



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**



**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**EFFECTO *in vitro* DE CUATRO ESPECIES DE PLANTAS SILVESTRES  
SOBRE MICROORGANISMOS CAUSANTES DE INFECCIONES  
GASTROINTESTINALES.**

**POR:**

**GUADALUPE HORTENCIA RODRIGUEZ PEREZ**

**TESIS PROFESIONAL**

Para obtener el título de:

**LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**ASESORADA POR: M. EN C. NORMA CECILIA CARDENAS ORTEGA  
COASESORAS: M. EN C. YOLANDA JASSO PINEDA  
Q.F.B. MA. GUADALUPE YASMIN DIAZ RUIZ**

**EX LIBRIS**



**SISTEMA DE  
BIBLIOTECAS  
U.A.S.L.P.  
Nº DE REG.**



## APROBACION DE TEMA DE TESIS

**SRITA. GUADALUPE HORTENCIA RODRÍGUEZ PÉREZ  
P R E S E N T E:**

Por este conducto me permito informar a USTED que el H. Consejo Técnico Consultivo de esta Facultad de Ciencias Químicas, en sesión ordinaria de fecha 22 DE JUNIO DEL 2001, tuvo a bien aprobar el tema de su tesis profesional titulada: "**EFECTO *in vitro* DE CUATRO ESPECIES DE PLANTAS SILVESTRES SOBRE MICROORGANISMOS CAUSANTES DE INFECCIONES GASTROINTESTINALES**", mismo que será asesorado por MC. NORMA CECILIA CÁRDENAS ORTEGA y coasesorada por MC. YOLANDA JASSO PINEDA y QFB. MA. GUADALUPE YAZMÍN DIAZ RUIZ, para la presentación de su examen profesional de **Químico Farmacobiólogo**.

Sin más por el momento queda de usted.

*Atentamente*



ING. ROGELIO A. COLUNGA REYNA  
SECRETARIO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

## DEDICATORIAS

Con gratitud, amor y respeto a las personas que me dieron la vida, mis padres las Sra. Hortencia Pérez de Rodríguez y el Sr. Nicolás Rodríguez Lara, de quienes en todo momento he recibido su apoyo, comprensión y su gran amor de padres.

Con cariño a mis hermanos Nicolás, Gerardo, Francisco, Guillermo, Eduardo y Rosario Rodríguez Pérez por todo su amor, apoyo y consejos que siempre me han brindado.

A mis sobrinos Irma, Carlos, Ariadna, Paco, Wendy y José Manuel por estar presentes en mi vida y por el cariño y confianza que siempre han depositado en mí.

2.7.1.3 Variación.....	15
2.7.1.4 Epidemiología.....	15
2.7.1.5 Patogenicidad.....	16
2.7.1.6 Patología y manifestaciones clínicas.....	16
2.7.1.7 Diagnóstico.....	16
2.7.1.8 Tratamiento.....	18
2.7.2 <i>Shigella</i> .....	18
2.7.2.1 Morfología e identificación.....	18
2.7.2.2 Epidemiología.....	18
2.7.2.3 Patogenicidad.....	18
2.7.2.4 Patología y manifestaciones clínicas.....	19
2.7.2.5 Diagnóstico.....	19
2.7.2.6 Tratamiento.....	19
2.8 <i>Escherichia coli</i> no patógena.....	19
2.9 Plantas medicinales.....	20
2.9.1 Plantas utilizadas en la región para trastornos gastrointestinales.....	21
2.10 Especies vegetales en estudio.....	21
2.10.1 <i>Dyssodia setifolia</i> (Lag.) Rab.....	21
2.10.1.1 Descripción botánica.....	21
2.10.1.2 Usos.....	22
2.10.1.3 Estudios.....	22
2.10.2 <i>Haplopappus spinulosus</i> (Pursh)DC.....	22
2.10.2.1 Descripción botánica.....	22
2.10.2.2 Usos.....	22
2.10.2.3 Estudios.....	23
2.10.3 <i>Parthenium hysterophorus</i> L.....	23
2.10.3.1 Descripción botánica.....	23
2.10.3.2 Usos.....	23
2.10.3.3 Estudios.....	23
2.10.4 <i>Sanvitalia procumbens</i> Lam.....	24
2.10.4.1 Descripción botánica.....	24
2.10.4.2 Usos.....	24
2.10.4.3 Estudios.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1 Recolección de las especies vegetales.....	26
4.2 Preparación de extractos vegetales.....	26
4.3 Estudio fitoquímico preliminar.....	27
4.3.1 Reacciones de coloración y precipitación.....	27
4.3.2 Cromatografía en capa fina (CCF).....	27
4.3.2.1 Carbohidratos.....	28
4.3.2.2 Flavonoides.....	28
4.3.2.3 Alcaloides.....	28
4.3.2.4 Lactonas sesquiterpénicas.....	28
4.3.2.5 Quinonas.....	28
4.3.2.6. Cumarinas.....	29
4.3.2.7 Esteroles.....	29
4.3.2.8 Terpenos.....	29
4.4 Evaluación de la actividad amebicida.....	29

4.4.1 Estudio preliminar.....	29
4.4.2 Actividad amebicida.....	30
4.4.3 Criterios de evaluación.....	31
4.4.4 Estandarización del inóculo de trofozoitos.....	31
4.4.5 Diseño experimental.....	32
4.5 Evaluación de la actividad antibacterial.....	33
4.5.1 Identificación bioquímica de las bacterias en estudio.....	33
4.5.2 Estandarización de las bacterias en estudio.....	33
4.5.3 Validación de la actividad antibacterial de los extractos.....	33
4.5.4 Diseño experimental.....	35
4.6 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).....	35
4.6.1 Criterio de evaluación.....	36
4.6.2 Diseño experimental.....	36
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
5.1 Estudio fitoquímico preliminar.....	37
5.2 Evaluación de la actividad amebicida.....	38
5.2.1 Estudio preliminar.....	38
5.2.2 Actividad amebicida.....	40
5.3 Evaluación de la actividad antibacterial.....	44
5.4 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).....	49
6. CONCLUSIONES.....	52
7. RECOMENDACIONES.....	53
8. GLOSARIO.....	54
9. BIBLIOGRAFÍA.....	58
10. ANEXO I.....	63
11. ANEXO II.....	71
12. ANEXO III.....	77
13. ANEXO IV.....	78
14. ANEXO V.....	82
15. ANEXO VI.....	84

## ÍNDICE DE CUADROS

		<b>Página</b>
Cuadro 1	Identificación presuntiva rápida de bacterias entéricas gramnegativas. ....	12
Cuadro 2	Número total de trofozoitos/ml contados en cámara de Neubauer.....	32
Cuadro 3	Identificación bioquímica experimental de las bacterias en estudio.....	34
Cuadro 4	Estudio fitoquímico preliminar de los extractos acuosos y etanólicos de <i>D. setifolia</i> , <i>H. spinulosus</i> , <i>P. hysterophorus</i> y <i>S. procumbens</i> .....	38
Cuadro 5	Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad amebicida para las tres aplicaciones sucesivas de tratamiento.....	40
Cuadro 6	Mortalidad media en porcentaje de trofozoitos de <i>E. histolytica</i> causada por los extractos acuosos de las cuatro especies vegetales en tres aplicaciones sucesivas.....	41
Cuadro 7	Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad antibacterial de las especies vegetales sobre Enterobacterias.....	45
Cuadro 8	Inhibición del desarrollo (cm) en los cultivos de Enterobacterias por efecto de los extractos acuosos y etanólicos de las especies vegetales en estudio.....	48
Cuadro 9	Concentración mínima bactericida (mg de planta seca/ml de sustrato) de los extractos etanólicos de las cuatro especies vegetales del Altiplano Potosino.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Ciclo vital de <i>Entamoeba histolytica</i> .....	6
Figura 2	Mecanismo de infección de <i>Salmonella</i> .....	17
Figura 3	Actividad amebicida <i>in vitro</i> del etanol sobre <i>Entamoeba histolytica</i> (40x).....	39
Figura 4	Actividad amebicida <i>in vitro</i> sobre <i>Entamoeba histolytica</i> (40x).....	42
Figura 5	Actividad antibacterial <i>in vitro</i> de los extractos vegetales acuosos sobre Enterobacterias.....	46
Figura 6	Actividad antibacterial <i>in vitro</i> de los extractos vegetales etanólicos sobre Enterobacterias.....	47
Figura 7	Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).....	50

## RESUMEN

En la etiología del extenso grupo de enfermedades conocidas como diarreas infecciosas intervienen numerosos agentes parasitarios y bacterianos. Como una alternativa terapéutica para este tipo de infecciones, se encuentran las plantas medicinales que, debido a sus propiedades curativas han sido ampliamente utilizadas, especialmente por aquellas comunidades de escasos recursos y que además carecen de seguridad social. Por ello, en este trabajo se realizó un estudio fitoquímico preliminar de los extractos acuosos y etanólicos de *Dyssodia setifolia* (Lag) Rab., *Haplopappus spinulosus* (Pursh.) D.C., *Parthenium hysterophorus* L. y *Sanvitalia procumbens* Lam., se evaluó el efecto amebicida *in vitro* de los extractos acuosos de las especies vegetales sobre los trofozoitos de *Entamoeba histolytica* con base a un diseño experimental, longitudinal y prospectivo completamente al azar, los resultados de la mortalidad de trofozoitos en porcentaje se normalizaron mediante la transformación del arcoseno y se sometieron a un ANOVA y Tukey ( $\alpha=0.05$ ), así como la evaluación de la actividad antibacterial *in vitro* de los extractos acuosos y etanólicos de estas especies vegetales sobre las enterobacterias *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* y *Escherichia coli* no patógena en donde se realizó el mismo diseño en forma transversal y prospectiva, los resultados se analizaron mediante un ANOVA y Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Por último se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos vegetales activos. En el estudio fitoquímico preliminar se detectó la presencia de carbohidratos y flavonoides en los extractos acuosos y etanólicos de las cuatro especies vegetales, pectinas y taninos en los extractos acuosos de los mismos, alcaloides en los extractos etanólicos de *H. spinulosus*, *P. hysterophorus* y *S. procumbens* y lactonas sesquiterpénicas en el extracto etanólico de *P. hysterophorus*. Las cuatro especies evaluadas presentaron efecto amebicida, pero los mejores tratamientos fueron los extractos acuosos de *H. spinulosus* y *P. hysterophorus* con un 100 % de mortalidad de trofozoitos de *E. histolytica* (porcentaje similar al fármaco de acción intraluminal diiodohidroxiquinoleína); las cuatro plantas manifestaron actividad bactericida, el mejor tratamiento fue el extracto etanólico de *P. hysterophorus*, en donde se obtuvieron las siguientes CMB: para *S. enteritidis* 312.5 mg/ml, para *S. typhi* y *Sh. sonnei* 250 mg/ml y para *Sh. boydii* 187.5 mg/ml; ningún extracto manifestó actividad sobre *E. coli* no patógena.



## ABSTRACT

In the etiology of the extensive group of diseases known as infectious diarrheas numerous parasitological and bacterial agents intervene. As a therapeutic alternative for this type of infections, there are the medicinal plants that, due to its curative properties have been widely used, specially for those communities of scanty resources and that besides lack social safety. For it, in this work was realized a preliminary study of the phytochemistry of the water and ethanol extracts of *Dyssodia setifolia* (Lag) Rab., *Haplopappus spinulosus* (Pursh.) D.C., *Parthenium hysterophorus* L. and *Sanvitalia procumbens* Lam., the amebicidal effect *in vitro* was evaluated of the water extracts of the vegetable species against *Entamoeba histolytica* trophozoites with base to an experimental, longitudinal and prospecting completely at random, the outcomes of the mortality of trophozoites in percentage settled down by means of the transformation of the arcoseno and surrendered to an ANOVA and Tukey ( $\alpha=0.05$ ), as well as the evaluation of the antibacterial activity *in vitro* of the water and ethanol extracts of these vegetable species on the enterobacterias *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* and not pathogenic *Escherichia coli* in where the same design was realized in transverse and prospecting form, the outcomes were analyzed by means of an ANOVA and Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Finally there decided the minimal bactericidal concentration (MBC) of the vegetable active extracts. In the phytochemistry analysis was detected the presence of carbohydrates and flavonoid in the water and ethanol extracts of all four vegetable species, pectins and tannins in the water extracts, alkaloids in the ethanol extracts of *H. spinulosus*, *P. hysterophorus* and *S. procumbens* and sesquiterpene lactone in the ethanol extract of *P. hysterophorus*. All four evaluated species presented amebicidal effect, but the best treatments were the water extracts of *H. spinulosus* and *P. hysterophorus* with 100 % of mortality of trophozoites of *E. histolytica* (similar percentage to the medicament of intraluminal action diiodohidroxiquinoleína); all four plants demonstrated bactericidal activity, the best treatment was the ethanol extract of *P. hysterophorus*, in where the following MBC was obtained: for *S. enteritidis* 312.5 mg/ml, for *S. typhi* and *Sh. sonnei* 250 mg/ml and for *Sh. boydii* 187.5 mg/ml; no extract demonstrated activity on not pathogenic *E. coli*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones gastrointestinales ocupan uno de los primeros lugares de mortalidad en nuestro país y afectan principalmente a niños y ancianos. En el mercado existe una serie de antiparasitarios y antibacterianos altamente efectivos contra los agentes causales, pero su costo suele ser elevado y de complicada adquisición para gran parte de los pacientes que se encuentran dentro de un nivel socioeconómico bajo y sin acceso a los servicios básicos de salud, para quienes es mucho más fácil recurrir al uso de plantas comunes en su entorno, aunque la mayoría de ellas no cuentan con registros que avalen sus propiedades farmacológicas.

Dentro de este contexto, el presente trabajo abordará la investigación sobre la actividad amebicida y antibacterial *in vitro* de cuatro plantas regionales utilizadas para trastornos gastrointestinales, capaces de constituir una alternativa terapéutica en este tipo de infecciones. Es importante ofrecer una opción mediante el uso de especies vegetales, ya que el potencial que éstas presentan como fuente de compuestos con actividad farmacológica tiene perspectivas muy importantes, y son un recurso de fácil obtención y aplicación, que si se utiliza adecuadamente sus resultados podrían ser muy favorables.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Enfermedades gastrointestinales

Las enfermedades gastrointestinales abarcan una amplia variedad de complejos sintomáticos y agentes infecciosos conocidos. La gastroenteritis infecciosa es una de las principales enfermedades en el mundo, manifestada principalmente por episodios de diarrea (habitualmente relacionados con una infección no inflamatoria del intestino delgado o una infección inflamatoria del colon) (Mandell y Col., 1997), las cuales por lo general son de evolución autolimitada y responden regularmente a un tratamiento sintomático, sin embargo en ocasiones pueden complicarse llevando a una deshidratación grave, choque hipovolémico, desequilibrio hidroeléctrico y sepsis, requiriendo así el uso de soluciones parenterales y antibióticos que actúen contra los agentes causales (Macías, 1998).

Aunque su distribución es mundial, predominan claramente en los países subdesarrollados. En México estadísticas recientes, demuestran que este tipo de enfermedades ocupan el segundo lugar como causa de muerte en niños (Escobedo y Col., 2000), mientras que en el estado de San Luis Potosí ocupan el cuarto lugar (SEED, 2000).

El factor socioeconómico tiene un papel importante en la incidencia de este padecimiento ya que esto conlleva en ocasiones a la carencia de agua potable, deficiencias en los servicios sanitarios, contaminación del ambiente e ignorancia sobre la higiene personal y de alimentos, lo que conduce a un aumento de transmisión de patógenos por vía fecal-oral (Macías, 1998), evitándose mediante el uso de medidas preventivas como el lavado frecuente de manos, el empleo de agua limpia y el uso de métodos apropiados para cocinar alimentos (Kretschmer, 1994).

### 2.2 Factores del huésped

Después de la exposición a los agentes infecciosos, la presencia o ausencia de enfermedad depende de los diversos factores del huésped. Existen varios mecanismos entéricos de defensa del huésped capaces de conferir protección contra numerosos patógenos intestinales, estos son: especie, genotipo y edad del huésped, higiene personal, acidez gástrica, motilidad intestinal, microflora entérica, inmunidad, factores protectores inespecíficos y receptores intestinales (Mandell y Col., 1997).

### 2.3 Etiología

En la etiología del extenso grupo de enfermedades gastrointestinales intervienen numerosos agentes infecciosos como son parásitos, bacterias y virus (Olarde, 1992).

## 2.4 Definición de diarrea

La diarrea es el paso de heces líquidas y se produce cuando aumenta la velocidad del movimiento del contenido intestinal, de tal forma que la digestión y la absorción completa de líquidos en el intestino no se producen. El volumen de heces suele estar considerablemente aumentado en la diarrea, lo que causa un incremento en la frecuencia de las evacuaciones así como un aumento en la pérdida de agua y electrolitos (Chandrasoma y Taylor, 1998) y puede ir o no acompañada de dolor, debilidad, náuseas, vómitos, espasmos abdominales, fiebre o pérdida de apetito (Anónimo b, 2000).

### 2.4.1 Clasificación de la diarrea

La diarrea puede clasificarse como aguda o crónica (Anónimo a, 1998).

- a) Diarrea aguda. Se refiere a una alteración súbita en los hábitos intestinales normales; está caracterizada por evacuaciones múltiples y frecuentes de consistencia blanda o acuosa, es de aparición repentina y suele durar uno o dos días, lo mismo con tratamiento que sin él. Este tipo de diarrea puede clasificarse a su vez desde el punto de vista clínico y fisiopatológico como no inflamatoria o inflamatoria (Grendell y Col., 1997).
  - Diarrea no inflamatoria. Es causada por microorganismos o sustancias que no producen rotura ni daño del epitelio intestinal. Las enterotoxinas producidas por microorganismos infectantes estimulan la secreción intestinal excesiva de iones y agua. Las manifestaciones clínicas fundamentales de la diarrea infecciosa no inflamatoria son: evacuaciones acuosas de volumen grande con cantidad mínima de sangre o sin esta, dolor abdominal superior o paraumbilical y posible náusea o vómito. El sitio que resulta más afectado es el intestino delgado y en el examen de las evacuaciones habrá ausencia de leucocitos fecales. Los microorganismos que causan este tipo de diarrea son el rotavirus, citomegalovirus, *Salmonella* no tifoídica, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clstridium perfringens* y *Giardia lamblia*, aunque también puede ser inducida por medicamentos como antiácidos, antibióticos y laxantes (Grendell y Col., 1997).
  - Diarrea inflamatoria. Es causada por microorganismos o sustancias que rompen la barrera de la mucosa intestinal por medio de la invasión directa o elaboración de citotoxinas. La rotura de la mucosa produce exudación de células inflamatorias y sangre al interior de la luz intestinal. Los hallazgos clínicos se caracterizan por evacuaciones sanguinolentas de volumen reducido, a menudo se presenta fiebre, cólicos abdominales inferiores y tenesmo. El sitio de afectación intestinal preferentemente es el colon, y el examen de una muestra de evacuaciones revelará múltiples leucocitos fecales y eritrocitos. Los patógenos que causan este tipo de diarrea son las especies de *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Escherichia coli* enteropatógena y *Entamoeba histolytica* (Grendell y Col, 1997).

- b) **Diarrea crónica.** Este tipo de diarrea es menos frecuente que la aguda, aparece de forma repentina, continuando durante semanas o meses, la cual parece disminuir pero no desaparece, suele ser resultado de muchos factores y a veces es síntoma de un trastorno más importante, que puede tener su origen en diversos factores y se caracteriza por un frecuente y anormal movimiento intestinal, que da como resultado la evacuación de heces líquidas y sin forma. El proceso diarreico crónico suele ser grave si llega a interferir con la absorción de nutrientes esenciales o si lleva a una deshidratación y desequilibrio del organismo. Las causas por las que puede acontecer un cuadro de diarrea crónica son: sensibilidad o alergia a algún alimento, estrés, efectos secundarios frente a algún medicamento, abuso de laxantes y enfermedades de base (síndrome de colon irritable, síndrome de malabsorción, infecciones intestinales, enfermedades inflamatorias del intestino y SIDA). Los signos y síntomas que se presentan son movimientos intestinales y evacuación frecuente, náuseas, espasmos, fatiga, fiebre y pérdida de peso (Anónimo b, 2000).

## **2.5 Definición de disentería**

La disentería (bacilar o amibiana) es un tipo específico de diarrea que se caracteriza por el paso de cantidades pequeñas de sangre de color rojo brillante y de moco a intervalos frecuentes y se acompaña de tenesmo, además el volumen de las heces suele ser reducido. La disentería es el síntoma característico de la inflamación cólica aguda, que se da cuando el recto está inflamado (Chandrasoma y Taylor, 1998).

## **2.6 Principales microorganismos patógenos**

### **2.6.1 Parásitos**

Dentro de las infecciones producidas por parásitos, la amibiasis que provoca *Entamoeba histolytica* es una de las más importantes para el hombre y sus manifestaciones pueden variar, desde portadores asintomáticos a enfermedad de grado variable (Biagi, 1992).

#### **2.6.1.1 Aspectos generales**

*E. histolytica* es un protozoo que pertenece al filium *Sarcomastigophora*, clase *Rhizopodea*, orden *Amoebida*, familia *Endamoebidae* y género *Entamoeba* (Botero, 1998), género al que pertenecen también otros parásitos no patógenos para los humanos (Netter, 1985), pero incluye a todas las amibas que, a diferencia de los flagelados no poseen película conservadora de la forma, sino que la superficie de su cuerpo está cubierta por una membrana de plasma extremadamente flexible que permite al citoplasma fluir en todas direcciones, dando lugar a alteraciones constantes del contorno del cuerpo llamadas

pseudópodos, cuya función es permitir que la amiba se desplace y capture su alimento (Cheng, 1978).

### **2.6.1.2 Biología de la amibiasis intestinal**

*E. histolytica* existe en el colon en dos formas: trofozoito o forma móvil y quiste o forma inmóvil.

