1280.
56. Lessing C. F. 1832. Synopsis Generum Compositarum. Duncker & Humblot, Berlin.
57. Lexa A., Fleurentin J., Lehr P.R., Mortier F., Pruvost M., Pelt J.M. 1989. Choleric and hepatoprotective properties of *Eupatorium cannabinum* in rats. Planta Medica. 55:127-132.
58. Liu K., Roeder E., Chen H. L., Xiu X. J. Pirrolizidine alkaloids from *Eupatorium fortunei*. 1992. Phytochemistry, 31(7); 2573-2574.
59. Luna A. 2004. Plantas medicinales mexicanas para tratar algunos dolores de cabeza. Tesina del Diplomado de Tlahui- Educa. Tlahui - Medic. No. 18, 11/2004. <http://www.tlahui.com/medic/medic18/planlun1.htm>
60. Madigan M.T., Martinko J.M., Parker Brock J. 2004. Control del Crecimiento Microbiano. En: Biología de los Microorganismos. Pearson Educación. S. A. Madrid, 2004 Prentice Hall, Décima edición, Capítulo 20, pp. 714 - 715.
61. Meepagala K.M., Sturtz G., Wedge D.E. 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia drancunculus* L. var. *drancunculus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 50: 6989-6992
62. Milosavljevic S., Tesevic V., Vuckovic I., Jadranin M., Vajs V., Sokovic M., Janackovic P., Jovanovic A. 2007. Composition and antifungal activity of essential oil of *Seseli annuum* wild-growing in Serbia. Fitoterapia. 78: 319-322.
63. Miskovsky P. 2002. Hypericin - A new antiviral and antitumor photosensitizer: Mechanism of action and interaction with biological macromolecules. Current in Drug Target. 3: 55-84.
64. Mittermeier R.A. 1988. Biodiversity En: Primate diversity and the tropical rain forest: case studies from Brazil and Madagascar and the importance of the megadiversity countries. E. O. Wilson, Ed. National Academy Press, Washington, D. C. pp. 145 – 154.
65. Mittermeier R.A., Goettsch C. 1992. La importancia de la diversidad biológica en México. En: México ante los retos de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. J. Sarukhán and R. Dirzo, Eds. pp 63 - 73
66. Monache G.D., Monache F.D., Becerra J., Silva M., Menichini F. 1984. Thymol derivatives from *Eupatorium glechonophyllum*. Phytochemistry. 23: 1947-1950.

67. Monroy, O. C., Castillo P. Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos. 2000. Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México, pp 400.
68. Morales-López ME., Martínez-Muñoz RE., Ron-Echeverría O., Rubio Morales NA., Martínez Pacheco MM., Salgado Garciglia R. 2007. Effect of bornyl-*O*-deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienate on growth of several pathogens. *Pharmacologyonline*. 3: 96-103.
69. Morrisey J.P., Osbourn A.E. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology Molecular and Biology Reviews*. 63: 708-724.
70. Motoo Tori, Yoshiko Takeichi, Hiroe Kuga, Katsuyuki Nakashima, Masakazu Sono. 2002. Seven Germacranolides, Eupaglehnins A, B, C, D, E and F, and 2 α -Acetoxyepitulipinolide from *Eupatorium glehni*. *Chem. Pharm. Bull.* 50: 1250-1254.
71. Muschietti L., Gorzalczany S., Ferraro G., Acevedo C., Martino V. 2001. Phenolic compounds with anti-inflammatory activity from *Eupatorium bunnifolium*. *Planta Médica*. 67: 743-744.
72. Muschietti L., Martino V., Ferraro G., Coussio J., 1990. Compuestos polifenólicos aislados de *Eupatorium buniifolium*. *Anales de la Asociación Química Argentina*, 78: 329.
73. Nasia Safdar, MD, y Dennis G. Maki, M.D. 2002. The Commonality of Risk Factors for Nosocomial Colonization and Infection with Antimicrobial - Resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus Gram - Negative Bacilli*, *Clostridium difficile*, and *Candida*. *Annals of Internal Medicine*. Volume 136, Number 11.
74. Navarro G.V.M., Gonzalez A., Fuentes M., Aviles M., Rios M.Y., Zepeda G., Rojas M.G. 2003. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 87: 85-88.
75. Nicolson K., Evans G., O'Toole P.W. 1999. Potentiation of methicillin activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by diterpenes. *FEMS Microbiology letters* 179:233-239.
76. Panero, J. L. & V. A. Funk. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 115: 909-922.
77. Paya M., Coussio J., Ferraro G., Martino V., Hnatyszyn O., Debenedetti S., Broussalis A., Muschietti L., Silla M., Vaya, E., Alcaraz M., 1996. Inhibitory effects of various extracts of Argentine species on free radical-mediated reactions and human neutrophil functions. *Phytotherapy Research*. 10: 228-232.