Los trofozoitos (forma parasitaria) miden de 20 a 50  $\mu\text{m}$ , tienen motilidad orientable, presentan ectoplasma claro y bien delimitado con pseudópodos delgados digitiformes y endoplasma finamente granuloso, con núcleo excéntrico y un cariosoma central puntiforme. Generalmente habitan en el lumen, pared o en ambos lugares del colon, se multiplican por fisión binaria, crecen en condiciones anaerobias y requieren de la presencia de bacterias o de sustratos tisulares para sus requerimientos nutritivos. Cuando hay diarrea o disentería, los trofozoitos son expulsados en el contenido fecal y llegan a presentar eritrocitos fagocitados, lo cual es característico de la amibiasis (Atías, 1999).

Los quistes (forma infectante) predominan en las deposiciones de portadores asintomáticos o de formas leves de la enfermedad. Su tamaño varía de 5 a 20  $\mu\text{m}$ . Las formas quísticas iniciales o prequistes contienen barras cromatoidales, vacuola yodófila y un solo núcleo, el cual se divide por fisión binaria para formar el quiste maduro tetranucleado que sale en las evacuaciones. Estos quistes sobreviven fuera del hospedero por días o semanas, especialmente si la temperatura y humedad son bajas (Atías, 1999).

El ciclo vital de *E. histolytica* comienza con la ingestión de quistes maduros (con 4 núcleos) provenientes de alimentos y bebidas contaminados. Una vez que alcanzan la parte inferior del intestino delgado, la membrana quística se desgasta y por el punto de menor resistencia se produce un desgarre (exquistación), permitiendo que de cada núcleo y citoplasma acompañante se desarrollen trofozoitos jóvenes y maduros que, dependiendo de factores como la patogenicidad de la amiba y la resistencia del huésped se multiplican en la luz intestinal e invaden la mucosa del colon y diversos tejidos, para después morir al eliminarse por las heces. En caso contrario, si las condiciones no le son favorables, los quistes pasan a la forma prequística (con un solo núcleo), los cuales se dividen por fisión binaria para formar quistes maduros tetranucleados, que son expulsados hacia el exterior creando el foco de infección (Figura 1) (Netter, 1985).

### **2.6.1.3 Epidemiología**

El hombre es el principal hospedero y reservorio de *E. histolytica*. Los trofozoitos mueren rápidamente fuera del intestino y no tienen importancia en la diseminación de la infección, pero los quistes son capaces de resistir la cloración del agua y las condiciones ambientales; se eliminan del agua por filtración y se destruyen por cocción (Atías, 1999).

Las formas más frecuentes de transmisión son la contaminación de alimentos y la transmisión de persona a persona, en donde el mayor riesgo está asociado con los

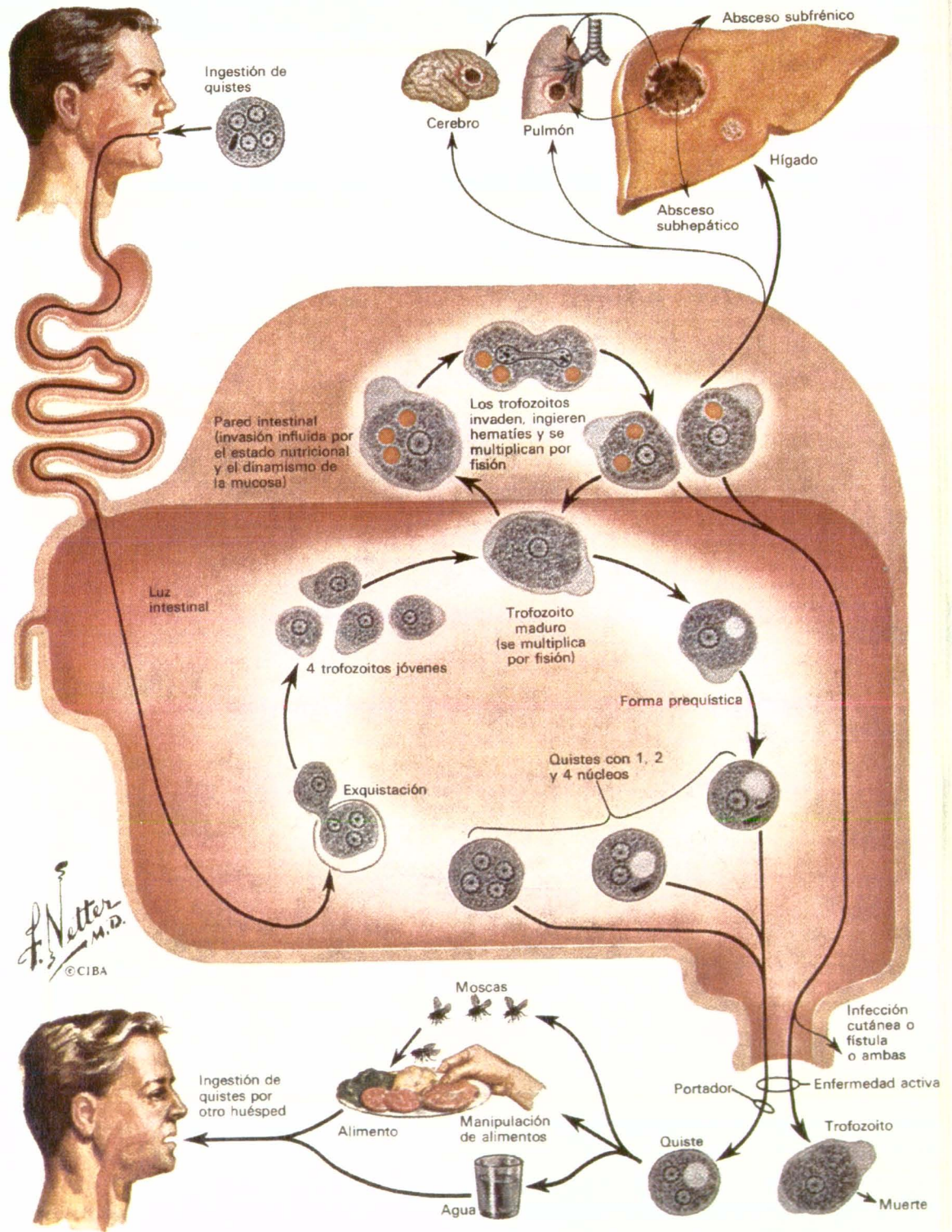


Figura 1. Ciclo vital de *Entamoeba histolytica*.

portadores asintomáticos de quistes. Otros factores determinantes en la transmisión son la forma en que se eliminan las excretas humanas en una comunidad, la contaminación fecal de las manos por falta de higiene y la contaminación del agua a través del fecalismo, en donde el viento lleva las heces hacia ríos, arroyos, o depósitos de agua mal protegidos (Martínez, 1989).

#### **2.6.1.4 Patología**

Las lesiones producidas por este parásito están localizadas principalmente en el intestino grueso, el delgado raramente se afecta y solamente en la porción del íleon. A través de la corriente sanguínea, las amibas pueden ser llevadas a hígado, pulmón y cerebro, pero no a piel, en donde la invasión se da por contigüedad, drenaje de los abscesos de hígado y lesiones rectales o anales.

Las primeras lesiones en la mucosa consisten en áreas edematosas del tamaño de la cabeza de un alfiler, o bien pequeñas pápulas amarillas, mismas que se convierten en úlceras, que contienen trofozoitos móviles en un tejido necrótico viscoso. Las reacciones inflamatorias alrededor de las úlceras son el resultado de una invasión bacteriana secundaria (Netter, 1985).

#### **2.6.1.5 Patogenicidad**

Las amibas se desarrollan en un medio con tensión de oxígeno muy bajo, por ello su desarrollo fundamentalmente se lleva a cabo en el colon, ya que posee los niveles de óxido-reducción más bajos de todo el tubo digestivo, además uno de los papeles fundamentales de la flora bacteriana intestinal en relación a la amibiasis, es el abatimiento del potencial de óxido-reducción (Biagi, 1992).

Entre los factores que modulan la infección por *E. histolytica* se encuentran el estado del hospedero y la virulencia del parásito. La susceptibilidad del hospedero puede aumentar frente a dietas ricas en carbohidratos, uso de corticoides, desnutrición proteica, embarazo, infección por VIH y otros estados de inmunosupresión, por esta razón, los pacientes con amibiasis intestinal pueden variar clínicamente desde asintomáticos a enfermos con cuadro de tipo colitis ulcerativa (Atías, 1999).

#### **2.6.1.6 Portador asintomático**

El huésped vive en buena relación con el parásito, mismo que reside como “comensal” en el lumen intestinal sin presentar lesiones a nivel de los tejidos. La importancia del portador es epidemiológica, ya que elimina quistes en sus desposiciones y puede transmitir así la infección (Atías, 1999).



### 2.6.1.7 Amibiasis intestinal sintomática

El tipo y severidad de la enfermedad en pacientes sintomáticos varía con la localización y extensión del compromiso intestinal. Las formas más comunes son las siguientes:

- a) Rectosigmoiditis aguda. La presencia de lesiones ulceronecróticas en este segmento colónico se manifiesta por un cuadro inicial agudo con diarrea disintérica (alrededor de 7 a 10 evacuaciones al día), acompañada de dolor en el abdomen inferior y fiebre alta (Atías, 1999).
- b) Colitis fulminante. Se presenta una extensa destrucción de la mucosa y submucosa del colon, con úlceras en todo su trayecto. Las evacuaciones son frecuentes y disintéricas (20 o más en un día), se presenta de dolor abdominal intenso, fiebre elevada, rápida deshidratación, náuseas, vómitos y puede incluso presentarse estado de choque. (Martínez, 1989), Las complicaciones incluyen hemorragia masiva y ameboma, pero la más frecuente y grave es la perforación que lleva a peritonitis, sepsis, estado de choque y muerte (Atías, 1999).
- c) Forma diarreica. Se manifiesta con diarrea más o menos intensa, no disintérica, aguda o intermitente, con o sin dolor abdominal (Atías, 1999).
- d) Apendicitis amibiana. La mayoría de los casos de esta amibiasis se acompaña de lesiones ulcerosas del ciego. Los síntomas son dolor y rigidez en el cuadrante inferior derecho del abdomen, fiebre, taquicardia y náusea (Martínez, 1989).

### 2.6.1.8 Diagnóstico

El diagnóstico de la amibiasis intestinal es muy importante, dado que la terapia es altamente efectiva. Además, en los casos agudos es necesario distinguirla de otras enfermedades inflamatorias del intestino como el caso de la colitis ulcerosa.

Un diagnóstico correcto puede obtenerse mediante distintas formas (Atías, 1999):

- a) Examen microscópico. El examen microscópico en muestras repetidas de deposiciones en fresco, revela la presencia de trofozoitos y establece el diagnóstico en el 90% de las amibiasis sintomáticas. El hallazgo de trofozoitos con glóbulos rojos fagocitados indica invasión de la pared intestinal y confirma una amibiasis aguda invasora. Pueden observarse preparaciones teñidas en donde se reconocen las características nucleares (Martínez, 1989).
- b) Métodos coproparasitológicos (CPS) serie III. Los métodos CPS pueden confirmar el diagnóstico clínico presuntivo o demostrar la presencia de *E. histolytica*. Estos métodos incluyen el CPS de concentración por flotación "Faust" y el de concentración por sedimentación "Ritchie" (Cervantes y Col., 2001).
- c) Cultivos axénicos, monoxénicos y xénicos. Se pueden cultivar deposiciones frescas en medios axénicos, monoxénicos y xénicos para cultivo de trofozoitos, los cuales son de

gran ayuda al confirmar un diagnóstico microscópico dudoso. De estos cultivos, los que han mostrado mayor utilidad en investigaciones bioquímicas y fisiológicas son los monoxénicos (Kretschmer, 1994), en especial el cultivo “Monoxénico de Robinson” que proporciona *in vitro* a la amiba las condiciones y nutrientes apropiados para llevar a cabo el desenquistamiento, desarrollándose así la forma invasiva (trofozoito) misma que se observa para establecer el diagnóstico en el laboratorio (Palacios, 1999).

- d) Reacciones serológicas. Las reacciones de hemaglutinación indirecta y la inmunoabsorción por enzimas son las más sensibles. También son muy fidedignas la inmunofluorescencia indirecta, la inmunoelectroforesis y la difusión en gel de agar (Atías, 1999).
- e) Otras formas de diagnóstico. Estas incluyen sigmoidoscopia, colonoscopia y estudios radiológicos, los cuales resultan útiles para buscar úlceras, estenosis, perforación, fístulas y abscesos (Atías, 1999).

### **2.6.1.9 Absceso hepático amibiano**

La patogenicidad de las amibas no sólo se limita al tracto gastrointestinal, sino que pueden ser afectados otros sitios anatómicos. El hígado es el órgano más comprometido y el absceso hepático, la complicación principal (Atías, 1999).

#### **2.6.1.9.1 Epidemiología**

Esta entidad es bien conocida y frecuente en muchos países del mundo, su incidencia varía de acuerdo al tipo de población y localización geográfica. Por razones desconocidas, los hombres resultan ser más afectados que las mujeres, aun cuando la incidencia de amibiasis intestinal es igual en ambos sexos (Atías, 1999).

#### **2.6.1.9.2 Patología**

El compromiso hepático ocurre por la migración de los trofozoitos de *E. histolytica* desde el intestino al hígado vía de la circulación portal. La localización más frecuente es el lóbulo derecho, lo que se explica por la distribución de la circulación que irriga esa zona y drena a la vena porta. Por lo general el absceso es único, pero no es raro la formación de abscesos múltiples (Atías, 1999).

#### **2.6.1.9.3 Sintomatología**

El cuadro clínico se inicia generalmente en forma lenta. Los síntomas más destacados son dolor en el cuadrante superior derecho, fiebre en grado variable y compromiso del estado general. El dolor puede ser constante o agudo y punzante, que se acentúa con la tos y la

respiración. Al examen físico resalta la hepatomegalia sensible y el diafragma derecho puede aparecer elevado (Martínez, 1989).

#### **2.6.1.9.4 Diagnóstico**

Las pruebas serológicas son positivas en más del 90 % de los casos, en especial la hemaglutinación indirecta (HAI) y la reacción de polimerasa en cadena (PCR), siendo esta última un método muy sensible y seguro para el diagnóstico de absceso amibiano, ya que permite la detección de ADN de *E. histolytica* patógena (Atías, 1999), también pueden utilizarse otros métodos como la gammagrafía, el ultrasonido y la tomografía axial computarizada, además de realizarse una punción en el absceso y observar el contenido al microscopio (Martínez, 1989).

#### **2.6.1.10 Otras lesiones extraintestinales**

La extensión de un absceso hepático hasta el pericardio es la complicación más peligrosa. La peritonitis se produce por perforación de una úlcera del colon o por una rotura de un absceso. Las úlceras de los genitales, piel, región perianal o pared abdominal son raras y suelen ser consecuencia de extensión directa de la enfermedad intestinal o bien algunas se deben a transmisión sexual. El absceso cerebral metastásico es raro y en este caso, las amibas llegan por vía hematológica (Atías, 1999).

#### **2.6.1.11 Tratamiento**

El fármaco de elección depende del tipo de presentación clínica y el sitio de acción del medicamento, por lo que existen dos tipos de amebicidas: Los tisulares y los lumbinales.

Los tisulares, como la dihidroemetina y la emetina actúan sobre organismos en la pared intestinal y en otros tejidos, pero no son eficaces en la luz intestinal. (Tierney y Col., 2000).

Los lumbinales actúan sobre las amibas en la luz intestinal, pero no si se encuentran localizadas en la pared del intestino o en otros tejidos. Dentro de este tipo de fármacos figuran el furoato de diloxanida, la paromomicina y el yodoquinol o diyodohidroxiquinoleína (Tierney y Col., 2000); este último es una hidroxiquinoleína halogenada y corresponde a uno de los amebicidas más utilizados para el tratamiento de la amibiasis intestinal y para portadores asintomáticos de *E. histolytica* (con una dosis recomendada de 30 mg/kg durante 20 días) debido a que es activo sobre los quistes y la forma móvil del parásito. Su eficacia para eliminar los quistes se basa en la capacidad que tiene para destruir los trofozoitos al actuar directamente sobre su membrana.

El grado de absorción que presenta es variable pero significativo, se distribuye en el lumen intestinal pero el 90 % no se absorbe y el porcentaje restante que entra a circulación tiene una vida media de 11 a 14 h, su metabolismo se lleva a cabo en el hígado y la mayor parte

se excreta por las heces y una mínima parte por orina (González y Satigeral, 1990 y Katzung, 1999).

Por otra parte, el metronidazol es singular por su eficiencia tanto en la luz intestinal como en la pared y en otros tejidos, pero no es suficiente como fármaco luminal cuando se usa sólo para infecciones intestinales ya que presenta fracasos terapéuticos hasta en el 50 % de los casos, además también alcanza el sistema nervioso central (Tierney y Col., 2000).

Hay ocasiones en las que el padecimiento se identifica de forma tardía, sin embargo, la amibiasis invasora presenta un curso más grave y más rápido, por lo que a menudo se lleva a cabo un tratamiento quirúrgico. Las formas clínicas en las que interviene este tratamiento son: apendicitis amibiana, colitis amibiana fulminante, absceso hepático, complicaciones pleuropulmonares, pericarditis amibiana y amibiasis cerebral (Kretschmer, 1994).

#### **2.6.1.12 Reacciones medicamentosas adversas**

La dihidroemetina y emetina causan náuseas y vómitos, así como dolor en el sitio de la inyección, además tienen efectos adversos sobre diversos tejidos (en particular el corazón) y un límite estrecho entre los efectos terapéuticos y tóxicos, el furoato de diloxanida causa comúnmente flatulencia, el yodoquinol o diyodohidroxiquinoleína puede causar malestar abdominal, diarrea transitoria leve, erupción cutánea, prurito anal, náuseas, vómito y ligera inflamación de la tiroides, por último el metronidazol induce con frecuencia náuseas o vómitos transitorios (Tierney y Col., 2000).

### **2.6.2 Bacterias**

Los organismos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* son los aislamientos bacterianos encontrados con mayor frecuencia en muestras clínicas, se encuentran en el suelo, el agua y la vegetación, forman parte de la flora intestinal normal de animales y humanos (Koneman y Col., 1997). Esta familia incluye varios géneros, entre los que destacan *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*. Algunos microorganismos entéricos como *Escherichia coli*, forman parte de la flora normal e incidentalmente causan enfermedad, en tanto que otros como *Salmonella* y *Shigella* con gran frecuencia son patógenos para humanos (Jawetz y Col., 1999).

#### **2.6.2.1 Fisiología y estructura**

Los componentes de esta familia son bacilos gramnegativos de tamaño moderado ( $0.3$  a  $1.0 \times 10^{-6} \mu\text{m}$ ), dotados de motilidad o carentes de ella y no forman esporas. Todos ellos crecen en aerobiosis y anaerobiosis (anaerobios facultativos) y de modo habitual se observa crecimiento tras 18 a 24 h de incubación en una variedad de medios no selectivos y selectivos. Las enterobacterias tienen requerimientos nutricionales simples, fermentan la

glucosa y reducen el nitrato a nitrito, son catalasa positivas y oxidasa negativas (Murray y Col, 1997).

### 2.6.2.2 Cultivo

Aunque cada género tiene sus propias características, la mayor parte de las bacterias entéricas forman colonias lisas, circulares, convexas y con bordes bien diferenciados. El cultivo es de gran ayuda, pero la diferenciación de estos microorganismos se basa principalmente en la presencia o ausencia de diferentes enzimas codificadas por el material genético de los cromosomas bacterianos (Koneman y Col., 1997).

#### 2.6.2.2.1 Características del crecimiento

Para la diferenciación bioquímica pueden emplearse los patrones de fermentación de los carbohidratos y la actividad de las descarboxilasas de aminoácidos y otras enzimas. Los cultivos sobre medios selectivos con colorantes especiales y carbohidratos distinguen las colonias fermentadoras de lactosa (pigmentada) de las no fermentadoras de lactosa (no pigmentada) y permiten una identificación presuntiva rápida de las bacterias entéricas (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Identificación presuntiva rápida de bacterias entéricas gramnegativas.

FERMENTACIÓN RÁPIDA DE LACTOSA	FERMENTACIÓN LENTA DE LACTOSA	NO FERMENTACIÓN DE LACTOSA
<i>Escherichia coli</i> : brillo metálico sobre medio diferencial, dotado de motilidad, colonias aplanadas, no viscosas.	<i>Edwardsiella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Arizona</i> , <i>Providencia</i> , <i>Erwinia</i> .	Especies de <i>Shigella</i> : carentes de motilidad, no forman gas a partir de glucosa.
<i>Enterobacter aerogenes</i> : colonias elevadas sin brillo metálico, con frecuencia presentan motilidad, crecimiento más viscoso.		Especies de <i>Salmonella</i> : dotadas de motilidad; habitualmente forman ácido y gas a partir de glucosa.
<i>Klebsiella pneumoniae</i> : muy viscosas, crecimiento mucoide, no motil.		Especies de <i>Proteus</i> : swarming sobre agar, hidrólisis rápida de la urea (olor amoniacal).
		Especies de <i>Pseudomonas</i> : pigmentos solubles, fluorescencia azul-verdosa, olor dulzaíno.

### 2.6.2.3 Pruebas bioquímicas

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* se identifican principalmente mediante pruebas bioquímicas que se llevan a cabo por diversos métodos, incluyendo una variedad de sistemas comerciales. De las numerosas pruebas bioquímicas disponibles, una batería de 28 pruebas es suficiente para diferenciar todas las Enterobacterias actualmente reconocidas clínicamente significativas. Una batería primaria de 14 pruebas que incluye fermentación de adonitol, arginina dihidrolasa, utilización de citrato, DNasa, gas a partir de glucosa, sulfuro de hidrógeno, producción de indol, lisina descarboxilasa, movilidad, ornitina descarboxilasa, fenilalanina desaminasa, fermentación de sacarosa, urea y Vogues-Proskauer es suficiente para la identificación de la mayoría de los aislamientos a nivel de género y especie. Se pueden llevar a cabo otras 14 pruebas como batería suplementaria que consisten principalmente en pruebas de fermentación de hidratos de carbono con la finalidad de identificar aislamientos más difíciles (Lennette y Col., 1989).