78. Pimentel D., Bellotti A.C. 1976. Parasite-host population systems and genetic stability. *The American Naturalist*. 110: 877-888.
79. Ramamoorthy T.P., Lorence D.H. 1987. Species vicariance in the Mexican flora and description of a new species of *Salvia* (Lamiaceae). *Bulletin du Muséum National d'Historie Naturelle (Paris)*. 9: 167 - 175.
80. Rios M.Y., Aguilar-Guadarrama A.B., Navarro V. 2003. Two new benzofuranes from *Eupatorium ascherbonianum* and their antimicrobial activity. *Planta Médica*. 69: 967-970.
81. Rios J., Condori L., Muñoz S., Loayza I., Soriano J. 1993. The extraction of the essential oil of romerillo. *Actes du colloque de Chicoutimi*. 111-117, 22 au 25 aout.
82. Rojas Acosta N., 1905. Plantas Medicinales de Corrientes. *Revista Farmacéutica*. 45: 115-145.
83. Rondina R., Bandoni A., Coussio J. 2003. Plantas Silvestres Argentinas con Reconocidas Propiedades Medicinales o Tóxicas. OEA-CYTED, Buenos Aires (CD-ROM).
84. Rzedowski J. 1978. Vegetación de México. Limusa Ed. México.
85. Rzedowski J. 1991. El endemismo en la flora fanerogámica de México: una aproximación analítica preliminar. *Acta Botánica Mexicana*. 15: 47 - 64.
86. Rzedowski J., Calderón de Rzedowski, G. 2005. Tribu Eupatorieae En: Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología A. C. Centro Regional del Bajío, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad., pp. 781-800.
87. Sadhu S.K., Hirata K., Li X., Ohtsuki T., Koyano T., Preeprame S., Kowithayakorn T., Ishibashi M. 2006. Flavonoids and sesquiterpenoids, constituents from *Eupatorium capillifolium*, found in a screening study guided by cell growth inhibitory activity. *Journal of Natural Medicine*. 60:325-328.
88. Sanabria-Galindo A., Arciniegas N. y Suárez I. 1999. Timol y Carvacrol como sustancias responsables de la actividad antimicrobiana de *Ageratina ibaguensis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico – Farmacéuticas*. 281: 83-88.
89. Sandiumenge A., Díaz E., Rodríguez A., Vidaur L., Canadell L., Olona M., Rue, Rello J. 2006. Impact of diversity of antibiotic use on the development of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57: 1197-1204.
90. Sasikumar J.M., Pichai Anthoni Doss A., Doss A. 2005. Antibacterial activity of *Eupatorium glandulosum* leaves. *Fitoterapia*. 70: 240-243.
91. Schultes, R. E. The Kingdom of plants. En: Thomson, W. A.E. (Ed.). *Medicines from the Earth*. McGraw- Hill Book Co., New York 1978; 208.