### 2.6.2.4 Estructura antigénica (Jawetz y Col., 1999)

Las Enterobacterias poseen una compleja estructura antigénica. Se han clasificado más de 150 diferentes antígenos somáticos O (lipopolisacáridos) termoestables, más de 100 antígenos K (capsulares) termolábiles, y más de 50 antígenos H (flagelares). En la *S. typhi* los antígenos capsulares se denominan antígenos Vi.

- Antígenos O. Constituyen la parte más externa de la pared lipopolisacárida de la célula y constan de unidades repetidas de polisacáridos, son resistentes al calor y al alcohol y se detectan mediante aglutinación bacteriana. Los anticuerpos a los antígenos O son predominantemente de la clase IgM.
- Antígenos K. Son antígenos O externos sobre algunas Enterobacterias. Algunos son polisacáridos y otras proteínas. Los antígenos K pueden interferir con la aglutinación por antisuero, y a veces se vinculan con virulencia.
- Antígenos H. Se localizan sobre los flagelos y se desnaturalizan mediante calor o alcohol. Estos antígenos se aglutinan con anticuerpos H, principalmente IgG. Los determinantes de los antígenos H son una función de la secuencia de aminoácidos en la proteína flagelar (flagelina). Dentro de un solo serotipo pueden presentarse antígenos flagelares en una de dos variantes denominadas fase 1 y fase 2. Los microorganismos tienden a cambiar de una fase a otra, esto se denomina variación de fase.

### 2.6.2.5 Patogenicidad e inmunidad (Murray y Col., 1997)

Los factores de virulencia más importantes en las cepas patógenas son los siguientes:

- a) Endotoxinas. La endotoxina es un factor de virulencia compartido por todas las bacterias gramnegativas aerobias y algunas anaerobias. La toxicidad reside en el componente lípido A del lipopolisacárido, el cual es liberado cuando la célula muere y experimenta lisis.
- b) Cápsula. La cápsula protege de la fagocitosis ya que los antígenos capsulares hidrofílicos repelen la superficie hidrofóbica de las células fagocíticas.
- c) Variación de fase antigénica. La expresión de los antígenos K y H se encuentran bajo control genético. Todos esos antígenos se pueden expresar o no alternativamente (variación de fase), lo que sirve para proteger a la bacteria frente a la muerte mediada por anticuerpos.
- d) Producción de exotoxina. Se han identificado varias toxinas importantes, entre las que se incluyen las enterotoxinas termoestable y termolábil; las toxinas Shiga (*Shigella dysenteriae* tipo 1), similares a la Shiga y las hemolisinas.
- e) Expresión de factores de adherencia. La adherencia de las bacterias a las células huéspedes está mediada por las fimbrias. La mayoría de las enterobacterias expresan fimbrias capaces de unirse a diversas células huéspedes.
- f) Supervivencia dentro de las células. La supervivencia intracelular protege a las bacterias frente a muchos antibióticos y a la reacción inmune del paciente.
- g) Secuestro de factores del crecimiento. El crecimiento *in vivo* obliga a que la bacteria busque nutrientes. El hierro es un factor de crecimiento importante necesario para las bacterias, pero se encuentra unido a proteínas queladoras y las bacterias producen sus propias sustancias queladoras de hierro competitivas.
- h) Resistencia a la acción bactericida del suero. La mayoría de las bacterias son eliminadas con rapidez del torrente sanguíneo, pero algunos gérmenes virulentos son capaces de producir infecciones sistémicas al ser resistentes a la acción bactericida del suero.
- i) Resistencia a los antimicrobianos. Los microorganismos son capaces de desarrollar resistencia con la misma rapidez con la que se introducen nuevos antibióticos, la cual puede estar codificada por plásmidos transferibles lo que permite el intercambio entre especies, géneros y familias de bacterias.

## 2.7 Enfermedades causadas por *Salmonella* y *Shigella*

### 2.7.1 *Salmonella*

El género *Salmonella* está formado por un grupo muy heterogéneo de bacterias que colonizan el intestino del hombre y de muchas especies animales causando alteraciones

patológicas. Algunas especies se diseminan con facilidad hasta circulación sanguínea produciendo estados sépticos graves o localización del bacilo en otros órganos o tejidos (Romero, 1999).

### **2.7.1.1 Morfología e identificación**

Son bacilos gramnegativos anaerobios facultativos, dotados de motilidad mediante flagelos peritricos (con excepción de *S. pullorum-gallinarum*), crecen rápidamente sobre medios simples, pocas veces fermentan lactosa o sacarosa, forman ácido y gas (Jawetz y Col., 1999). Las colonias son pequeñas, de menos de 1 mm de diámetro, de color gris claro o blanquecinas, con bordes difusos, convexas y de superficie lisa (Romero, 1999).

### **2.7.1.2 Clasificación**

La clasificación taxonómica del género *Salmonella* considera tres especies primarias: *S. typhi* (un serotipo), *S. choleraesuis* (un serotipo) y *S. enteritidis* (más de 1500 serotipos). El análisis cuidadoso de la homología del ADN revela que el género consiste en una sola especie (*S. choleraesuis*) que puede ser subdividida en siete subgrupos, cada uno con sus propias características. Casi todas las salmonellas causantes de enfermedad en humanos (>99 %) se encuentra en el subgrupo I y pueden aislarse de los animales de sangre caliente, los otros subgrupos, por ejemplo IIIa y IIIb (antes designado *Arizonae*) se aíslan de animales de sangre fría y del ambiente, y llegan a causar raras infecciones en humanos (Jawetz y Col., 1999).

### **2.7.1.3 Variación**

Los microorganismos pueden perder los antígenos H y convertirse en variantes sin motilidad. La pérdida del antígeno O se acompaña de un cambio de la forma de la colonia. El antígeno Vi puede perderse en parte o en su totalidad (Jawetz y Col., 1999).

### **2.7.1.4 Epidemiología**

El género *Salmonella* se encuentra en la mayoría de los animales, como gallinas, reptiles, vacas, roedores, animales domésticos, aves y humanos. El reservorio animal se mantiene por contacto entre animales y por el empleo de piensos contaminados. Ciertos serotipos como *S. typhi* y *S. paratyphi*, están muy adaptados al hombre y no causan enfermedad en otros huéspedes. La mayoría de las infecciones se deben a la ingestión de agua o alimentos contaminados (gallinas, huevos, productos lácteos) o bien al contagio por vía fecal-oral (Jawetz y Col., 1999).



### 2.7.1.5 Patogenicidad

Los microorganismos casi siempre ingresan por vía oral, habitualmente por medio de alimentos o bebidas contaminadas (Figura 2). La dosis infectante capaz de producir enfermedad es de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^8$  bacilos (pero quizá hasta menos de  $1 \times 10^3$  microorganismos de *S. typhi*). Las salmonellas producen tres tipos principales de enfermedad en los humanos: fiebres entéricas, bacteremia y enterocolitis (Jawetz y Col., 1999).

### 2.7.1.6 Patología y manifestaciones clínicas

- a) Fiebres entéricas. Este síndrome es conocido como fiebre tifoidea y pocos tipos de *Salmonella* lo producen, entre ellos, *S. typhi* es el de mayor importancia. La enfermedad se inicia al ingerir los bacilos, los cuales alcanzan el intestino delgado, desde el cual penetran a los linfáticos y al torrente sanguíneo pasando de esta forma a otros órganos. Los microorganismos se multiplican en el tejido linfoide intestinal y se excretan por las heces; después de un periodo de incubación de 10 a 14 días se presenta fiebre, malestar, cefalea, estreñimiento, bradicardia y mialgia (Jawetz y Col., 1999). La fiebre se eleva hasta alcanzar 40 °C (Romero, 1999), el bazo y el hígado se hipertrofian, además se observan manchas de color rosáceo sobre la piel del abdomen y del tórax. Las principales lesiones son hiperplasia, necrosis del tejido linfático, hepatitis, inflamación de la vesícula biliar, pulmones y otros órganos (Jawetz y Col., 1999).
- b) Bacteremia con lesiones focales. Se vincula con *S. choleraesuis* principalmente. Después de la ingestión por vía oral hay invasión inicial del torrente sanguíneo (con posibles lesiones focales en pulmones, huesos y meninges), pero la mayoría de las veces no hay manifestaciones intestinales (Jawetz y Col., 1999).
- c) Enterocolitis. Es la manifestación más común de salmonelosis. Generalmente es causada por la ingestión de diferentes cepas de *S. enteritidis*, principalmente serotipos *typhimurium*, *hydenbeng* y *adelai* (Romero, 1999). Los síntomas aparecen en general de 8 a 48 h después de la ingestión de alimentos y bebidas contaminadas con un cuadro inicial de náuseas, cefaleas, vómitos y diarreas sin sangre, es común la fiebre de poca intensidad, pero por lo general los síntomas desaparecen en 2 o 3 días (Murray y Col., 1997).

### 2.7.1.7 Diagnóstico

Se requieren de muestras repetidas de sangre para cultivo. En la fiebre entérica y la bacteremia los hemocultivos casi siempre son positivos en la primera semana de enfermedad. Se puede practicar el cultivo de médula ósea, de orina y de heces fecales. Estas muestras, deben sembrarse en medios de cultivo especiales para enterobacterias, medios diferenciadores, selectivos y enriquecidos. En ellos, las salmonellas producen colonias características, las cuales se resiembran para purificarlas e identificarlas mediante

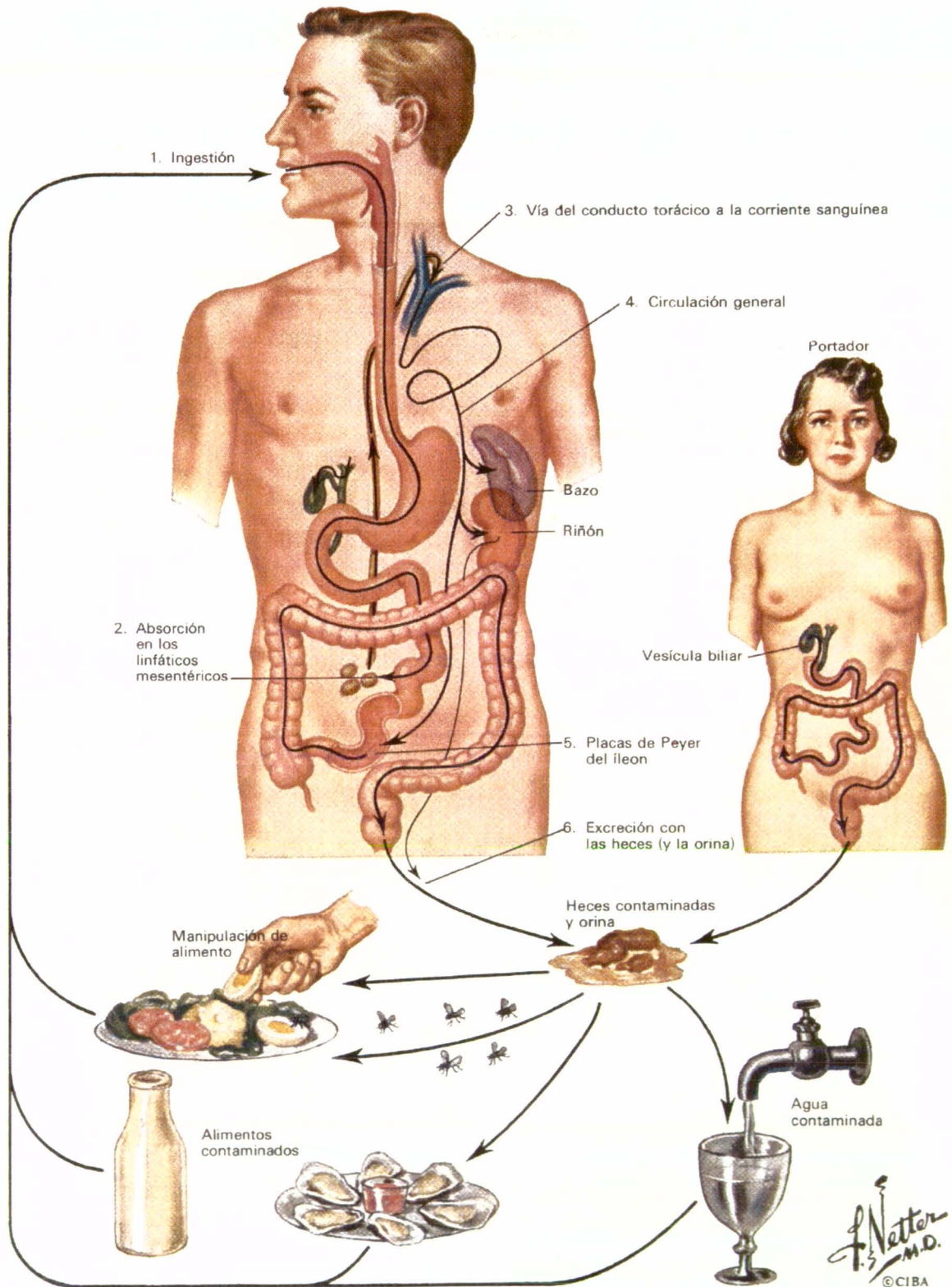


Figura 2. Mecanismo de infección de *Salmonella*.

patrones bioquímicos.

También pueden utilizarse técnicas serológicas para determinar títulos de anticuerpos en pacientes con enfermedad desconocida (Jawetz y Col., 1999).

### **2.7.1 8 Tratamiento**

El antibiótico de elección sigue siendo el cloranfenicol, sin embargo se han encontrado muchas cepas resistentes a este antibiótico, por lo cual puede tratarse también con ampicilina o trimetoprim-sulfametoxazol con excelentes resultados. También se recomienda el uso de la furazolidona, sobre todo cuando se ha presentado resistencia a otros medicamentos (Romero, 1999). Las pruebas de susceptibilidad constituyen un coadyuvante importante para seleccionar el antibiótico apropiado (Jawetz y Col., 1999).

### **2.7.2 *Shigella***

El hábitat natural de la *Shigella* se limita al intestino de los humanos y otros primates, donde produce disentería bacilar (Jawetz y Col., 1999).

#### **2.7.2.1 Morfología e identificación**

Son bacilos delgados gramnegativos y anaerobios facultativos, fermentan la glucosa y con excepción de *Sh. sonnei* ninguna fermenta lactosa y pocas veces producen gas. Las colonias son convexas, circulares y transparentes con bordes nítidos (Jawetz y Col., 1999).

#### **2.7.2.2 Epidemiología**

Se han descrito cuatro especies con alrededor de 38 serotipos basados en el antígeno O:, *Sh. boydii*, *Sh. flexneri*, *Sh. dysenteriae* y *Sh. sonnei*.

*Sh. flexneri* es la causa más común de shigelosis en los países subdesarrollados, mientras que *Sh. sonnei* constituye el agente causal más frecuente en el mundo industrial. La shigelosis es por lo general una enfermedad pediátrica y la mayoría de las infecciones corresponden a niños entre 6 meses y 10 años de edad. La enfermedad endémica en los adultos se debe muchas veces a contacto con niños infectados, se transmite por vía fecal-oral, sobre todo por las manos, agua y alimentos contaminados (Murray y Col., 1997).

#### **2.7.2.3 Patogenicidad**

La shigelosis es un padecimiento que se adquiere por la ingestión de alimentos contaminados con materias fecales humanas y casi siempre se limita al aparato gastrointestinal y puede adquirirse con inóculos muy pequeños (aproximadamente de 100 a 200 bacilos). La invasión a torrente sanguíneo es poco frecuente (Romero, 1999).

#### 2.7.2.4 Patología y manifestaciones clínicas

Las lesiones patológicas quedan restringidas al intestino grueso (colon y recto), aunque en los casos graves pueden estar afectadas las últimas porciones del intestino delgado, dichas lesiones se caracterizan por edema, hiperplasia e inflamación que dan lugar a abscesos que producen necrosis de la mucosa, úlceras superficiales y sangrado (Netter, 1985).

Los signos y síntomas clínicos aparecen de 1 a 3 días después de la ingestión de los bacilos, hay dolor abdominal, fiebre y diarrea acuosa. Después de un día aproximadamente, el número de evacuaciones aumenta conforme la infección afecta íleon y colon, las evacuaciones son menos líquidas, pero con frecuencia contienen moco y sangre. Cada deposición se acompaña de pujo y tenesmo, con el resultante dolor abdominal inferior. En más de la mitad de los casos en adultos los síntomas ceden de manera espontánea en 2 a 5 días, pero en niños y ancianos la pérdida de agua y electrolitos pueden producir deshidratación, acidosis y muerte. La enfermedad por *Sh. dysenteriae* es muy grave ya que produce una exotoxina termolábil que afecta el intestino y el sistema nervioso central, además se pueden presentar lesiones en las meninges y estado de coma (Jawetz y Col., 1999).

#### 2.7.2.5 Diagnóstico

Para la identificación del agente etiológico se requiere como muestra materia fecal de un paciente con un cuadro clínico de síndrome disentérico febril. El coprocultivo debe hacerse de una muestra que contenga sangre, moco o pus y debe sembrarse en medios selectivos y enriquecidos, en donde crecen colonias características las cuales se purifican para enseguida ser evaluadas bioquímicamente (Romero, 1999), además, como las especies de *Shigella* están entre las enterobacterias menos reactivas bioquímicamente se requieren también de pruebas serológicas para la identificación de aislamientos de este género. La serotipificación es importante por sus implicaciones clínicas y epidemiológicas, dado que *Sh. dysenteriae* y *Sh. sonnei* son bioquímicamente distintas y *Sh. boydii* y *Sh. flexneri* son bioquímicamente idénticas (Lennette y Col., 1989).

#### 2.7.2.6 Tratamiento

El tratamiento etiológico se hace con ampicilina, tetraciclinas, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina y cloranfenicol, los cuales pueden suprimir los ataques clínicos agudos de disentería y acortar la duración de los síntomas (Jawetz y Col., 1999).

### 2.8 *Escherichia coli* no patógena

*E. coli* es la bacteria encontrada con mayor frecuencia en las materias fecales del hombre y de muchas especies de animales. Su hábitat natural es el intestino delgado y grueso, forma parte de la flora nativa intestinal y se encuentra en calidad de saprobio sin causar

daño; por lo contrario, muchas cepas de *E. coli* producen sustancias que son útiles al hospedero, como las colicinas que tienen efecto inhibitorio sobre otras cepas potencialmente patógenas, por lo tanto su presencia en el intestino es benéfica para el hospedero. Esta bacteria en tejidos extraintestinales produce procesos inflamatorios piógenos similares a otras bacterias y en ocasiones de mayor intensidad (Romero, 1999).

## 2.9 Plantas medicinales

Entre las alternativas que tiene la población para resolver sus problemas de salud figuran la medicina de patente, que es proporcionada por los centros de salud (para quien tiene estos servicios), y la medicina tradicional, que es empleada sobre todo por la población de escasos recursos económicos que no tiene acceso a los servicios básicos de salud. Las plantas medicinales son el principal soporte de esta última terapéutica (Calderón y Col., 1999) y han formado parte importante de la historia y cultura de los pueblos indígenas, su uso y aplicaciones para el remedio de enfermedades constituye un conocimiento que aún es transmitido en forma oral de generación en generación como parte de las tradiciones heredadas (Kravzov y Col., 2000). Durante mucho tiempo, dichas plantas fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos, esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen (Anónimo c, 2000).

La Organización Mundial de la Salud estima que más de 3 200 millones de habitantes utilizan recetas de medicina aborigen tradicional, formuladas con plantas o derivados de ellas para el tratamiento de diversas enfermedades. En México el Instituto Mexicano para el estudio de las Plantas Medicinales (IMEPLAM) encontró que más de 2 000 especies botánicas tienen aplicaciones terapéuticas y además se enlistan especies de plantas que en la medicina tradicional se usan como anti-diarréicos y/o antiparasitarios. Diversos estudios sobre el tema se pueden encontrar en la literatura, entre ellos se ha evaluado el efecto anti-giardíastico *in vitro* de 14 extractos plantas contra *Giardia duodenalis* (Ponce y Col., 1994); la evaluación de la potente actividad de *Helianthemum glomeratum* contra *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae* (Lemus y Col., 1994); la actividad citotóxica y antimicrobiana de terpenoides de diferentes especies de la familia Asteraceae en el que 12 especies mostraron actividad contra varios microorganismos, entre ellos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (Villareal y Col., 1994) y la evaluación de la actividad amebicida y antibacterial *in vitro* de especies pertenecientes a la familia Asteraceae en el Altiplano Potosino: *Chrysactinia mexicana*, *Flourenzia cernua*, *Parthenium incanum*, *Viguiera gregii* y *Zinnia acerosa* contra patógenos que con mayor frecuencia causan enfermedades gastrointestinales (parásitos como *E. histolytica* y bacterias del género *Shigella* y *Salmonella*) (Pérez, 2002).

## 2.9.1 Plantas utilizadas en la región para trastornos gastrointestinales

La recolección de la flora espontánea es una de las formas más antiguas de aprovechamiento de los recursos naturales renovables de las zonas áridas y semiáridas del país. Por un estudio reciente en el Altiplano Potosino se sabe que existen dos tipos de recolección, una destinada a la venta y otra destinada al autoconsumo, esta última incluye varias especies poco conocidas. En dicho estudio el objetivo fue registrar la flora silvestre útil a través de la recopilación del conocimiento tradicional de los pobladores de comunidades rurales pertenecientes a este Altiplano. Los resultados obtenidos indican el registro de 22 especies vegetales pertenecientes a la familia Asteraceae y refiere que más de la mitad de ellas se utilizan para tratar el dolor de estómago mediante la preparación de una infusión; sus nombres científicos son: *Artemisa ludoviciana ssp. mexicana*, *Chrysactinia mexicana*, *Dyssodia setifolia*, *Flourenzia cernua*, *Haploppapus spinulosus*, *Parthenium argentatum*, *Parthenium bipinnatifidum*, *Parthenium hysterophorus*, *Parthenium incanum*, *Sanvitalia procumbens*, *Viguiera gregii* y *Zinnia acerosa* (Juárez y Col., 1996).

## 2.10 Especies vegetales en estudio.

Numerosas investigaciones sobre el estudio de productos naturales que derivan de plantas medicinales con actividad biológica han demostrado el potencial que presentan las asteráceas como fuente de compuestos con actividad farmacológica. Para el presente trabajo, se seleccionaron cuatro especies vegetales con base al estudio realizado en el Altiplano Potosino, en donde como criterio de elección se tomó en cuenta su ubicación, facilidad de recolección y etapa fenológica, además de la escasez de estudios relacionados con las propiedades medicinales que se les atribuyen.

A continuación se proporciona la descripción botánica, los usos alternativos y los estudios químicos de las cuatro especies que se incluyeron en el estudio *Dyssodia setifolia* (Lag.) Rob., *Haploppapus spinulosus* (Pursh) DC., *Parthenium hysterophorus* L. y *Sanvitalia procumbens* Lam.

### 2.10.1 *Dyssodia setifolia* (Lag.) Rob.

Esta especie pertenece a la tribu Tageteae (McVaugh, 1984) y es conocida como parraleña (Martínez, 1994).

#### 2.10.1.1 Descripción botánica

Hierba perenne de aproximadamente 20 cm, muy ramosa, con hojas enteras, lineares, tomentosas, sésiles, de color grisáceo. Cabezuelas solitarias terminales sobre largos pedúnculos con flores liguladas de color amarillo. Invólucro campanulado con brácteas uniseriadas y unidas desde su base, separadas ligeramente en el ápice. Calículo presente.

Receptáculo desnudo. Aquenios con vilano formado de escaras, con el ápice redondeado las interiores terminadas en una arista.

Planta encontrada comúnmente en matorral desértico micrófilo, en las laderas calizas y llanuras aluviales con matorral desértico rosetófilo y crasicale (Salas, 1987), en los estados de Aguascalientes, Durango, Guanajuato, San Luis Potosí y Zacatecas entre otros, a una altura de 1400 a 2000 metros sobre el nivel del mar (msnm) (McVaugh, 1984).

### **2.10.1.2 Usos**

Se utiliza toda la planta para preparar una infusión efectiva contra el dolor de estómago y la tos, también se emplea como complemento alimenticio si se prepara con leche (Juárez y Col., 1996).

### **2.10.1.3 Estudios**

No cuenta con estudios científicos.

## **2.10.2 *Haplopappus spinulosus* (Pursh.) DC.**

Esta planta pertenece a la tribu Astereae (McVaugh, 1984) y se conoce comúnmente como árnica chica (Estrada, 1995).

### **2.10.2.1. Descripción botánica**

Planta arbustiva de aproximadamente 40 cm de alto, con hojas alternas lanceoladas a lineares, partidas, sésiles, ciliadas, de menos de 2 cm de largo y cubiertas de cerdas glandulosas. Cabezuelas amarillas, solitarias en las partes terminales de las ramas, campanuladas, de 1 a 1.5 cm de alto, con involucre formado de brácteas lineales imbricadas en varias series. Flores liguladas periféricas, las del disco tubulosas y hermafroditas. Aquenios de las flores liguladas y del disco, pilosos con vilano de cerdas numerosas (Rzedowsky y Rzedowsky, 2001). Esta planta está ampliamente distribuida en el estado de San Luis Potosí, entre 1700 y 2000 msnm y se encuentra actuando como maleza (Salas, 1987).

### **2.10.2.2 Usos**

La parte aérea de la planta se utiliza para golpes y contusiones en preparaciones alcohólicas (Estrada, 1995), pero también se preparan infusiones con sus hojas para el dolor de estómago (Juárez y Col., 1996).

### **2.10.2.3 Estudios**

No cuenta con estudios científicos.

### **2.10.3 *Parthenium hysterophorus* L.**

Pertenece a la tribu Heliantheae (McVaugh, 1984) y se le llama escobilla, hierba de la hormiga, altamisa, canario, claudiasa blanca, confitillo, escoba amargosa (Argueta, 1994), o cicutilla (Martínez, 1993).

#### **2.10.3.1 Descripción botánica**

Hierba anual de 30 a 50 cm de altura, erecta, ramosa, con las ramas estriadas y pubescentes. Hojas bipinnatífidas con segmentos lineares, obtusos, pubescentes, miden de 4 a 12 cm de largo por 3 a 6 de ancho. Capítulos numerosos, predicelados, corimbosos de 3 a 5 cm de diámetro, brácteas biseriadas, 5 externas y 5 internas, pubescentes en el dorso, algo agudas; pajitas del receptáculo cuneadas, glandulosas en el ápice. Flores blancas, las marginales en número de 5, femeninas con la lígula orbicular, de 1 mm; las flores del disco unas 20 tubulosas. Aquenios deprimidos, de color negro de 2 mm de largo. Maleza mexicana que crece a lo largo de los caminos y banquetas (Rzedowsky y Rzedowsky, 2001) en los estados de Coahuila, Guerrero, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, San Luis Potosí, Sinaloa y Veracruz (Martínez, 1994).

#### **2.10.3.2 Usos**

Se utiliza toda la planta para preparar una infusión que se toma en caso de trastornos digestivos como dolor e irritación de estómago y fiebre intestinal (popularmente conocida como empacho), además de recomendarse para la diabetes, enfermedades de la piel, dolor de cuerpo, reumatismo, heridas, como correctivo menstrual y antitusivo (Argueta, 1994).

#### **2.10.3.3 Estudios**

La planta se caracteriza por la presencia de cera vegetal, grasa, aceite esencial, tres resinas ácidas, una resina neutra, un alcaloide o mezcla de alcaloides, clorofila, taninos, un ácido orgánico (parténico), materias pécticas y carbohidratos (Martínez, 1993), así como lactonas sesquiterpénicas (de la Fuente, 2000). La propiedad analgésica del extracto etanólico ha sido comprobada por varios médicos (Argueta, 1994) y los estudios afirman que es depresor del sistema nervioso central y bactericida (Domínguez, 1969).



## **2.10.4 *Sanvitalia procumbens* Lam.**

*S. procumbens* pertenece a la tribu Heliantheae (McVaugh, 1984), y es conocida como ojo de gallo, de pollo (Rzedowsky y Rzedowsky, 2001), de chanate, de gallina, de gato o de perico (Argueta, 1994).

### **2.10.4.1 Descripción botánica**

Planta anual, rastrera o ascendente, forman matas de hasta 80 cm de diámetro; tallos generalmente ramificados más o menos pubescentes; hojas sobre peciolo de 2 a 16 mm de largo, limbo lanceolado o anchamente ovalado, de 0.8 a 5 cm de largo, de 0.3 a 2.5 de ancho, agudo u obtuso en el ápice entero en el margen, cuneado en la base, escábrido en ambas caras, trinervado; cabezuelas solitarias y terminales, sésiles o sobre pedúnculos de hasta 3 mm de largo; involucre anchamente campanulado, de 4 a 5 mm de alto, sus brácteas de 12 a 20 graduadas en 2 a 3 series, ovaladas o suborbiculares, obtusas o redondeadas en el ápice, pubescentes y largamente ciliadas; receptáculo cónico; páleas de  $\pm 7$  mm de largo, puntiagudas, generalmente moradas oscuras en la parte superior, pubescentes a lo largo de la quilla; flores liguladas  $\pm 12$  mm, sus láminas amarillas, anchamente elípticas a ovadas, de 5 a 9 mm de largo; flores del disco de 20 a 40, sus corolas de  $\pm 3$  mm de largo, a menudo con pelos provistos de glándula terminal roja en la base, aquenios de las flores liguladas obcónicos, de  $\pm 4$  mm de largo, estriados, tuberculadas y con un vilano de 3 aristas divergentes de 2 a 3 mm de largo, aquenios de las flores del disco comprimidos de 3 mm de largo, tuberculadas y a menudo provistos de una o dos alas partidas y ciliadas, vilano de 0 a 2 aristas cortas. Ampliamente distribuida en matorrales y pastizales a menudo como maleza ruderal y arvense, en una altitud de 2250 a 2600 msnm (Rzedowsky y Rzedowsky, 2001). Se distribuye en los estados de Chihuahua, Durango, Guerrero, Michoacán, Oaxaca y San Luis Potosí (Anónimo d, 2000).

### **2.10.4.2 Usos**

La planta completa se utiliza para padecimientos digestivos como diarrea, empacho, disentería, indigestión, dolor de estómago y vómito, las hojas se recomiendan para sanar la dislocación de huesos, astillas en pies e inflamación de testículos. La raíz se usa para aliviar comezón de encías, enfermedades respiratorias, trastornos renales, enfermedades respiratorias y para calmar los nervios. Si se macera toda la planta con alcohol y se aplica localmente es eficaz para los piquetes de alacrán, reumas e hinchazones (Anónimo d, 2000).

### **2.10.4.3 Estudios**

Se han encontrado en las partes aéreas triterpenos y ácidos carboxílicos, y en la raíz alquinos, ésteres metílicos y ácidos grasos (Argueta, 1994).

### 3. OBJETIVOS

- Realizar el estudio fitoquímico preliminar de los extractos acuosos y etanólicos de las siguientes especies vegetales: *Dyssodia setifolia* (Lag) Rob., *Haplopappus spinulosus* (Pursh) DC., *Parthenium hysterophorus* L. y *Sanvitalia procumbens* Lam.
- Evaluar el efecto amebicida *in vitro* de los extractos acuosos de las especies vegetales mencionadas sobre los trofozoitos de *Entamoeba histolytica*, por medio del cultivo “Monoxénico de Robinson”.
- Evaluar el efecto antibacterial *in vitro* de los extractos acuosos y etanólicos de estas especies vegetales sobre las enterobacterias *Salmonella enteritidis* (S-200), *Salmonella typhi* (St-001), *Shigella boydii* (Shb-001), *Shigella dysenteriae* (Shd-001), *Shigella flexneri* (Shf-001), *Shigella sonnei* (Shs-001) y *Escherichia coli* no patógena por el método de difusión en agar.
- Determinar la concentración mínima bactericida de los extractos vegetales activos.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio fitoquímico de las especies vegetales fue realizado en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP) y en el laboratorio de Fitoquímica del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas (IIZD) de la UASLP. La evaluación amebicida se realizó en el laboratorio de Parasitología de la FCQ de la UASLP y los ensayos bacteriológicos se llevaron a cabo en el laboratorio particular de Análisis Químicos, Clínicos y Bacteriológicos Altair.

### 4.1 Recolección de las especies vegetales

La recolección de *D. setifolia* y *H. spinulosus* se llevó a cabo en la zona semiárida del municipio de Guadalcázar, S.L.P y la de *P. hysterothorus* y *S. procumbens* se realizó en la ciudad de San Luis Potosí, del estado de S.L.P.

De las especies mencionadas, se recolectaron aproximadamente 500 g de cada una de ellas, cuando se encontraban en etapa de floración, además de dos ejemplares, los cuales fueron entregados al herbario Isidro Palacios del IIZD, de la UASLP para su identificación taxonómica y registro.

### 4.2 Preparación de extractos vegetales.

Para su preparación, el material vegetal se dejó secar sobre bandejas de papel absorbente al abrigo de la luz por un tiempo de aproximadamente tres semanas, enseguida se efectuó la separación de hojas y flores que posteriormente fueron molidas en una licuadora convencional y con ello se prepararon dos tipos de extractos:

- a) Extracto acuoso: Fue obtenido mediante infusión. Se colocaron 100 ml de agua destilada a fuego lento y se retiraron una vez iniciada la ebullición, enseguida se adicionaron 20 g de la planta pulverizada, se cubrió con un vidrio de reloj y se dejó reposar por 15 min, los extractos obtenidos fueron filtrados sobre algodón y aforados a 100 ml (concentración de 200 mg/ml referido a planta seca), posteriormente se esterilizaron por microfiltración al vacío con el sistema millipore con pre-filtros AP-25, AP-15 y membranas hidrofílicas de 0.45  $\mu\text{m}$ , así como en condiciones estériles (método de calor húmedo en autoclave: 121  $^{\circ}\text{C}$ , 15 lb, 15 min) por membranas hidrofílicas de 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$  en campana de seguridad microbiológica tipo II. Al final fueron envasados en viales estériles y se guardaron a 4  $^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización (Trease y Evans, 1987 y Cárdenas, 1998).

- b) Extracto etanólico: Su preparación se llevó a cabo por el método de percolación hasta agotamiento en columna de gravedad, para lo cual se pesaron 100 g de cada planta pulverizada, se colocaron en percoladores de vidrio, se adicionó etanol absoluto hasta cubrir el polvo vegetal y se dejaron macerar con etanol absoluto durante 24 h, enseguida se realizó una extracción hasta agotamiento en donde se utilizó la cantidad de solvente necesario. Se redujo el volumen a 200 ml en rotavapor a una temperatura de 32 a 35 °C (concentración de 500 mg/ml referido a planta seca). Los extractos se envasaron en frascos ámbar y se guardaron a 4 °C hasta su utilización (Trease y Evans, 1987).

### **4.3 Estudio fitoquímico preliminar**

Se realizaron por triplicado pruebas de coloración, precipitación y cromatografía en capa fina, para la identificación cualitativa de los grupos químicos de metabolitos secundarios presentes en los extractos acuosos y etanólicos de las plantas en estudio (Zweig y Sherma, 1984).

#### **4.3.1 Reacciones de coloración y precipitación**

Los extractos se evaluaron mediante reacciones de coloración y precipitación para la identificación de carbohidratos, taninos, saponinas, heterósidos cardiotónicos, flavonoides, alcaloides, lactonas sesquiterpénicas, quinonas y heterósidos cianogénéticos (Anexo I), las cuales se efectuaron de acuerdo a la metodología citada por Bruneton 1991, Domínguez 1985 y Trease y Evans 1981 con los reactivos específicos (Anexo II).

#### **4.3.2 Cromatografía en capa fina (CCF)**

Las reacciones de coloración y precipitación son consideradas como presuntivas, por lo que fue necesario confirmar la presencia de metabolitos secundarios por medio de un método sensible y específico. Para este fin, se aplicó el método de cromatografía en capa fina (Zweig y Sherma, 1984).

Para evaluar los extractos por este método, se utilizaron diferentes tipos de adsorbentes con un espesor de 250  $\mu$ . (Anexo III). Las muestras fueron depositadas por capilaridad a 1 cm de la base de la cromatoplaque, para después ser sometidas a la acción de solventes con distinta polaridad para su desarrollo y posteriormente las placas fueron reveladas con los agentes cromogénicos específicos para cada grupo químico (Anexo IV).

#### 4.3.2.1 Carbohidratos

- **Adsorbentes:** Placas de silica gel 60 G y silica gel tamponada con acetato de sodio 0.02 m.
- **Sistemas de disolventes:** Para las placas de silica gel se utilizó n-propanol-amoniaco-agua destilada 6-2-1 v/v y para las placas tamponadas 65 ml de acetato de etilo, 35 ml de una mezcla de 2 v de isopropanol y 1v de agua destilada.
- **Agente cromogénico:** Aldehído anísico-ácido sulfúrico.

#### 4.3.2.2 Flavonoides

- **Adsorbente:** Silica gel 60 G.
- **Sistema de disolventes:** Éter de petróleo-acetato de etilo 2-1 v/v, etanol-cloroformo 1-3 v/v, acetato de etilo-ácido fórmico-agua destilada-metanol 10-2-2-1 v/v y metanol-agua destilada 6-4 v/v.
- **Agentes cromogénicos:** Cloruro de aluminio, reactivo de Benedict, sulfato de fierro amoniacal, acetato de plomo y vapores de ácido clorhídrico.

#### 4.3.2.3 Alcaloides

- **Adsorbente:** Silica gel 60 G.
- **Sistema de disolventes:** Benceno-etanol 9-1 v/v, cloroformo-acetona-dietilamina 5-4-1 v/v, éter de petróleo-acetato de etilo 2-1 v/v y tolueno-formato de etilo-ácido fórmico 5-4-1 v/v.
- **Agentes cromogénicos:** Verde de bromocresol, reactivo de Dragendorff, yodo, reactivo de Meyer, ácido nítrico y ácido sulfúrico.

#### 4.3.2.4 Lactonas sesquiterpénicas

- **Adsorbente:** Silica gel 60 G.
- **Sistema de disolventes:** Éter etílico-cloroformo 1-4 v/v.
- **Agente cromogénico:** Ácido sulfúrico al 50 %.

#### 4.3.2.5 Quinonas

- **Adsorbente:** Silica gel 60 G.
- **Sistema de disolventes:** Éter de petróleo-acetato de etilo 2-1 v/v, etanol-cloroformo 1-3 v/v, acetato de etilo-ácido fórmico-agua destilada-metanol 10-2-2-1 v/v y metanol-agua destilada 6-4 v/v.
- **Agentes cromogénicos:** Acetato de magnesio y azul de metileno reducido.

#### 4.3.2.6 Cumarinas

- **Adsorbente:** Silica gel 60 G.
- **Sistema de disolventes:** Éter de petróleo-acetato de etilo 2-1 v/v, etanol-cloroformo 1-3 v/v y acetato de etilo-ácido fórmico-agua destilada-metanol 10-2-2-1 v/v.
- **Agentes cromogénicos:** Peróxido de hidrógeno-cloruro férrico e hidróxido de potasio.

#### 4.3.2.7 Esteroles

- **Adsorbentes:** Silica gel 60 G y alúmina.
- **Sistemas de disolventes:** Para las cromatoplas de silica gel se utilizó benceno y benceno-acetato de etilo 2-1 v/v. Para las cromatoplas de alúmina se utilizó cloroformo-etanol 96-4 v/v.
- **Agentes cromogénicos:** Anizaldehído, anizaldehído-tricloruro de antimonio, reactivo de Carr-Price (cloruro de antimonio), ácido perclórico e hidróxido de sodio.

#### 4.3.2.8 Terpenos

- **Adsorbentes:** Silica gel 60 G y alúmina.
- **Sistemas de disolventes:** Para las cromatoplas de silica gel se utilizó éter de petróleo y éter de petróleo-acetona 5-2 v/v. Para las cromatoplas de alúmina se utilizó benceno, benceno-éter de petróleo 1-1 v/v y benceno-etanol 1-1 v/v.
- **Agente cromogénico:** Vainillina-ácido sulfúrico.

### 4.4 Evaluación de la actividad amebicida

#### 4.4.1 Estudio preliminar

Como primera parte de esta evaluación, se realizó un estudio preliminar en donde se observó que el etanol presenta toxicidad sobre los trofozoitos de *E. histolytica*, además de que interfiere en su desenquistamiento *in vitro*. Este estudio fue realizado siguiendo la metodología que se describe a continuación en donde como control de manipuleo se emplearon cultivos con 0.8 ml de etanol absoluto, en los que posteriormente se cuantificó el porcentaje de trofozoitos viables de *E. histolytica* mediante una observación microscópica en donde se utilizó lugol como colorante de contraste. El resultado que se obtuvo en este estudio fue un 100 % mortalidad de trofozoitos; el criterio que establece la mortalidad de la forma parasitaria fue el rompimiento del ectoplasma y del endoplasma, además de la excesiva granulación de este último, la ausencia de inclusiones de almidón, la destrucción total del núcleo y la nula absorción del colorante. Con estos resultados, se decidió disminuir la cantidad de etanol presente en el cultivo para de esta manera establecer una concentración que no interfiriera con el desenquistamiento de la forma

parasitaria. Se utilizaron así concentraciones bajas de etanol (10, 20 y 30 %), pero al realizar la observación microscópica el resultado obtenido nuevamente fue de 100 % de mortalidad de trofozoitos. Por esta razón, la actividad amebicida fue evaluada utilizando únicamente los extractos acuosos de las plantas en estudio.

#### 4.4.2 Actividad amebicida

La evaluación de la actividad amebicida se realizó sobre trofozoitos de *E. histolytica* obtenidos por el método de cultivo “Monoxénico de Robinson” (Kretschmer, 1994), a partir de materia fecal en la cual se corroboró la presencia de quistes del parásito. La técnica se llevó a cabo en las siguientes etapas:

- a) Siembra: Se recolectó una muestra de materia fecal sin conservador (en la que se demostró con anterioridad la presencia de quistes de *E. histolytica*) y se colocaron con un aplicador de madera aproximadamente 50 mg de ella en un frasco de vidrio con agar salino en forma inclinada, se agregaron 0.2 ml de una mezcla de antibióticos (Estreptomicina 1 g y Penicilina G sódica cristalina 1 000 000 U), 5 mg de almidón de arroz en polvo, el frasco se aforó con medio BR (Bacteria *E. coli* cepa “B5” y medio de sales a pH de 9.2) y se dejó incubar por un periodo de 24 h a 37 °C.
- b) Enriquecimiento: Del frasco que contenía el cultivo de materia fecal, se eliminaron las tres cuartas partes del líquido sobrenadante (aproximadamente 3 ml), se adicionaron nuevamente 0.2 ml de la mezcla de antibióticos, 0.2 ml de peptona al 20 %, 5 mg de almidón de arroz en polvo y se aforó con medio BRS (ftalato de potasio, medio BR y suero bovino desactivado en partes iguales), se incubó por 24 h a 37 °C (Palacios, 1999).
- c) Observación: Transcurrido el tiempo de incubación, se eliminaron 3 ml del cultivo de materia fecal y con una pipeta pasteur se homogenizó el inóculo encontrado en el fondo del frasco, del cual se tomó una muestra con la que se preparó un frotis con lugol como colorante de contraste y posteriormente se observó al microscopio con el objetivo de 40x con la finalidad de observar la presencia o ausencia de formas móviles (trofozoitos).
- d) Aplicación de tratamientos: Una vez que se comprobó el desenquistamiento de la amiba mediante la observación microscópica de los trofozoitos en el cultivo, aproximadamente 1 200 000 trofozoitos/ml contados en cámara de Neubauer (inóculo estandarizado) (Bernard, 1993 y Ponce y Col., 1994), se adicionó en cada uno de estos cultivos el tratamiento correspondiente que consistió en 0.8 ml de los extractos acuosos de *D. setifolia*, *H. spinulosus*, *P. hysterothorus* y *S. procumbens*. Como referencia de actividad amebicida se utilizaron 25 mg del fármaco de acción intraluminal diiodohidroxiquinoleína disueltos en 0.8 ml de agua destilada estéril. Como control de desenquistamiento se emplearon cultivos sin tratamiento y como control de manipuleo se adicionaron 0.8 ml de agua destilada estéril. Todos los cultivos fueron manipulados de acuerdo a la técnica establecida (Palacios, 1999).