92. Secretaria de Salud (SS). 2006. Intoxicación por plaguicidas. *Epidemiología*, 14: 1-4.
93. Sharma O.P., Dawra R.K., Kurunda N.P., Sharma P.D. 1998. Isolation of a compound from *Eupatorium adenophorum* (Spreng) causing hepatotoxicity in mice. *Natural Toxins*. 6: 1-14.
94. Shen Y. C., Lo K. L., Kuo Y. H., Khalil A. T. 2005. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Eupatorium kiirunense*, a coastal plant of Taiwán. *J. Nat. Prod.* 68: 745.
95. Solis M.A. 1992. *Plantas Medicinales del Ecuador*. Abya-Ayala Ed, Quito, p. 80.
96. Toledo V.M. 1988. La diversidad biológica de México. *Ciencia y Desarrollo* 81: 17 - 30.
97. Tori M., Ohara Y., Nakashima K., Sono M. 2001. Thymol derivatives from *Eupatorium fortunei*. *J. Nat. Prod.* 64: 1048-1051.
98. Tripathi P., Dubey N.K., Banerji R., Chansouria J.P.N. 2004. Evaluation of some essential oils as botanical fungitoxicants in management of post-harvest rotting of citrus fruits. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20: 317-321.
99. Tripathi P., Dubey N.K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 32: 235-245.
100. Urzua A., Caroli M., Vasquez L., Mendoza L., Wilkens M., Tojo E. 1998. Antimicrobial study of the resinous exudate and of diterpenoids isolated from *Eupatorium salvia* (Asteraceae). *Journal Ethnopharmacology*. 62: 251-254.
101. Usher G. *A dictionary of plants used by man*. 1974. Constable, ISBN 0094579202
102. Varma J., Dubey N.K. 1999. Prospectives of botanicals and microbial products as pesticides of tomorrow. *Current Science*. 72: 172-179.
103. Verpoorte R. 2000. Pharmacognosy in the new millennium: leandfinding and biotechnology. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 52: 253-262
104. Villaseñor J.L., Ibarra G., Ocaña D. 1997. Strategies for the conservation of Asteraceae in México. *Conservation Biology*. 12: 1066 – 1075.
105. Wain R.L. 1977. Chemical aspect of plant disease resistance in natural products and the protection of plants. En: *Natural products and protection of plants*. Marini Bettola GB (ed), Elsevier Eds. pp 483-499.
106. Wang Ming-Zhong, Zhang Yan-Yan, Li Shun-Lin, Cai Xiang-Hai, Luo Xiao-Dong. Cadinene Derivatives from *Eupatorium adenophorum*. *Helvetica Chimica Acta*. 2006, 89 (12); 3104-3108.

107. Yildirim A., Mavi A., Oktay M., Kara A.A., Algur O.F., Bilaloglu V. 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf ex DC), sage (*Salvia trilobal*) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. Journal of Agricultural and Food Chememistry. 48: 5030- 5034.
108. Zardini EM. 1984. Etnobotánica de *Compuestas* Argentinas con Especial Referencia a su Uso Farmacológico (Primera parte). Acta Farmacéutica Bonaerense. 3: 77-99.
109. Zin, J., Weiss, C., 1980. La Salud por Medio de las Plantas Medicinales. Editorial Salesiana, Santiago de Chile. p. 130.
110. Zhang Man-Li, Wu Ming, Zhang Jian-Jian, Irwin Dianne, Gu Yu-Cheng, Shi Qing- Wen. 2008. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Eupatorium*. Chemistry and Biodiveristy. 5: 40-55.
111. Zurita J., Márquez C., Espinoza Y., Vargas A. C. 2005. Infecciones por *Staphylococcus aureus* oxacilino-resistentes provenientes de la comunidad en un hospital de Quito. Revista Médica Vozandes. 16: 46-51.
112. Zygodlo J.A., Lamarque N.R., Grosso N.R., Ariza Espinar L., 1995. Analysis of the essential oil of the leaves of *Eupatorium arnottianum* Griseb. Journal of Essential Oil Research. 7: 677-678.