Después de la aplicación de dichos tratamientos, se agregaron los nutrientes necesarios para el adecuado desarrollo de los trofozoitos (Anexo V), estos fueron: 0.1 ml de la mezcla de antibióticos, 0.1 ml de peptona al 40 %, 5 mg de almidón de arroz en polvo, y el frasco se aforó con medio BRS hasta el tope, se incubaron 48 h a 37 °C. Posteriormente se realizó la cuenta de trofozoitos viables y no viables, para este fin fue necesario colocar 50 µl del homogenizado del cultivo, 50 µl de solución Rigel y 100 µl de lugol, enseguida se tomaron 10 µl de esta mezcla y se colocaron en la cámara de Neubauer para efectuar la evaluación en porcentaje con solución Rigel, y lugol como colorante de contraste (Bernard, 1993 y Ponce y Col., 1994).

#### **4.4.3 Criterios de evaluación**

Los tratamientos fueron aplicados y evaluados a intervalos de 48 h, tres veces consecutivas y se determinó el porcentaje de mortalidad de los trofozoitos en cada uno de ellos.

#### **4.4.4 Estandarización del inóculo de trofozoitos**

Como se mencionó, para la aplicación de los tratamientos fue necesario tener aproximadamente 1 200 000 trofozoitos/ml en cada uno de los cultivos, lo cual se logró al colocar 50 µl del homogenizado del cultivo, 50 µl de solución Rigel y 100 µl de lugol, este procedimiento se realizó 20 veces en 20 cultivos y se contaron en una cámara de Neubauer; posteriormente se obtuvo la media de trofozoitos/ml. (Cuadro 2) y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Células/mm}^3 = \text{CC/CGC} \times \text{D} \times 10$$

Donde:

CC = Número de la media de células contadas

CGC = Número de cuadrantes contados

D = Factor de dilución (1 ml = 1000 µl)

10 = Factor que transforma la superficie de los mm<sup>2</sup> (1/10 mm<sup>3</sup>) a volumen en mm<sup>3</sup>

(Bernard, 1993)



## CÁLCULO

$$\begin{aligned}\text{Trofozoitos/ml} &= 120/4 \times 1000 \times 10 = 300\,000 \text{ trofozoitos/ml} \\ \text{Dilución utilizada} &= 1:4 \\ \text{Por lo tanto: } &300\,000 \text{ trofozoitos/ml} \times 4 = 1\,200\,000 \text{ trofozoitos/ml}\end{aligned}$$

**Cuadro 2.** Número total de trofozoitos/ml contados en cámara de Neubauer.

NÚMERO DE CULTIVO	No. DE TROFOZOITOS/ml
1	110
2	118
3	114
4	125
5	116
6	130
7	122
8	119
9	120
10	130
11	117
12	115
13	121
14	117
15	124
16	119
17	124
18	125
19	118
20	124
N = 20	Media = 120

### 4.4.5 Diseño experimental

Fue un estudio experimental, longitudinal y prospectivo (Méndez y Col., 1996), con base en un diseño completamente al azar. Los resultados de la mortalidad de trofozoitos en porcentaje se normalizaron mediante la transformación arcoseno y se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$  en donde se utilizó el programa NCSS (Hintze, 1992), seguida de una comparación múltiple de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) en donde se aplicó el paquete de diseños experimentales FAUANL (Olivares, 1994). El número de repeticiones fueron cinco para cada tratamiento, con lo que

se cumplió la limitante de los grados de libertad del error, que deben ser mayor de 10 para darle confiabilidad a los resultados que se obtengan en el experimento (Reyes, 1983).

#### **4.5 Evaluación de la actividad antibacterial**

Esta evaluación se efectuó con los extractos vegetales acuosos y etanólicos de las plantas en estudio sobre *Salmonella enteritidis* (S-200), *Salmonella typhi* (St-001), *Shigella boydii* (Shb-001), *Shigella dysenteriae* (Shd-001), *Shigella flexneri* (Shf-001), *Shigella sonnei* (Shs-001) y *Escherichia coli* no patógena a través del método de difusión en agar Mueller-Hinton (M-H) (Anexo VI) con la técnica de pozo (Koneman y Col., 1997 y Cárdenas, 1998).

##### **4.5.1 Identificación bioquímica de las bacterias en estudio**

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por el Cepario de la FCQ de la UASLP y su identificación se verificó mediante una batería de pruebas bioquímicas clásicas y de selección a través de diversos métodos (Cuadro 3), además se utilizaron pruebas serológicas para la identificación de aislamientos de *Shigella*.

##### **4.5.2 Estandarización del inóculo de las bacterias en estudio**

Para preparar la suspensión bacteriana (inóculo estandarizado), una o dos colonias recuperadas de un cultivo de 24 h fueron inoculadas con una asa estéril en tubos con 5 ml de agua destilada estéril, se mezclaron en vórtex y la turbidez fue ajustada con el estándar de 0.5 de Mac Farland ( $1 \times 10^6$  a  $1 \times 10^8$  UFC/ml).

##### **4.5.3 Validación de la actividad antibacterial de los extractos**

Una vez obtenida la suspensión estandarizada, se realizó la inoculación en las cajas de petri con agar M-H con un hisopo de algodón estéril, mediante la técnica de siembra masiva y posteriormente con un asa estéril se perforaron pozos de 6 mm de diámetro en el centro de la caja, donde fue depositado cada uno de los tratamientos correspondientes (75µl de cada uno de los extractos acuosos y etanólicos de las plantas en estudio), se utilizó como control de desarrollo la misma cantidad de agua destilada estéril y etanol absoluto. La cantidad de prueba fue de 15 mg para los extractos acuosos y de 37.5 mg para los extractos etanólicos (referidos a planta seca).

Posteriormente, se dejó incubar de 18 a 24 h a 37 °C. Después de la incubación, la actividad antibacterial fue evaluada con el diámetro de los halos de inhibición de desarrollo alrededor del pozo, en centímetros (Koneman y Col., 1997).

**Cuadro 3.** Identificación bioquímica experimental de las bacterias en estudio.

Prueba bioquímica	<i>S. enteritidis</i> (S-200)	<i>S. typhi</i> (St.-001)	<i>Sh. boydii</i> (Shb-001)	<i>Sh. dysenteriae</i> (Shd-001)	<i>Sh. flexneri</i> (Shf-001)	<i>Sh. sonnei</i> (Shs-001)	<i>E. coli</i>
Arginina	+	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	-	-	-	-	-	+
H <sub>2</sub> S	+	+	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	+
LIA <sup>a</sup>	+	+	-	-	-	-	+
Motilidad	+	+	-	-	-	-	+
Ornitina	+	-	-	-	-	+	+
FEA <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	+
TSI <sup>c</sup>	Alc/A,G+	Alc/A,G+	Alc/A	Alc/A	Alc/A	Alc/A	A/A
Úrea	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	+	-	+	-	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-	-	-	+
Malonato	-	-	-	-	-	-	-
D-manitol	+	+	+	-	+	+	+
D-sorbitol	+	+	-	-	-	-	+
D-xilosa	+	+	-	-	-	-	+

<sup>a</sup>Lisina descarboxilasa

<sup>b</sup>Penilalanina desaminasa

<sup>c</sup>Agar triple azúcar hierro; Pendiente/Fondo; Alc= Alcalino; A=Ácido; G=Gas.

#### 4.5.4 Diseño experimental

Fue un estudio experimental, transversal y prospectivo (Méndez y Col., 1996), con base en un diseño completamente al azar y los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia  $\alpha=0.05$  en donde se utilizó el programa NCSS (Hintze, 1992), seguida de una comparación múltiple de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) en donde se aplicó el paquete de diseños experimentales FAUANL (Olivares, 1994). El número de repeticiones fueron cinco para cada tratamiento, con lo que se cumplió la limitante de los grados de libertad del error, que deben ser mayor de 10 para darle confiabilidad a los resultados obtenidos en el experimento (Reyes, 1983).

#### 4.6 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

La CMB de los extractos de las plantas que manifestaron actividad antibacterial, se determinó mediante la técnica de dilución en caldo M-H (Anexo VI).

Se preparó una serie de volúmenes crecientes del extracto activo en tubos de ensayo estériles. Los volúmenes empleados para los extractos acuosos (200 mg/ml) fueron de 0.25 ml a 3.0 ml, equivalentes a un rango de 12.5 mg hasta 150 mg de planta seca/ml de sustrato. A cada uno de ellos se le adicionó caldo M-H hasta tener un volumen final de 4 ml. Se inocularon 100  $\mu$ l del inóculo estandarizado ( $1 \times 10^5$  UFC/ml) de la bacteria correspondiente. Se incubaron de 18 a 24 h a 37 °C, se homogenizaron por agitación en vortex y enseguida se sembraron 100  $\mu$ l de este cultivo líquido en la superficie de tubos con agar M-H en forma inclinada, se incubaron por un periodo de 18 a 24 h a 37 °C. Se utilizó control de desarrollo con agua destilada estéril.

De cada extracto vegetal y del control de desarrollo con agua destilada estéril, se realizaron cinco repeticiones. Transcurrido el tiempo de incubación de las resiembras, se leyeron los resultados obtenidos.

Para los extractos etanólicos (500 mg/ml), fue necesario eliminar el etanol mediante su evaporación en estufa a 37 °C, los volúmenes utilizados oscilaron entre 0.25 ml a 3.0 ml que correspondió a un rango de 31.25 mg hasta 375 mg de planta seca/ml de sustrato. Una vez obtenido el residuo seco, se redisolvió en 150  $\mu$ l de etanol absoluto (previamente se estableció que este volumen es la máxima cantidad de etanol permitida en el medio de cultivo que no interfiere con el desarrollo bacteriano). A cada tubo se le adicionó un volumen de 4 ml de caldo M-H y 100  $\mu$ l del inóculo estandarizado ( $1 \times 10^5$  UFC/ml) de la bacteria correspondiente, para enseguida incubarlos de 18 a 24 h a 37 °C. Después de este tiempo, los cultivos líquidos fueron homogenizados y sembrados en la superficie de tubos con agar M-H inclinado y se incubó nuevamente de 18 a 24 h a 37 °C. Se utilizó como control de desarrollo etanol.

De cada extracto vegetal y del control de desarrollo con etanol, se realizaron cinco repeticiones. Después del periodo de incubación de las resiembras, se realizó la lectura de resultados (Koneman y Col., 1997).

#### **4.6.1 Criterio de evaluación**

La concentración bactericida se determinó en base a la mínima cantidad de extracto vegetal necesario para matar a la bacteria *in vitro* con la ausencia de desarrollo bacteriano en las resiembras en agar M-H, en las cinco repeticiones efectuadas.

#### **4.6.2 Diseño experimental**

La determinación de la CMB no se analizó estadísticamente, puesto que representa un valor puntual.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El empleo de plantas con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial y nunca ha dejado de tener vigencia debido a que es un recurso de fácil obtención y aplicación, sobre todo en aquellas poblaciones en donde no se tiene acceso a los servicios básicos de salud y a las medicinas de patente (Anónimo c, 2000). En general, estas plantas se venden en mercados, tianguis y puestos ambulantes en diferentes formas (frescas, secas, en trocitos o incluidas en pomadas, cremas, jarabes, etc), pero también los pobladores de ciertas comunidades pueden obtenerlos del campo y consumirlos ellos mismos, pero en cierta forma esto representa un peligro debido a que las plantas pueden presentar efectos adversos si no son utilizadas con el debido cuidado. Por esta y otras razones, es necesario realizar un control de calidad así como estudios que avalen científicamente las propiedades curativas de estas plantas, con la finalidad de asegurar su actividad terapéutica (Kravzov y Col., 2000).

En el presente trabajo se estudiaron cuatro plantas regionales, de las que se encontró escasa información acerca de su actividad amebicida y antibacterial y solamente se menciona que son utilizadas para trastornos gastrointestinales en las comunidades rurales de el estado de San Luis Potosí (Juárez y Col., 1996).

### 5.1 Estudio fitoquímico preliminar

El estudio fitoquímico preliminar se realizó mediante reacciones de coloración, precipitación y cromatografía en capa fina con los extractos acuosos y etanólicos de las plantas en estudio, en donde se detectó la presencia de diferentes grupos de metabolitos secundarios como pectinas, taninos, flavonoides, alcaloides y lactonas sesquiterpénicas (Cuadro 4), que de acuerdo a la literatura, poseen distintas acciones terapéuticas.

Las pectinas pueden contribuir a la retención de agua, y disminuir notablemente el proceso diarreico (Shaw, 2000); los taninos tienen la propiedad de ligar las proteínas de la mucosa, transformándolas en sustancias insolubles y resistentes, lo que protege de irritantes e impide además la absorción de toxinas bacterianas, dando como resultado una acción antidiarreica (Anónimo e, 2000); los flavonoides cuentan con estudios en donde se demuestra que poseen actividad antibacterial al utilizar la decocción liofilizada de *Euphorbia hirta* para tratar la disentería y otras enfermedades gastrointestinales además de actuar también contra hongos y virus (Harbone y Williams, 2000); los alcaloides son relajantes, disminuyen el tono y la contracción intestinal si se utilizan con moderación, de otra forma podrían ser tóxicos (Shaw, 2000); y por último, las lactonas sesquiterpénicas poseen actividad antibacterial y amebicida, aunque pueden llegar a ser tóxicas (Dominguez, 1969).

Observando los compuestos que contienen las especies vegetales estudiadas, se podrían explicar las propiedades medicinales que se les atribuyen al combatir especies patógenas que resultan importantes por su frecuencia en infecciones gastrointestinales, como son los parásitos *E. histolytica* y bacterias del género *Shigella* y *Salmonella*, además de otros grupos de metabolitos secundarios que contribuyen a disminuir la diarrea, síntoma principal de estas enfermedades, mediante alguno de los mecanismos ya mencionados.

**Cuadro 4.** Estudio fitoquímico preliminar de los extractos acuosos y etanólicos de *D. setifolia*, *H. spinulosus*, *P. hysterothorus* y *S. procumbens*.

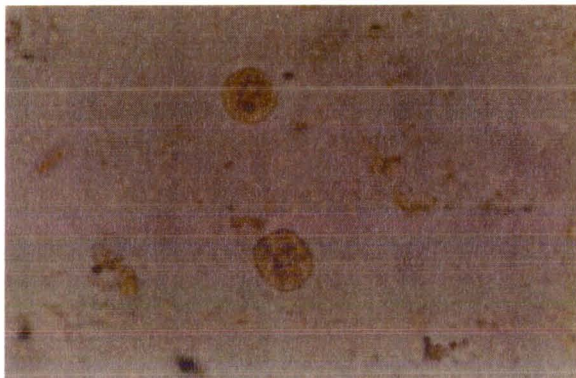
<i>D. setifolia</i>	<i>H. spinulosus</i>	<i>P. hysterothorus</i>	<i>S. procumbens</i>
Carbohidratos (EA, EE)	Carbohidratos (EA, EE)	Carbohidratos (EA, EE)	Carbohidratos (EA, EE)
Pectina (EA)	Pectina (EA)	Pectina (EA)	Pectina (EA)
Taninos (EA)	Taninos (EA)	Taninos (EA)	Taninos (EA)
Flavonoides (EA, EE)	Flavonoides (EA, EE)	Flavonoides (EA, EE)	Flavonoides (EA, EE)
	Alcaloides (EE)	Alcaloides (EE)	Alcaloides (EE)
		Lactonas sesquiterpénicas (EE)	

EA = Extracto acuoso      EE = Extracto etanólico

## 5.2 Evaluación de la actividad amebicida

### 5.2.1. Estudio preliminar

Con el estudio preliminar que se realizó como primera parte de esta evaluación, se determinó que el etanol presenta toxicidad sobre los trofozoitos de *E. histolytica*, además de que interfiere en su desenquistamiento *in vitro*. La observación microscópica se realizó con base a las características morfológicas de los trofozoitos viables (ectoplasma claro y definido, endoplasma finamente granuloso, inclusiones de almidón, núcleo, cariosoma central puntiforme y absorción del colorante). Los resultados mostraron un 100 % de mortalidad de la forma parasitaria tanto con el etanol absoluto como en concentraciones de 10, 20 y 30 % (Figura 3). Por esta razón la determinación de la actividad amebicida se efectuó solo con los extractos acuosos de las plantas en estudio.



**Figura 3.** Actividad amebicida *in vitro* del etanol sobre *Entamoeba histolytica* (40x).



### 5.2.2 Actividad amebicida

Los resultados obtenidos indican que todos los extractos vegetales mostraron actividad amebicida, pero se observó aumento progresivo en el porcentaje de mortalidad de trofozoitos para las aplicaciones sucesivas. Los resultados de la actividad amebicida en porcentaje se normalizaron mediante la transformación arcoseno y se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) ( $\alpha=0.05$ ), en donde se muestra que hay diferencias significativas entre ellos (Cuadro 5), por lo que para determinar a cual o a cuales tratamientos se debe dicha actividad se realizó una comparación múltiple de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ) (Cuadro 6).

**Cuadro 5.** Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad amebicida para las tres aplicaciones sucesivas de tratamiento.

PRIMERA APLICACIÓN					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Radio	Prob>F
TRATAMIENTOS	4	4642.54	1160.635	48.12	0.0000
ERROR	20	482.3987	24.11994		
TOTAL	24	5124.939			

SEGUNDA APLICACIÓN					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Radio	Prob>F
TRATAMIENTOS	4	2757.724	689.4313	14.94	0.0000
ERROR	20	923.0929	46.15464		
TOTAL	24	3680.818			

TERCERA APLICACIÓN					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Radio	Prob>F
TRATAMIENTOS	4	1706.295	426.5736	20.69	0.0000
ERROR	20	412.3162	20.61581		
TOTAL	24	2118.611			

**Cuadro 6.** Mortalidad media en porcentaje de trofozoitos de *E. histolytica* causada por los extractos acuosos de las cuatro especies vegetales en tres aplicaciones sucesivas.

MEDIAS DEL PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE TROFOZOITOS ♦			
TRATAMIENTO	PRIMERA APLICACIÓN	SEGUNDA APLICACIÓN	TERCERA APLICACIÓN
<i>D. setifolia</i>	70.4 B	81.2 C	89.6 B
<i>H. spinulosus</i>	71.8 B	100.0 A	100.0 A
<i>P. hysterophorus</i>	84.4 A	96.4 AB	100.0 A
<i>S. procumbens</i>	34.4 C	86.0 BC	91.4 B
Diyodohidroxiquinoleína	29.2 C	100.0 A	100.0 A
*Tukey ( $\alpha=0.05$ )	9.2906	12.8518	8.5893

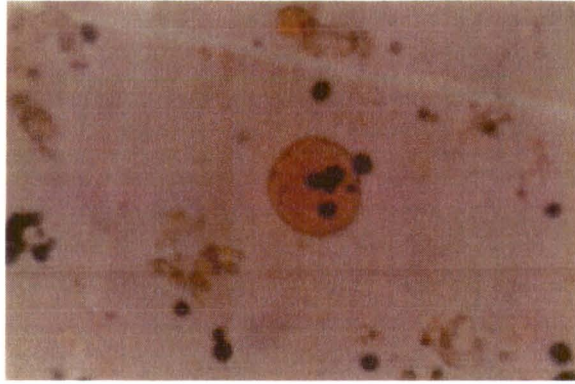
♦ Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí.

Con esta comparación se estableció que en la primera aplicación todos los extractos evaluados superaron en porcentaje de mortalidad de trofozoitos al fármaco de acción intraluminal diyodohidroxiquinoleína, pero el que obtuvo mayor porcentaje fue el extracto acuoso de *P. hysterophorus* con un 84.4 %.

Para la segunda aplicación, los porcentajes obtenidos por los extractos de *D. setifolia*, *P. hysterophorus* y *S. procumbens* fueron superiores al 80 % de mortalidad, pero el extracto de *H. spinulosus* mostró un valor del 100 % (porcentaje similar al obtenido con diyodohidroxiquinoleína, control positivo de mortalidad de trofozoitos).

En la tercera aplicación, solamente los extractos de *H. spinulosus* y *P. hysterophorus* obtuvieron un 100 % de mortalidad de trofozoitos, mientras que el fármaco se mantuvo en el mismo porcentaje. Estos resultados indican la similitud en la actividad amebicida que presentan estos extractos vegetales acuosos con uno de los principales fármacos de elección que se utiliza para tratar la amibiasis.

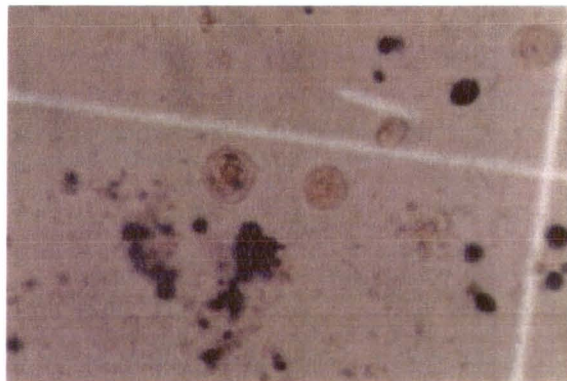
Por otra parte el cultivo con agua destilada estéril y el control de desarrollo sin tratamiento no presentaron alteración en cuanto a la viabilidad de los trofozoitos, dado que las características morfológicas permanecieron intactas (ectoplasma claro y definido, endoplasma finamente granuloso, inclusiones de almidón, núcleo, cariosoma central puntiforme y absorción del colorante), mientras que los cultivos con diyodohidroxiquinoleína manejados como un control positivo de mortalidad de trofozoitos de *E. histolytica* presentaron alteraciones importantes en su morfología similares a las observadas con los diferentes extractos vegetales, estas fueron el rompimiento del ectoplasma y del endoplasma, la excesiva granulación de éste último, la ausencia de inclusiones de almidón, la destrucción total del núcleo y la nula absorción del colorante (Figura 4).



a) Control de desarrollo.



b) Aplicación de diyodohidroxiquinoleína.