XI. Anexos

Cuadro 20. Resumen del efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento bacteriano.

Parte de la planta	Aislados bacterianos												
	B. s	C.f	E.clo	E.c	K.p	P. m	P.v	P.a	S.sp	S.so	S.a	S.e	S.s
H ¹	bc bt	neg	neg	neg	neg	bt	neg	neg	neg	neg	bc	bt	neg
F ¹	bc bt	neg	neg	neg	bt	neg	bc	bc	neg	bt	bc	bt	bc
T ¹	bc bt	bt	neg	bt	bt	neg	neg	bc	neg	neg	bc bt	bt	bc
R ¹	bc	bc	bc	bc	bc	bc	neg	bc	bc	neg	bc	bc	bc
H ²	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	bt	neg	neg	neg	neg	neg
F ²	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	bt	neg	neg	neg	bt	neg
T ²	bt	neg	neg	neg	neg	neg	neg	bt	neg	neg	neg	neg	neg
R ²	bt	neg	neg	neg	neg	neg	neg	bt	neg	neg	neg	neg	neg
H ³	bt	neg	neg	neg	neg	neg	neg	bt	neg	neg	neg	neg	neg
F ³	bt	neg	neg	neg	neg	neg	neg	bt	neg	neg	neg	neg	neg
T ³	bt	neg	neg	neg	neg	neg	neg	bt	neg	neg	neg	neg	neg
R ³	bt	neg	neg	neg	neg	neg	neg	bt	neg	neg	neg	neg	neg

1 = Hexano
 2 = Cloruro de metileno
 3 = Metanol
 H = hoja, F = flor, R = raíz y T = tallo
 bc = bactericida
 bt = bacteriostático
 neg = No se observó inhibición del crecimiento bacteriano

B.s = *Bacillus subtilis*.
 S.sp = *Salmonella sp.*
 E.clo = *Enterobacter cloacae*.
 E.c = *Escherichia coli*.
 K.p = *Klebsiella pneumoniae*.
 P.m = *Proteus mirabilis*
 S.s = *S. saprophyticus*
 P.a = *Pseudomonas aeruginosa*
 C.f = *Citrobacter freundii*.
 P.v = *P. vulgaris*
 S.so = *Shigella sonnei*
 S.a = *Staphylococcus aureus*
 S. e = *S. epidermidis*

Cuadro 21. Resumen del efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de hongos filamentosos.

Hongo	Índice de Crecimiento (IC)	
	3 días	6 días
<i>Rhizoctonia</i> sp.	0.56	0.64
<i>C. acutatum</i>	0.71	0.79
<i>F. oxysporum</i>	0.64	0.73
Tipo de disolvente		
Hexano	0.46	0.65
Cloruro de metileno	0.65	0.72
Metanol	0.80	0.78
Parte de la planta		
Flor	0.63	0.69
Hoja	0.67	0.79
Tallo	0.67	0.78
Raíz	0.93	0.94

Cuadro 22. Resumen del efecto de los extractos totales de *E. cardiophyllum* sobre el crecimiento de oomicetos.

Oomiceto	Índice de Crecimiento (IC)		
	2 días	3 días	4 días
<i>P. cactorum</i>	0.36	0.42	0.48
<i>P. capsici</i>	0.50	0.62	0.63
<i>P. cinnamomi</i>	0.44	0.55	0.55
Tipo de disolvente			
Hexano	0.41	0.40	0.39
Cloruro de metileno	0.33	0.49	0.54
Metanol	0.56	0.70	0.73
Parte de la planta			
Hoja	0.09	0.23	0.28
Flor	0.17	0.29	0.30
Tallo	0.06	0.21	0.29
Raíz	0.83	0.91	0.92