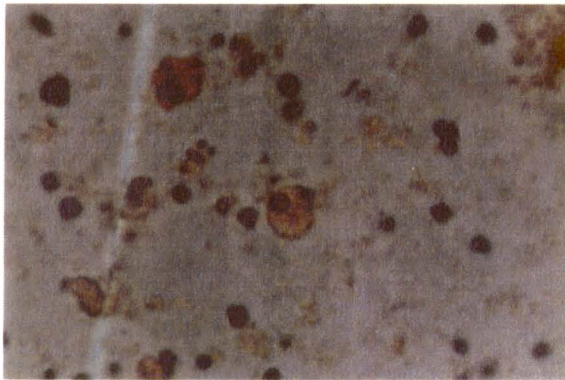


c) Extracto acuoso de *D. setifolia*.

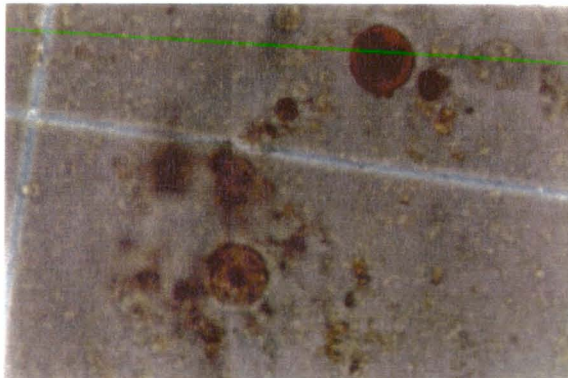
**Figura 4.** Actividad amebicida *in vitro* sobre *Entamoeba histolytica* (40x).



d) Extracto acuoso de *H. spinulosus*.



e) Extracto acuoso de *P. hysterothorus*.



f) Extracto acuoso de *S. procumbens*.

### 5.3 Evaluación de la actividad antibacterial

El número de extractos vegetales que mostraron actividad antibacterial varió para cada microorganismo. Debido a estas variaciones, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) ( $\alpha=0.05$ ) que, aplicado a cada bacteria indica diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 7).

Después de establecer la existencia de diferencias significativas en la acción de los diferentes extractos vegetales se procedió a determinar a cual o a cuales de ellos se debe su actividad por medio de una comparación múltiple de medias de Tukey ( $\alpha=0.05$ ), en donde se obtuvieron los siguientes resultados: Para los extractos acuosos, los cuatro manifestaron pobre actividad antibacterial en forma general, solamente *H. spinulosus* y *P. hysterothorus* fueron activos, el primero mostró actividad sobre *Sh. flexneri* y el segundo sobre *Sh. boydii* (Figura 5).

Los cuatro extractos etanólicos manifestaron actividad antibacterial contra *S. enteritidis*, *Sh. boydii* y *Sh. sonnei*; *S. typhi* mostró susceptibilidad a los extractos de *D. setifolia* y *P. hysterothorus*; *Sh. dysenteriae* fue susceptible a los extractos de *D. setifolia*, *H. spinulosus* y *P. hysterothorus* y por último, *Sh. flexneri* mostró halo de inhibición de desarrollo con los extractos de *D. setifolia*, *P. hysterothorus* y *S. procumbens* (Figura 6). Por otra parte, se estableció que el mejor tratamiento para *S. typhi*, *Sh. boydii*, *Sh. dysenteriae* y *Sh. flexneri* fue el extracto etanólico de *D. setifolia* (con halos de inhibición que van de 1.44 a 1.78 cm), para *S. enteritidis* el extracto etanólico de *S. procumbens* (1.52 cm) y para *Sh. sonnei* el extracto etanólico de *P. hysterothorus* (1.30 cm) (Cuadro 8). Cabe destacar que la cepa de *E. coli* no patógena no resultó afectada por ningún extracto acuoso o etanólico, lo cual es lo ideal, ya que la cepa evaluada forma parte de la flora normal del intestino.

Los controles utilizados de agua destilada y etanol absoluto no interfirieron con el desarrollo bacteriano (Figura 5 y 6), a excepción de *S. enteritidis* que mostró ligera susceptibilidad al etanol. Cabe mencionar que en esta fase del estudio, dada la homogeneidad del comportamiento bacteriano (consistente en el rango muy estrecho de los halos de inhibición de desarrollo) no se requiere de un fármaco para establecer la actividad antibacterial, solamente es necesario demostrar que el vehículo no causa inhibición en el desarrollo, por lo que cualquier halo de inhibición se deberá a los principios activos de la planta. Las cepas bacterianas de trabajo son consideradas cepas silvestres de recuperaciones clínicas perfectamente identificadas y con registro, pertenecientes al Cepario de la FCQ de la UASLP.

**Cuadro 7.** Análisis de varianza (ANOVA) de la actividad antibacterial de las especies vegetales sobre Enterobacterias.

<i>S. enteritidis</i> (S-200)					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Radio	Prob>F
TRATAMIENTOS	9	19.0722	2.119134	2354.59	0.0000
ERROR	40	0.036	8.999E-04		
TOTAL	49	19.1082			

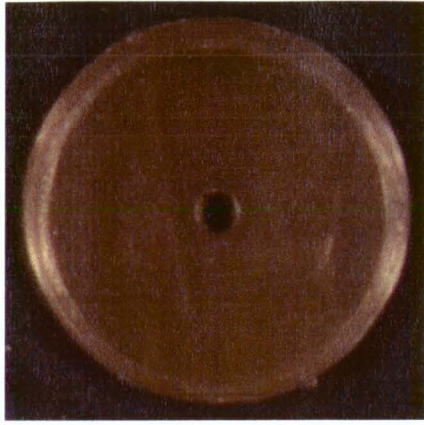
<i>S. typhi</i> (St-001)					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Radio	Prob>F
TRATAMIENTOS	9	18.4232	2.047022	2274.47	0.0000
ERROR	40	3.599E-02	8.999E-04		
TOTAL	49	18.4592			

<i>Sh. boydii</i> (Shb-001)					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Radio	Prob>F
TRATAMIENTOS	9	20.6688	2.296534	2087.76	0.0000
ERROR	40	0.044	0.0011		
TOTAL	49	20.7128			

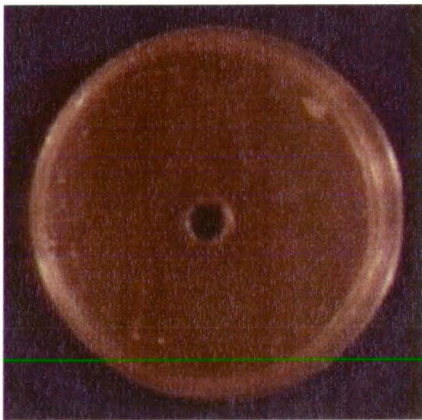
<i>Sh. dysenteriae</i> (Shd-001)					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Radio	Prob>F
TRATAMIENTOS	9	22.2408	2.4712	4942.40	0.0000
ERROR	40	1.999E-02	4.999E-04		
TOTAL	49	22.2608			

<i>Sh. flexneri</i> (Shf-001)					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Radio	Prob>F
TRATAMIENTOS	9	20.4832	2.275911	2069.01	0.0000
ERROR	40	4.400E-02	0.0011		
TOTAL	49	20.5272			

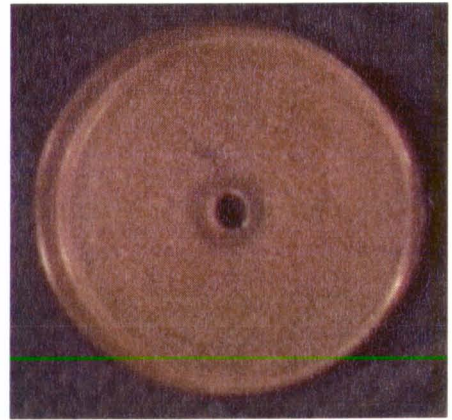
<i>Sh. sonnei</i> (Shs-001)					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F-Radio	Prob>F
TRATAMIENTOS	9	17.372	1.930222	1608.52	0.0000
ERROR	40	4.799E-02	1.199E-03		
TOTAL	49	17.42			



a) Vehículo Agua (0.0 cm).

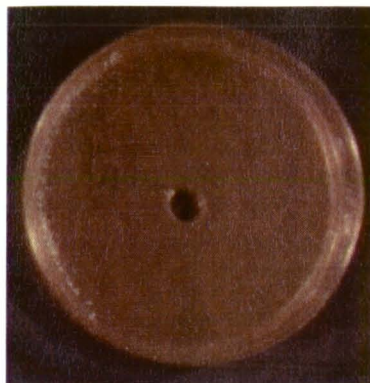


b) Extracto acuoso de *H. spinulosus* sobre *Sh. flexneri* (1.4 cm).

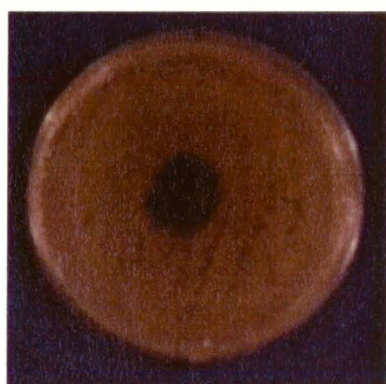


c) Extracto acuoso de *P. hysterophorus* sobre *Sh. boydii* (1.1 cm).

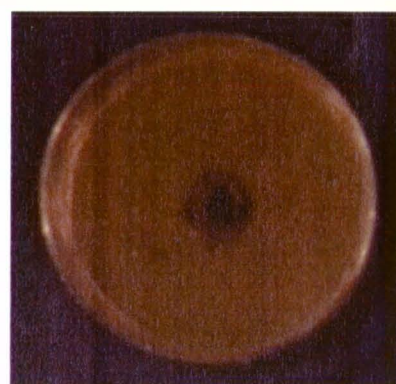
**Figura 5.** Actividad antibacterial *in vitro* de los extractos vegetales acuosos sobre Enterobacterias.



a) Vehículo Etanol (0.0 cm).



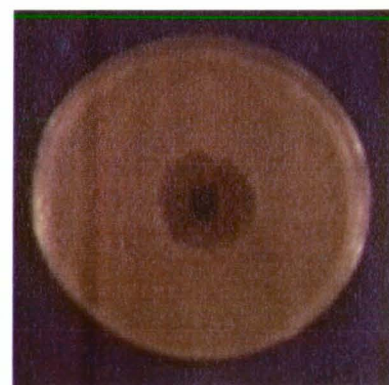
b) Extracto etanólico de *D. setifolia* sobre *Sh. dysenteriae* (1.8 cm).



c) Extracto etanólico de *H. spinulosus* sobre *Sh. boydii* (1.1 cm).



d) Extracto etanólico de *P. hysterophorus* sobre *S. typhi* (1.0 cm).



e) Extracto etanólico de *S. procumbens* sobre *S. enteritidis* (1.6 cm).

**Figura 6.** Actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos vegetales etanólicos sobre Enterobacterias.



**Cuadro 8.** Inhibición del desarrollo (cm) en los cultivos de Enterobacterias por efecto de los extractos acuosos y etanólicos de las especies vegetales en estudio.

BACTERIA	♦ MEDIAS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE DESARROLLO								Tukey		
	<i>D. setifolia</i>	<i>H. spinulosus</i>	<i>P. hysterothorus</i>	<i>S. procumbens</i>	Agua	Etanol	Agua	Etanol			
	EA	EE	EA	EE	EA	EE	EA	EE			
<i>S. enteritidis</i> (S-200)	0.00 E	1.20 C	0.00 E	1.16 C	0.00 E	1.28 B	0.00 E	1.52 A	0.00 E	0.78 D	0.0636
<i>S. typhi</i> (St.-001)	0.00 C	1.78 A	0.00 C	0.00 C	0.00 C	1.18 B	0.00 C	0.00 C	0.00 C	0.00 C	0.0636
<i>Sh. boydii</i> (Shb-001)	0.00 C	1.78 A	0.00 C	1.08 B	1.08 B	1.12 B	0.00 C	1.06 B	0.00 C	0.00 C	0.0703
<i>Sh. dysenteriae</i> (Shd-001)	0.00 D	1.76 A	0.00 D	1.20 C	0.00 D	1.32 B	0.00 D	0.00 D	0.00 D	0.00 D	0.0474
<i>Sh. flexneri</i> (Shf-001)	0.00 D	1.44 A	1.34 B	0.00 D	0.00 D	1.36 B	0.00 D	1.02 C	0.00 D	0.00 D	0.0703
<i>Sh. sonnei</i> (Shs-001)	0.00 D	1.22 B	0.00 D	1.16 BC	0.00 D	1.30 A	0.00 D	1.12 C	0.00 D	0.00 D	0.0734
<i>E. coli</i> no patógena	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.00 A	0.0000

♦ Medias con la misma letra no son significativamente diferentes entre sí.

EA= Extracto acuoso

EE = Extracto etanólico

**Cuadro 9.** Concentración mínima bactericida (mg de planta seca/ml de sustrato) de los extractos etanólicos de las cuatro especies vegetales del Altiplano Potosino.

BACTERIA	CMB (mg/ml)			
	<i>D. setifolia</i>	<i>H. spinulosus</i>	<i>P. hysterothorus</i>	<i>S. procumbens</i>
<i>S. enteritidis</i> (S-200)	>375.0	>375.0	312.5	>375.0
<i>S. typhi</i> (St-001)	250.0	312.5	250.0	>375.0
<i>Sh. boydii</i> (Shb-001)	250.0	250.0	187.5	250.0
<i>Sh. dysenteriae</i> (Shd-001)	250.0	250.0	>375.0	>375.0
<i>Sh. flexneri</i> (Shf-001)	375.0	250.0	312.5	>375.0
<i>Sh. sonnei</i> (Shs-001)	281.2	312.5	250.0	>375.0

## 6. CONCLUSIONES

Los flavonoides, alcaloides y lactonas sesquiterpénicas encontrados en las plantas *D. setifolia*, *H. spinulosus*, *P. hysterothorus* y *S. procumbens*, podrían ser los responsables de la actividad amebicida y antibacteriana.

Las cuatro especies evaluadas manifestaron *in vitro* actividad amebicida. Los extractos acuosos de *H. spinulosus* y *P. hysterothorus* tienen una actividad *in vitro* similar al fármaco de acción intraluminal diiodohidroquinoleína.

Las cuatro especies de Asteraceas poseen actividad antibacteriana *in vitro* sobre *S. enteritidis*, *S. typhi*, *Sh. boydii*, *Sh. dysenteriae*, *Sh. flexneri* y *Sh. sonnei*, sin causar inhibición en el desarrollo de *E. coli* no patógena.

Los extractos etanólicos de las plantas que manifestaron la mayor actividad bactericida *in vitro* fueron los extractos de *D. setifolia*, *H. spinulosus* y *P. hysterothorus*.

Los grupos de metabolitos secundarios obtenidos por extracción con etanol resultaron ser más eficaces contra Enterobacterias del género *Salmonella* y *Shigella* que las obtenidas con la extracción acuosa.

De acuerdo con los resultados obtenidos, los extractos acuosos de *H. spinulosus* y *P. hysterothorus* por su acción amebicida y los extractos etanólicos de *D. setifolia*, *H. spinulosus* y *P. hysterothorus* por su acción bactericida, constituyen una posible alternativa terapéutica contra las infecciones gastrointestinales causadas por estos agentes infecciosos.

## 7. RECOMENDACIONES

- La producción de metabolitos secundarios depende de las condiciones de desarrollo de las plantas, por lo que éstas deberían evaluarse en diferentes etapas fenológicas, con la finalidad de conocer si los resultados coinciden con los obtenidos en esta investigación.
- Los flavonoides y lactonas sesquiterpénicas podrían ser los responsables de la actividad amebicida y antibacterial; sin embargo, sería recomendable aislarlos, caracterizarlos y realizar la evaluación de la actividad directamente con los compuestos purificados.
- Dada la variabilidad en el comportamiento de las diversas cepas bacterianas se sugiere establecer el porcentaje de cepas de un mismo microorganismo que son susceptibles a los extractos vegetales activos.
- Las plantas podrían ejercer una acción tóxica a ciertas dosis, por lo cual es importante realizar pruebas toxicológicas *in vivo* para determinar el grado de toxicidad.
- Podría recomendarse ampliar este estudio al evaluar estas especies vegetales con animales de experimentación infectados con los microorganismos utilizados, para conocer su actividad *in vivo*.

## 8. GLOSARIO

**Aerobio:** (Gr *aero* aire). Que crece o metaboliza solamente en presencia de oxígeno molecular.

**Ameboma:** Granuloma amebiano; foco nodular, pseudotumoral de inflamación proliferativa, se desarrolla en la pared del colon en la amibiasis crónica.

**Anaerobio:** Organismo capaz de vivir y crecer en ausencia de oxígeno libre.

**Anguloso:** (del lat. *angulosus*), adj. Que tiene ángulos, lo mismo si se trata de un órgano laminar, que si se refiere a otro macizo.

**Ápice:** (del lat. *apex, -icis*), m. Término usual empleado en bot. En el sentido corriente en cuanto nos referimos al ápice geométrico del órgano respectivo (ápice de la hoja, del fruto, etc).

**Aquenio:** (del neol. lat. *achaeonium*), m. En general fruto seco y monospermo, con el pericarpo independiente de la semilla, es decir, no soldado con ella.

**Arvense:** (del lat. *arvensis*, de *arvum*, campo), adj. Proveniente de la vegetación subserial que invade los cultivos y prados artificiales.

**Bacteremia:** Presencia de bacterias viables en la sangre.

**Bráctea:** (del lat. *bractea*, chapita metálica o de madera empleada, sobre todo en ornamentación), f. Cualquier órgano foliáceo situado en la proximidad de las flores y distinto por su forma, tamaño, consistencia, color, etc., de las hojas normales y de las que, transformadas, constituyen el cáliz y la corola.

**Calículo:** (del lat. *calyculus*, dim de *calyx*, cáliz o botón floral), m. Así se llama al conjunto de apéndices de los sépalos que, situados junto a la parte extrema del cáliz dan la impresión, en las flores que lo tienen, de un verticilo calicino suplementario, de donde los nombres de epicáliz o sobrecáliz con que también se les conoce.

**Campanulado, da:** (del lat. *campanulatus*), adj. De forma semejante a la de una campana, como la corola de muchas campanuláceas y singularmente de las especies del género *Campanula*.

**Ciliado, da:** (del lat. *ciliatus*, provisto de cejas), adj. Aplícase a cualquier órgano u organismo que tiene cilios.

**Citotoxina:** Sustancia específica que inhibe o impide las funciones de las células.

**Cuneado:** (del lat. *cuneatus*), adj. Sin. de cuneiforme (cuna).

**Cuneiforme:** (del lat. *cuneiformis*, der. a su vez de *cuneus*) adj. De figura de cuña o parecido a la sección longitudinal de una cuña, cuando se trata de órganos laminares, como las hojas, que es lo más frecuente.

**Edema:** (del griego *oidema*, hinchazón), m. Acumulación de cantidad excesiva de líquido acuoso en células, tejidos o cavidades serosas.

**Endotoxina:** Toxina intracelular que no pasa libremente al medio.

**Enterocolitis:** Inflamación de la mucosa o de una parte mas o menos grande del intestino delgado o grueso.

**Escabroso, sa:** (del lat. *scabrosus*), adj. Lleno de asperezas, de tricomas cortos y rígidos que se aprecian bien con el tacto.

**Estenosis:** (del gr. *stenósis*, estrechamiento), f. Estrechamiento de cualquier conducto.

**Exotoxina:** Toxina extracelular que se forma dentro de la célula pero es liberada al medio.

**Fístula:** Vía o pasaje anormal desde un órgano hueco a la superficie o de un órgano a otro.

**Glanduloso, sa:** (del lat. *glandulosus*), adj. Que tiene glándulas.

**Hepatomegalia:** Agrandamiento del hígado.

**Hermafrodita:** adj. Aplícase a las plantas y a las flores en que concurren los dos sexos. Las flores hermafroditas poseen androceo y gineceo.

**Hiperplasia:** Aumento del número de células de un tejido.

**Invólucro:** (del lat. *involucrum*, envoltura o cubierta), m. En general, se dá este nombre a todo conjunto de brácteas, que hallándose próximo a las flores, las rodea o envuelve en mayor o menor grado.

**Lanceolado, da:** (del lat. *lanceolatus*, der. de lanceola, dim. de lancea, lanza), adj. Aplícase a los órganos laminares, como hojas, brácteas, pétalos, etc., angostamente elípticos y apuntados en ambos extremos.

**Lígula:** (del lat. *lígula*, como lingula, Der. de lingua, lengua), f. Cada una de las corolas tridentadas o quinquedentadas, que poseen flores en la periferia o de toda la inflorescencia. Dícese así porque semejan una lengüecita.

**Limbo:** (del lat. *limbus*, cinta, franja o ribete), m. En las corolas gamopétalas, la parte libre de los pétalos, que forma como una orla en el extremo del tubo.

**Linear o lineal:** (del lat. *linearis*), adj. Prolongado y angosto de bordes paralelos, comparable a una línea de trazo grueso.

**Luminal:** Relativo al lumen de un vaso sanguíneo o estructura tubular.

**Metástasis:** Desplazamiento de una enfermedad o sus manifestaciones locales de una parte del cuerpo a otra.

**Necrosis:** (del gr. *nekrosis*, muerte), f. Muerte patológica de una o mas células o parte de un tejido u órgano.

**Obcónico, ca:** (de ob- y conico), adj. De forma cónica invertida, es decir, con la base en la parte superior.

**Páleas:** (del lat. *palea*, paja), f. Este término indica órganos y partes orgánicas muy diversas.

**Pápula:** (del lat. *papula*, pápula), f. Pequeña elevación crónica de la piel que afecta la epidermis o la dermis.

**Pecíolo:** (del lat. *petiolus*, que, como *pediolus*, es una forma dim. de pes, pedis, pie, tronco de una planta), m. Pezón o rabillo que une la lámina de la hoja a la base foliar o al tallo.

**Pedúnculo:** (del lat. *pedunculus* dim. de pes, pedis, pie), m. Cabillo o rabillo de una flor, en la inflorescencia simple, o de una inflorescencia.

**Perenne:** (del lat. *perennis*, duradero, indestructible, eterno). adj. Dícese del vegetal que vive tres años o más.

**Perítrico:** Relativo a cilios u otros órganos apendiculares que se proyectan desde la periferia de una célula.

**Pubescencia:** (del lat. *pubescentia*, de *pubescere*, cubrirse de vello), f. Calidad de pubescente o veloso, tendencia a cubrirse de vello.

**Receptáculo:** (del lat. *receptaculum*, lugar o cosa que recibe en sí algo), m. “Es la base que sirve de asiento” a las diversas pertenencias florales de una inflorescencia en capítulo (receptáculo común), en umbela (simple o compuesta).

**Rectosigmoiditis:** Inflamación del recto y colon considerados como unidad.

**Sepsis:** (del gr. *sepsis*, putrefacción), f. Presencia de microorganismos formadores de pus y otros patógenos o sus toxinas en sangre o tejidos.

**Sésil:** (del lat. *sessilis*), adj. Dícese de cualquier órgano o parte orgánica que carece de pie o soporte.

**Tenesmo:** (del gr. *tenesmus*), m. Espasmo doloroso del esfínter anal con deseo urgente para evacuar.

**Tomentoso, sa:** (del lat. *tomentosus*, y éste de *tomentum*, la borra), adj. Dícese de la planta o del órgano que están cubiertos de pelos, generalmente ramificados, cortos y dispuestos muy densamente, por lo que semejan ser borra.

**Tuberculado, da:** (del lat. *tuberculatus*), adj. Con nudosidades o abultamientos semejantes a tuberculos.

**Vilano:** (dícese que der. del lat. *villus*), m. Limbo del cáliz, en un fruto procedente de ovario infero, transformado en pelos simples o plumosos, en cerdas a veces muy rígidas, en escamas, o convertido en una coronita membranosa, como se ve en las familias de las valerianáceas, dipsacáceas y asteráceas.

Los términos botánicos están basados en Font Quer, 1953 y los términos médicos con base en Stedman, 1993.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

Argueta V.A., Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, Instituto Nacional Indigenista, México, pp. 611-612, 1066-1067, Tomo II, 1994.

Atías A., Parasitología médica, Editorial Mediterráneo, Chile, pp. 121 y 122, 1999.

Bernard H.J., Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio, 9ª. Ed., Editorial Masson, pp. 582-584, 1998.

Biagi F., Enfermedades parasitarias, 2ª Ed., La Prensa Médica Mexicana, México, pp. 81, 82, 90, 100 y 101, 1992.

Botero D. y Restrepo M., Parasitosis humanas, 3ª. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas, pp. 17, 1998.

Bruneton J., Elementos de fitoquímica y de farmacognosia, Acriba, España, 1991.

Calderón M.G., Astudillo V.A. y Dávalos V.H., “Aspectos etnobotánicos, químicos y microbiológicos de *Alternanthera repens*”, Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, México, 30, No. 2, Abril-Junio, pp. 22-25, (1999).

Cárdenas O.N.C., “Plantas de la familia Rutaceae con actividad fungicida en *Aspergillus flavus* Link”, Tesis para recibir el grado de Maestría en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, pp. 52-55, (1998).

Cervantes C.M., Villanueva R.G. y Díaz R.Y., Instructivo de prácticas del Laboratorio de Parasitología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Agosto-Diciembre, pp. 8-10, 2001.

Chandrasoma P. y Taylor R.C., Patología general, 2ª. Ed., Editorial El Manual Moderno, México, pp. 615, 629, 634 y 635, 1998.

Cheng G.T., Parasitología general, 1ª. Ed., Editorial AC, España, pp. 208, 1978.

De la Fuente J.R., Uriburu M.L., Burton G. y Sosa V.E., “Sesquiterpene lactone variability in *Parthenium hysterophorus* L.”, Phytochemistry, 55, No. 7, December, pp. 769-772, (2000).

Domínguez S.X.A., “Algunos aspectos químicos y farmacológicos de sustancias aisladas de las plantas descritas en el Código Badiano”, Revista Soc. Química Mexicana, México, Marzo-Abril, pp. 85-88, (1969).

Domínguez S.X.A., Métodos de investigación fitoquímica, Editorial Limusa, México, 1985.

Escobedo Ch.E., Esquivel A., Fernández C.G., Flores N.G., y Jiménez E.I., “Estudio de la eficacia y seguridad de bridimoprim vs trimetoprim-sulfametoxazol en niños con gastroenteritis bacteriana”, Revistas de Enfermedades Infecciosas en Pediatría, México, XIII, No. 52, Abril-Junio, pp. 383, (2000).

Estrada L.E., Lecturas para el diplomado internacional, plantas medicinales de México, Universidad autónoma de Chapingo, 2ª. Ed., pp. 292, 1995.

Font Quer, P., Diccionario de botánica, Labor, 1953.

Grendell H.J., Mcquaid R.K. y Friedman L.S., Diagnóstico y tratamiento en gastroenterología, Editorial El Manual Moderno, México, pp. 139 y 140, 1997.

González S. N. y Santigeral S. P., Guía de antimicrobianos, antivirales, antiparasitarios y antimicóticos, 3ª. Ed., Editorial Mc. Graw Hill-Interamericana, México, pp. 163 y 164, 1992.

Harbone J.B. y Williams C.A., “Advances in flavonoid research since 1992”, Phytochemistry, 55, No. 6, November, pp. 487 y 498, (2000).

Hintze, L.G., NCSS 5. X series, Kaysville, Utah, 1992.

Jawetz E., Melnick J. y Adelberg A.E., Microbiología médica, Editorial El Manual Moderno, México, pp. 267-281, 1999.

Juárez P.M.A., Reyes A.J.A. y Andrade A.J.A., “Flora útil de tres tipos de matorral en el altiplano potosino-zacatecano”, Revista de Geografía Agrícola, Universidad Autónoma de Chapingo, No. 22-23, Enero-Julio, pp. 32-33, (1996).

Katzung G. B., Farmacología básica y clínica, 7ª. Ed., Editorial El Manual Moderno, México, pp. 980 y 981, 1999.

Koneman E.W., Allen D.S., Dowell V.R., Janda W.M., Somemers H.M. y Winni W.C., Diagnóstico microbiológico, 3ª. Ed., Editorial Médica Panamericana, México, pp. 100-102, 602, 612-613, 1997.

Kravzov J.J., Martínez M.A. y Díaz P.C., “Efectos adversos de las plantas medicinales”, Revista de Ciencias Farmacéuticas, México, 31, No. 3, Julio-Septiembre, pp. 17, (2000).

Kretschmer R.R., Amibiasis, infección y enfermedad por *Entamoeba histolytica*, 1ª. Ed., Editorial Trillas, México, pp. 30-33, 267, 268, 1994.

Kumar V., Ramzi S.C. y Stanley C. R., Patología humana, 6ª. Ed., Editorial Mc Graw Hill-Interamericana, México, pp. 293, 294 y 537-541, 1999.

Lemus H., Meckes M., Camorlinga M., De la Rosa P., Torres J. y Muñoz O., "In vitro antimicrobial activity of Helianthemum glomeratum", Pharmacology, 25, pp. 82, (1994).

Lennette H.E., Balows A., Hausler W.J. y Shadomy H.J., Manual de microbiología clínica, 4ª. Ed., Editorial Médica Panamericana, Argentina, pp. 339 y 348, 1989.

Macías G.G.E., "Gastroenteritis por gramnegativos en la infancia", Práctica Pediátrica, México, 7, No. 10, Octubre, pp. 7-10, (1998).

Mandell L.G., Bennett E. J. y Dolin R., Enfermedades infecciosas, principios y práctica, 4ª. Ed., Editorial Médica Panamericana, Argentina, pp. 1051-1059 y 2254-2283, 1997.

Martínez M., Las plantas medicinales de México, 6ª. Ed., Editorial Botas, México, pp. 68, 69 y 462, 1993.

Martínez M., Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas, Fondo de Cultura Económica, México, pp. 208, 393, 649 y 711, 1994.

Martínez P, A., Amibiasis, Editorial Médica Panamericana, México, pp. 17, 43 y 135-137, 1989.

McVaugh R., Flora Novo-Galiciana, A descriptive account of the vascular plants of western México, Vol. 12, E.U.A., pp. 311, 486, 487, 664, 665, 793 y 794, 1984.

Méndez R.I., Nahimira G.D., Moreno A. L y Sosa de M. C., El protocolo de investigación, Editorial Trillas, México, pp. 11-14, 1996.

Murray R.P., Kobayashi S.G., Pfaller A.M. y Rosenthal S.K., Microbiología médica, 2a. Ed., Editorial Hrcourt Brace, España, pp. 227-236, 1997.

Netter, H.F., Colección Ciba de ilustraciones médicas, sistema digestivo, Tomo III, Parte 2, conducto inferior, Ediciones Salvat, pp. 149-156, 1985.

Olarte J., "Etiología de las diarreas infecciosas: viejos y nuevos agentes", Boletín Médico del Hospital Infantil de México, México, 49, No. 3, Marzo, pp. 143, (1992).

Olivares, S.E. Paquetes de diseños experimentales, versión 2.5, Facultad de Agronomía, UANL, México, 1994.

Palacios C.E., "Cultivo monoxénico, una alternativa para la identificación de *Entamoeba histolytica* en el laboratorio", Tesis para recibir el título de Químico-Farmacobiólogo, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, pp. 21-22, 1999.

Pérez G.J.M., "Actividad amebicida y antibacteriana de cinco especies de la familia Asteraceae", Tesis para recibir el título de Químico-Farmacobiólogo, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, pp. 14-17, 2002.

Ponce M.M., Navarro A.I., Martínez G.M.N. y Alvarez Ch. R., “Efecto anti-giardiasico *in vitro* de 14 extractos de plantas”, Revista de Investigaciones Clínicas, México, 46, No. 5, Septiembre-Octubre, pp. 345, (1994).

Reyes C.P., Bioestadística aplicada, Agronomía-Biología-Química, Editorial Trillas, México, pp. 132-162, 1983.

Romero C.R., Microbiología y parasitología humana, bases etiológicas de las enfermedades infecciosas, 2ª. Ed., Editorial Médica Panamericana, México, pp. 291-293, 294-295 y 208-305, 1999.

Rzedowski G. C. de y Rzedowski J., Flora fanerogámica del Valle de México, 2ª. Ed., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Mich., México, pp. 835, 889 y 894, 2001.

Salas de L.S., La familia Compositae en la zona árida de San Luis Potosí, México, 1er. y 2do. Tomo, IIZD, UASLP, San Luis Potosí, México, pp. 97, 99, 158, 199, 232 y 233, 1987.

Shaw N., Guía ilustrada de plantas medicinales, Editorial Könemann, Hong-Kong, China, pp. 6 y 7, 2000.

Stedman, Diccionario de ciencias médicas, 25ª. Ed., Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, Tomo I y II, 1993

Tierney, L.M., Mc Phee S.J y Papadakis M.A., Diagnóstico clínico y tratamiento 2000, 35ª. Ed., Editorial El Manual Moderno, pp. 1375, 2000.

Trease E.G. y Evans W.Ch., Tratado de farmacognosia, 12ª. Ed., Editorial Interamericana, pp. 8-9, 253-272, 1987.

Villareal M. L., Alvarez L., Alonso C. D., Navarro V., García P. y Delgado G., “Cytotoxic and antimicrobial action of selected terpenoids from Asteraceae species”, Pharmacology, 25, pp. 124, (1994).

Zweig G., y Sherma, J., CRC. Handbook of chromatography general data and principles, 7ª Ed., Printing, CRC. Press, Inc. Boca Ratón, Florida, 1984.

#### **Otras fuentes consultadas:**

SEED, Secretaría de Salud Pública, Sistema Epidemiológico y Estadístico de Defunciones (CIE-10), “Servicios de Salud de San Luis Potosí, Departamento de Vigilancia Epidemiológica, Principales causas de morbilidad y mortalidad”, 2000.

Anónimo a, Diarrea, <http://www.ecomedic.com/em/diarrea.htm>, 1998.

Anónimo b, Diarrea crónica, <http://www.tu.salud.com.mx/120601.htm>, 2000.

Anónimo c, Fitoterapia, <http://personal.redestab.es/martin/ptito.htm>, 2000.

Anónimo d, Sanvitalia procumbens Lam, [http://beta.semarnap.gob.mx/ptnm/sanvitalia\\_procumbens.html](http://beta.semarnap.gob.mx/ptnm/sanvitalia_procumbens.html), 2000.

Anónimo e, Fitoterapia básica del aparato digestivo, <http://personal.redestab.es/martin/ptito.htm>, 2000.

## ANEXO I

### REACCIONES DE COLORACIÓN Y PRECIPITACIÓN

#### CARBOHIDRATOS

Para la identificación de carbohidratos se evaluaron únicamente los extractos acuosos de las especies vegetales en estudio mediante las reacciones de Molish y Fehling.

- **Reacción de Molish.** En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 ml del extracto acuoso y se le añadieron 0.5 ml del reactivo de Molish (alfa-naftol sublimado en etanol). Enseguida, se dejó resbalar por las paredes del tubo 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de un anillo púrpura en la interfase se consideró como prueba positiva.

Fundamento: Todos los glúcidos en un medio ácido reaccionan formando hidroximetil furfural (en el caso de las hexosas) y furfural (para las pentosas) y se unen con el alfa naftol para formar un anillo púrpura en la interfase.

- **Reacción de Fehling.** En un tubo de ensaye se colocó 1 ml de extracto acuoso y se agregaron 0.5 ml de cada uno de los reactivos de Fehling (solución de sulfato cúprico y solución de catalizadores), se calentó a baño maría durante 8 min a ebullición. La prueba fue positiva cuando se forma un precipitado rojo ladrillo.

Fundamento: Los azúcares reductores (monosacáridos y algunos disacáridos como la lactosa, maltosa y celobiosa) se oxidan en presencia de sulfato cúprico en un medio alcalino formando ácidos y el cobre se reduce a óxido cuproso (precipitado rojo ladrillo).

#### PECTINA

Para determinar la presencia de pectina, se realizó la prueba de nitrato de torio en donde se utilizaron solamente los extractos acuosos.

- **Prueba del nitrato de torio.** En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 ml del extracto y 0.5 ml de la solución de nitrato de torio. La presencia de una mezcla gelatinosa indicó la presencia de pectina.

Fundamento: Las pectinas se unen al nitrato de torio y forman una masa gelatinosa.

## TANINOS

Para la identificación de taninos se evaluaron los extractos acuosos por medio de la reacción de cloruro férrico y los ensayos de gelatina, Stiasny, catequina, ácido clorogénico y ácido gálico.

- **Reacción de cloruro férrico.** En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 ml del extracto y se le añadieron 2 gotas de cloruro férrico al 1 %. La prueba fue positiva cuando se observó una coloración azul-negro lo que indicó la presencia de taninos gálicos.

Fundamento: Los taninos hidrolizables se colorean de azul-negro al tener contacto con las sales férricas.

- **Ensayo de la gelatina.** A 0.5 ml del extracto acuoso se le agregaron unas gotas de la solución de gelatina al 1 % en solución de cloruro de sodio al 10 %. El ensayo fue positivo cuando se observó la precipitación de las proteínas (turbidez en el tubo).

Fundamento: Los taninos son precipitantes de proteínas y debido a la naturaleza proteica de la gelatina, es precipitada por ellos.

- **Ensayo de Stiasny.** Se colocaron en un tubo de ensayo 0.5 ml del extracto acuoso, enseguida se agregó 1 ml del reactivo de Stiasny (formol al 30 %) y se calentó a baño maría a temperatura inferior a la de ebullición. La formación de grumos floculentos indicó la presencia de taninos catéquicos.

Fundamento: Los catecol-taninos son precipitados de sus soluciones por el formol en medio ácido.

- **Ensayo de la catequina.** Se humedeció una astilla de madera con extracto acuoso, se secó y se humedeció con ácido clorhídrico concentrado; enseguida, se calentó cerca de una llama. La aparición de una coloración roja o rosa en la madera indica una prueba positiva.

Fundamento: Las catequinas por calentamiento con ácidos forman floroglucinol que es detectado por modificaciones del ensayo de la lignina.

- **Ensayo del ácido clorogénico.** En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 ml del extracto acuoso y se añadió 1 ml de solución de amoniaco al 10 % y se dejó reposar. La prueba se consideró positiva cuando se presenta una coloración verde indicando la presencia de ácido clorogénico.

Fundamento: El ácido clorogénico produce una coloración verde cuando se trata con solución acuosa de amoniaco y se expone al oxígeno atmosférico.

- **Ensayo del ácido gálico.** A 0.5 ml del extracto acuoso se añadieron 0.5 ml de cianuro de potasio al 5 %. La producción de una coloración rojiza indica la presencia de ácido gálico.

Fundamento: El ácido gálico en presencia de cianuro de potasio produce un color rojo.

## SAPONINAS

La identificación de las saponinas se llevó a cabo utilizando los extractos acuosos y etanólicos de las especies vegetales mediante las pruebas de la espuma y acción hemolítica, y de las reacciones de Liebermann-Buchard, Rosenheim y Resenthaler.

- **Prueba de la espuma.** En un tubo de ensaye se colocó 1 ml del extracto enseguida se agitó fuertemente durante 3 min. La formación de espuma estable por 15 min y con una altura de 8 mm indica que la prueba es positiva.

Fundamento: Las saponinas producen abundante espuma estable por 15 min y con una altura superior a 8 mm cuando son agitadas en sus soluciones.

- **Prueba de la acción hemolítica.** La prueba fue realizada en tubos de ensaye, en donde se colocó una solución desfibrinizada de glóbulos rojos en solución salina al 0.85 %, se agregó el extracto acuoso isotónico de cada planta y 5 min después se observó la presencia o ausencia de hemólisis.

Fundamento: Las saponinas rompen las paredes de los glóbulos rojos liberando hemoglobina.

- **Reacción de Liebermann-Buchard.** En un tubo de ensaye se colocó 1 ml del extracto, se le añadieron unas gotas de cloroformo y 0.5 ml del reactivo de Liebermann-Buchard (ácido acético y ácido sulfúrico) y se dejó reposar. La reacción fue positiva cuando se observó una coloración azul, verde, amarilla, roja, anaranjada o negra a los 0, 1, 5, 20 y 60 min.

Fundamento: Las saponinas insaturadas o con hidroxilos de tipo esteroideal, triterpenoide tetracíclicas dan colores con reactivos ácidos.

- **Reacción de Rosenheim.** A 0.5 ml del extracto se le añadió 1 ml de ácido tricloroacético al 90 % en agua. Se dejó reposar durante 20 min. La reacción se consideró positiva cuando se produjo una coloración violeta que cambia a un color azul debido a la presencia de dienos.

Fundamento: No es una reacción específica para saponinas, sólo identifica los dienos que al reaccionar con el ácido tricloroacético producen una coloración violeta la cual cambia a color azul después de 20 min.



- **Reacción de Rosenthaler.** En un tubo de ensaye se colocó 1 ml del extracto y se agregaron 2 gotas de la solución de vainillina al 1 % en etanol y 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de un color violeta indica que la reacción es positiva.
- Fundamento: Las saponinas de tipo triterpenoide pentacíclicas reaccionan con la vainillina en presencia de ácido sulfúrico y producen un color violeta.

## HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS

Para los heterósidos cardiotónicos se evaluaron los extractos acuosos y etanólicos mediante las reacciones de Bajlet, Legal, Raymond, Kedde y Keller-Killiani con sus respectivas modificaciones.

- **Reacción de Bajlet.** En un tubo de ensaye se colocaron 0.5 ml del extracto y enseguida se le agregaron 2 gotas de la solución de ácido pícrico al 1 % en etanol y 2 gotas de hidróxido de sodio al 10 %. La reacción fue positiva cuando se observó una coloración roja o naranja oscura.

Fundamento: Esta reacción identifica el núcleo esteroidal presente en la genina de estos compuestos, el cual reacciona con el ácido pícrico y produce una coloración roja.

- **Reacción de Legal.** Se añadieron 2 gotas de una solución recién preparada de nitroprusiato de sodio al 5 % en agua y 2 gotas de hidróxido de sodio a 0.5 ml del extracto. La reacción se consideró positiva con la presencia de un color rojo intenso.

Fundamento: Identifica cardenólidos que al reaccionar con el nitroprusiato de sodio producen un color rojo intenso.

- **Reacción de Raymond.** En un tubo de ensaye se colocó 1 ml del extracto y se añadieron 2 gotas de m-dinitrobenceno en etanol y 2 gotas de hidróxido de sodio al 20 %. La reacción fue positiva al producirse una coloración azul o violeta.

Fundamento: Es una reacción inespecífica al identificar únicamente los grupos metílicos libres presentes en estos compuestos los cuales reaccionan con el m-dinitrobenceno y producen la coloración azul o violeta.

- **Reacción de Kedde.** Se utilizaron dos soluciones: a) ácido 3-5 dinitrobenzónico al 2 % en metanol y b) hidróxido de potasio al 5.7 % en agua.

Se colocó una solución preparada con 1 gota de metanol y 1 gota de cloroformo junto con el residuo problema sobre un pedazo de papel filtro y se dejó secar. Se añadió 1 gota de ácido 3-5 dinitrobenzónico en metanol y 1 gota de hidróxido de potasio al 5.7 % en agua. Un color violeta o azul que desaparece en un intervalo de 1 a 2 h indicó una prueba positiva.

- **Ensayo de Keller-Killiani.** A 1 ml del extracto se añadieron 0.5 ml de la mezcla A (3 gotas de sulfato férrico al 5 % y 3 ml de ácido acético glacial); enseguida se adicionaron 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. El ensayo fue positivo cuando aparece un color azul a los 2 minutos después de efectuada la reacción.

Fundamento: Los desoxiazúcares contenidos en este grupo producen una coloración azul al reaccionar con sales férricas en medio ácido.

- **Ensayo de Keller-Killiani con modificación de Euw-Richstein.** Para este ensayo fue necesario preparar dos soluciones. En la primera se mezclaron 0.1 ml de sulfato férrico al 5 % en agua con 1 ml de ácido acético glacial. Para la segunda se mezclaron 0.1 ml de sulfato férrico al 5 % en agua con 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. A 1 ml del extracto se añadieron 20 gotas de la solución A y 1 gota de la solución B. El ensayo se consideró positivo al observarse un color azul o azul-verdoso en 5 a 20 min.

Fundamento: Los desoxiazúcares contenidos en este grupo producen una coloración característica al reaccionar con sales férricas en medio ácido.

## FLAVONOIDES

Para la identificación de flavonoides se utilizaron los extractos acuosos y etanólicos de las plantas en estudio.

- **Prueba en extracto acuoso.** En 4 tubos de ensaye se colocó 1 ml del extracto, a un tubo se le añadieron 2 gotas de hidróxido de sodio al 10 %, a otro hidróxido de potasio al 10 %, a otro hidróxido de amonio al 10 % y al último cloruro férrico al 10 % y posteriormente se observó el cambio de color en cada uno de los tubos. La prueba se consideró positiva para flavonas y flavonoles al generar un color amarillo, para flavonas e isoflavononas al dar tonos rojizos, las chalconas dan un púrpura rojizo, los flavonoles un castaño-anaranjado y las antocianinas un color azul.

Fundamento: Los flavonoides se disuelven en álcalis produciendo coloraciones características.

- **Pruebas en extracto etanólico.**

**Reacción de Shinoda.** A 1 ml del extracto se añadió un trocito de magnesio metálico y 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado. La reacción fue positiva para flavonas, flavonoles, flavonoles, flavonoles o xantonas cuando se presentó una coloración anaranjada, roja o violeta.

Fundamento: Los productos reducidos de flavonoides manifiestan diversas coloraciones en medio ácido.

**Reacción de Constantinescu.** En un tubo de ensaye se colocó 1 ml del extracto, se agregaron 3 gotas de la solución de acetato de sodio al 10 % y 3 gotas de cloruro de aluminio al 2.5 %. La reacción fue positiva cuando se presentó una coloración amarilla que al observarse bajo luz U.V. presentó fluorescencia amarilla.

Fundamento: Los flavonoides tienen la propiedad de fluorescer al observarse a la luz U.V., dicha propiedad se acentúa en presencia de acetato de sodio.

**Reacción con ácido sulfúrico.** A 1 ml del extracto se adicionaron 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La reacción fue positiva para flavonas y flavonoles cuando se observó un color amarillo, para flavanonas si el color fue de anaranjado a guinda y para chalconas o auronas si fue rojizo.

Fundamento: Los flavonoides dan diversas coloraciones en medio ácido.

**Reacción para antocianidinas.** Se colocó 1 ml del extracto en un tubo de ensaye, se añadieron 2 ml de ácido clorhídrico al 20 %, se calentó a baño maría por 5 min se dejó enfriar y se filtró. Al filtrado se le añadió gota a gota una solución de ácido pícrico al 10 %, la formación de un precipitado amarillo indica que la reacción es positiva.

Fundamento: Las antocianinas forman un precipitado amarillo en presencia del ácido pícrico (picrato de antocianina).

## ALCALOIDES

Para la identificación de alcaloides se trabajó con los extractos acuosos y etanólicos mediante las reacciones de Dragendorff, Meyer, Wagner, Hager, y Sonnenchein.

- **Reacciones de Dragendorff, Meyer, Wagner, Hager y Sonnenchein.** En una placa excavada se colocó 1 gota del extracto y 1 gota de los reactivos de Dragendorff (solución de yoduro potásico-bismútico), Meyer (solución de yoduro potásico-mercúrico), Wagner (solución de yodo en yoduro de potasio), Hager (solución saturada de ácido pícrico) y Sonnenchein (solución de fosfomolibdato de sodio en ácido nítrico). Posteriormente se determinó como prueba positiva la formación de precipitados, grumos o floculación.

Fundamento: Casi todos los alcaloides forman precipitados al ser tratados en sus soluciones ácidas o neutras con reactivos específicos.

## LACTONAS SESQUITERPÉNICAS

La identificación de lactonas sesquiterpénicas se realizó utilizando los extractos acuosos y etanólicos por medio de la reacción de hidroximato férrico.

- **Reacción de hidroximato férrico.** A 3 gotas del extracto se añadió 1 gota de la solución metanólica 2 N de hidróxido de potasio, la mezcla se calentó en baño maría por 2 min, enseguida se enfrió, se aciduló con ácido clorhídrico 0.5 N y se añadió 1 gota de cloruro férrico al 1 %. La prueba fue positiva para santonina si se presentó un color rosa violeta y para alantolactona si se observó un color violeta oscuro.

Fundamento: Las sesquiterpenlactonas forman fácilmente hidroximatos férricos de color violeta en medio ácido.

## QUINONAS

La identificación de quinonas se realizó con los extractos acuosos y etanólicos mediante la reacción para antraquinonas y el ensayo de Borntrager para derivados antraquinónicos libres.

A 2 ml del extracto se añadieron 10 ml de cloruro férrico al 5 % y 10 ml de ácido clorhídrico al 10 %, esta mezcla se hirvió a baño maría durante 10 min y se dejó enfriar; enseguida se filtró y se extrajo con 20 ml de tetracloruro de carbono mediante agitación durante 1 min en embudo de separación.

- **Reacción para antraquinonas.** A 2 ml del extracto de tetracloruro de carbono se le añadieron 2 ml de hidróxido de amonio al 10 %. Las pruebas para antraquinonas fueron positivas cuando se presentó una coloración roja o púrpura y para antrones y antronas si la coloración fue violeta

Fundamento: Esta reacción identifica quinonas, antrones y antrones, los cuales son oxidados a antraquinonas que al reaccionar con ácidos y bases fuertes producen colores característicos.

- **Ensayo de Borntrager para derivados antraquinónicos libres.** El material pulverizado de cada una de las plantas fue macerado con éter durante un periodo de 30 min y enseguida se filtró. A cada filtrado se añadieron 2 ml de hidróxido de sodio al 10 %, se agitó y se dejó reposar hasta la separación de dos fases. La prueba se consideró positiva cuando se observó un color rosa o rojo violeta en la fase acuosa.

## HETERÓSIDOS CIANOGENÉTICOS

Para la identificación de heterósidos cianogenéticos se efectuó la prueba de descomposición enzimática, para lo cual fue necesario utilizar las hojas secas de cada especie vegetal.

- **Prueba de la descomposición enzimática.** En un tubo de ensaye se colocaron aproximadamente 2 g de cada planta junto con unas gotas de agua y otras mas de xilol, posteriormente se colocó una tira de papel impregnada con el reactivo de Grignard

(solución de picrato de sodio), en la boca del tubo, cuidando de no tocar la planta con la tira reactiva, después se selló herméticamente con un tapón dejando una pequeña parte de la tira afuera; se calentó el tubo a baño maría durante 15 min a una temperatura de 50 °C. La prueba se consideró positiva al presentarse manchas rojas en la tira reactiva del interior del tubo.

Fundamento: Los heterósidos cianogénicos son hidrolizados por acción enzimática por solventes y ácidos, produciendo geninas, aldehído benzóico y ácido cianhídrico volátil. Los vapores de éste último son detectados por la coloración roja que producen en un papel impregnado por el reactivo de Grignard formando purpurato de sodio.

Las reacciones de coloración y precipitación, así como sus fundamentos están basados en Bruneton 1991, Domínguez 1985 y Trease Evans 1981.

## ANEXO II

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

#### CARBOHIDRATOS

- Reacción de Molish  
Reactivo de Molish. Se disolvieron 5.0 g de  $\alpha$ -naftol y se llevó a volumen de 100 ml con etanol al 95 %.
- Reacción de Fehling Reactivo de Fehling. Se prepararon dos soluciones; para la solución A (tartrato cúprico alcalino), se disolvieron 34.66 g de sulfato cúprico en cristales pequeños y se llevó a volumen de 500 ml; para la solución B (tartrato alcalino) se disolvieron 173 g de tartrato de sodio y potasio cristalizado, 50 g de hidróxido de sodio y se aforaron con agua destilada a un volumen de 500 ml. Ambas soluciones se guardaron en recipientes pequeños.

#### PECTINA

- Prueba del nitrato de torio  
Solución de nitrato de torio al 1 %. Se disolvió 1 g de nitrato de torio en 100 ml de agua destilada.

#### TANINOS

- Reacción de cloruro férrico  
Solución de cloruro férrico al 1 %. Se pesaron 0.2 g de cloruro férrico, se disolvieron y se llevaron a un volumen de 20 ml con agua destilada.
- Ensayo de la gelatina  
Solución de gelatina al 1 %. Se preparó una solución de cloruro de sodio al 10 % (10 g de la sal disueltos y aforados a 100 ml con agua destilada) y se le incorporó 1 g de gelatina, agitando para que pudieran mezclarse.
- Ensayo de Stiasny  
Reactivo de Stiasny. Se preparó una solución de formol al 30 % (15 ml de formaldehído aforados a 50 ml con agua destilada), a la cual se le incorporaron 25 ml de ácido clorhídrico concentrado.

- Ensayo del ácido clorogénico  
Amoníaco al 10 %. Se colocó agua destilada en un matraz volumétrico y por las paredes se agregaron 10 ml de hidróxido de amonio poco a poco, para enseguida llevar a volumen de aforo con el mismo solvente.
- Ensayo del ácido gálico  
Cianuro de potasio al 5 %. Se pesaron 5 g de cianuro de potasio, se disolvieron y llevaron a un volumen de 100 ml con agua destilada.

## SAPONINAS

- Prueba de la acción hemolítica  
Solución salina al 0.85 %. Se pesaron 0.85 g de cloruro de sodio, se disolvieron y llevaron a un volumen de 100 ml.
- Solución de glóbulos rojos al 5 %  
2.5 ml de sangre desfibrinada se llevaron a 50 ml con solución salina al 0.85 %.
- Reacción de Liebermann-Buchard  
Reactivo de Liebermann-Buchard. Se preparó con 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo, se enfrió y se añadieron 2 ml de ácido sulfúrico concentrado.
- Reacción de Rosenthaler  
Reactivo de Rosenthaler. Se pesaron 0.1 g de vainillina, se disolvieron y se llevaron a un volumen de 10 ml con etanol.
- Reacción de Rosenheim  
Reactivo de Rosenheim. Se disolvieron 90 g de ácido tricloroacético en agua y se llevó a un volumen de 100 ml con agua destilada.

## HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS

- Reacción de Bajlet  
Solución de ácido pícrico al 1 % en etanol. Se pesaron 0.5 g de ácido pícrico, se disolvieron y llevaron a un volumen de 50 ml con etanol.

Solución de hidróxido de sodio al 10 %. Se pesaron 10 g de hidróxido de sodio, se disolvieron y se llevaron a un volumen de 100 ml con agua destilada.

- Reacción de Legal  
Nitroprusiato de sodio al 5 %. 2.5 g de nitroprusiato de sodio se disolvieron en 50 ml de agua destilada. Su preparación debe ser reciente.

Solución de hidróxido de sodio al 10 %. Preparación ya mencionada.

- Reacción de Raymond  
m-dinitrobenceno en etanol al 1 %. Se disolvieron 0.2 g de m-dinitrobenceno en etanol y se llevó a un volumen de 20 ml con el mismo solvente.

Solución de hidróxido de sodio al 20 %. Se pesaron 20 g de hidróxido de sodio, se disolvieron y se llevaron a un volumen de 100 ml con agua destilada.

- Reacción de Kedde  
Ácido 3-5 dinitrobenzónico al 2 % en metanol. Se disolvieron 0.4 g de ácido 3-5 dinitrobenzónico en metanol y se llevó a un volumen de 20 ml con el mismo solvente.

Hidróxido de potasio al 5.7 % en agua. Se disolvieron 5.7 g de hidróxido de potasio en 100 ml de agua destilada.

- Ensayo de Keller-Killiani  
Se mezcló 1 ml de sulfato férrico al 5 % (2.5 g de sulfato férrico en 50 ml de agua destilada) con 99 ml de ácido acético glacial, esta preparación debe realizarse el día de uso.
- Ensayo de Keller-Killiani con modificación de Euv-Richstein  
A 99 ml de ácido sulfúrico concentrado se le añadió 1 ml de sulfato férrico al 5 % y se mezclaron perfectamente.

## FLAVONOIDES

- Pruebas en extracto acuoso  
Solución de hidróxido de sodio al 10 %. Preparación ya mencionada.

Hidróxido de potasio al 10 %. Se pesaron 10 g de hidróxido de potasio y se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

Hidróxido de amonio al 10 %. Se disolvieron 10 g de hidróxido de amonio en 100 ml de agua destilada.

Cloruro férrico al 10 %. Se pesaron 10 g de cloruro férrico y se llevaron a 100 ml con agua destilada.

- Pruebas en extracto etanólico
  1. Reacción de Constantinescu  
Acetato de sodio al 10 %. Se pesaron 10 g de acetato de sodio y se disolvieron en 100 ml de agua destilada.

Cloruro de aluminio al 2.5 %. Se disolvieron 2.5 g en 100 ml de agua destilada.



## 2. Reacción para antocianidinas

Ácido clorhídrico al 20 %. En una probeta de 250 ml se colocaron 125 ml de agua destilada, se le incorporaron 35 ml de ácido clorhídrico concentrado y se llevaron a un volumen de 175 ml con agua destilada.

Ácido pícrico al 10 %. Se disolvieron 10 g de ácido pícrico en agua destilada y con ella se llevó a un volumen de 100 ml.

## ALCALOIDES

- Reacciones de Dragendorff, Meyer, Wagner, Hager y Sonnenchein

Reactivo de Dragendorff. Se prepararon dos soluciones; para la primera, se pesaron 8 g de nitrato de bismuto pentahidratado y se midieron 20 ml de ácido nítrico al 30 % (6 ml de ácido nítrico concentrado se incorporaron a un volumen de 15 ml de agua destilada y posteriormente se llevan a un volumen de 20 ml con el solvente). Para la segunda se pesaron 27.2 g de yoduro de potasio y se llevaron a 50 ml de agua destilada. Se mezclaron las dos soluciones y se dejó reposar por espacio de 24 h. Enseguida, se decantó la solución y se aforó a 100 ml con agua destilada.

Reactivo de Meyer. 1.36 g de cloruro mercúrico se disolvieron en 60 ml de agua destilada. Aparte se pesaron 5 g de yoduro de potasio y se disolvieron en 10 ml de agua destilada. Al tener estas dos soluciones preparadas, se aforan a 100 ml con agua destilada.

Reactivo de Wagner. Se pesaron 1.27 g de yodo resublimado y 2.0 g de yoduro de potasio. Estos reactivos se disolvieron en 20 ml de agua destilada, posteriormente se llevó a un volumen de aforo de 100 ml, da un precipitado floculento color marrón.

Reactivo de Hager. Se preparó una solución saturada de ácido pícrico (1.2 g de ácido pícrico en 100 ml de agua destilada).

Reactivo de Sonnenchein. Para este reactivo se utilizaron tres soluciones, además de agua destilada y ácido nítrico concentrado.

- a) Solución nítrica de molibdato de amonio. Se disolvieron 5 g de molibdato de amonio en 20 ml de amoníaco, se filtró y se agregó ácido nítrico concentrado hasta completar 100 ml.
- b) Solución de fosfato sódico. Se disolvieron 9 g de fosfato de sodio en 100 ml de agua destilada.
- c) Solución de carbonato de sodio. En 100 ml de agua destilada se disolvieron 10 g de carbonato de sodio.

### Preparación del reactivo

Se precipitó una solución nítrica de molibdato de amonio con una solución de fosfato de sodio y se dejó reposar durante 24 h, después de este tiempo el precipitado se lavó con agua destilada y se disolvió con la solución de carbonato de sodio, enseguida se evaporó a sequedad en una cápsula de porcelana hasta que desapareció toda traza de amoníaco. Por último se enfrió y se disolvió con agua destilada.

## **LACTONAS SESQUITERPÉNICAS**

- Reacción de hidroximato férrico  
Solución metanólica 2 N de hidróxido de potasio. Se pesaron 5.7 g de hidróxido de potasio y se disolvieron en 50 ml de metanol.

Ácido clorhídrico 0.5 N. Se midieron 0.77 ml de ácido clorhídrico concentrado y se aforaron a 50 ml de agua destilada.

Cloruro férrico al 1 %. Preparación ya mencionada.

## **QUINONAS**

- Extracción  
Solución de cloruro férrico al 5 %. Se disolvieron 25 g de cloruro férrico en agua destilada y con ella se llevaron a un volumen de 500 ml.

Solución de ácido clorhídrico al 10 %. En un matraz volumétrico de 100 ml se colocó agua destilada y posteriormente se le incorporaron 10 ml de ácido clorhídrico concentrado y se llevó al volumen correspondiente.

- Reacción general para antraquinonas  
Hidróxido de amonio al 10 %. Preparación ya mencionada.
- Ensayo de Borntrager  
Solución de hidróxido de sodio al 10 %. Preparación ya mencionada.

## **HETERÓSIDOS CIANOGENÉTICOS**

- Solución de picrato de sodio (tiras reactivas)
  - 1) Se pesaron 10 g de carbonato de sodio, se disolvieron y llevaron a un volumen de 100 ml con agua destilada.
  - 2) Se pesó 1 g de ácido pícrico, se disolvió y llevó a un volumen de 100 ml con agua destilada.

Una vez preparadas las dos soluciones, las tiras de papel filtro se impregnaron primero con la solución (1) y posteriormente con la solución (2); finalmente se colocaron sobre placas para su secado.

## ANEXO III

### PREPARACIÓN DE LAS PLACAS CROMATOGRÁFICAS

- Cromatoplasmas de sílica gel. Se prepararon pesando 30 g de sílica gel 60 G para cromatografía en un matraz Erlenmeyer, se agregó una mezcla de 60 ml de agua destilada y 5 ml de acetona, se agitó el matraz hasta obtener una mezcla homogénea que se depositó en el extensor Stall, el cual se deslizó sobre las placas de vidrio de 10 x 5 cm previamente limpias con acetona. Se dejaron secar y se activaron a 110 °C por 5 min en estufa de aire caliente antes de utilizarse.
- Cromatoplasmas de alúmina. Se colocaron 30 g de alúmina con 35 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer y se siguió el procedimiento descrito anteriormente. Se activaron en estufa de aire caliente a 130 °C durante 5 a 10 min antes de utilizarse.
- Cromatoplasmas de sílica gel tamponadas con acetato de sodio 0.02 M. Se pesaron 30 g de sílica gel en un matraz Erlenmeyer y se añadió 60 ml de la solución tamponada (acetato de sodio 0.02 M), y se siguió el procedimiento ya descrito. La activación se llevó a cabo en estufa de aire caliente a 110 °C por 5 min.

### PREPARACIÓN DE LOS AGENTES CROMOGÉNICOS

#### CARBOHIDRATOS

- Aldehído anisico-ácido sulfúrico  
Se preparó mezclando 9 ml de alcohol etílico al 95 % recién preparados con 0.5 ml de ácido sulfúrico concentrado y 0.5 ml de aldehído anisico (anizaldehído). Se roció la cromatoplaca con el revelador y se calentó en estufa de aire de 90 a 100 °C por 10 min y la producción de colores característicos revelaban la presencia de carbohidratos.

#### FLAVONOIDES

- Cloruro de aluminio  
Se preparó una solución etanólica de cloruro de aluminio al 1 %. Se roció la cromatoplaca y se observó bajo luz U.V. y bajo luz normal (luz del día), se observaron manchas fluorescentes, especialmente amarillas.
- Reactivo de Benedict  
*Solución A:* Se mezclaron 173 g de citrato de sodio y 117 g de carbonato de sodio en 700 ml de agua. Se calentó y filtró.  
*Solución B:* Se disolvieron 17.3 g de sulfato cúprico en 100 ml de agua destilada y se mezcló. Lentamente se añadió la solución B a la solución A y se ajustó a un volumen de 1000 ml con agua destilada.  
La aparición de manchas amarillas indicó la presencia de flavonoides.
- Sulfato de hierro amoniacal  
Se preparó una solución acuosa al 0.2 % de sulfato de hierro amoniacal, se roció la cromatoplaca y se observó a la luz U.V., la manifestación de manchas amarillas fluorescentes indicó la presencia de flavonoides.
- Acetato de plomo  
Se preparó una solución acuosa al 25 % de acetato de plomo básico. Se roció la cromatoplaca y se observó a la luz U.V. La aparición de fluorescencia amarilla indicó la presencia de flavonoides.
- Vapores de ácido clorhídrico  
Se expuso la cromatoplaca a los vapores de ácido clorhídrico concentrado por 15 min. La aparición de manchas rojas indicó la presencia de chalconas.

## ALCALOIDES

- Verde de bromocresol  
Se preparó una solución alcohólica al 0.05 % de verde de bromocresol, la manifestación de manchas verdes o azules 30 min después de haber rociado la cromatoplaca indicaron la presencia de alcaloides.
- Reactivo de Dragendorff (modificado por Meunier y Macheboeuf)  
*Solución A:* Se disolvieron 0.85 g de subnitrito de bismuto en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua destilada.  
*Solución B:* Se disolvieron 8 g de yoduro de potasio en 20 ml de agua destilada.  
Se mezclaron 5 ml de la solución A con 5 ml de la solución B, se añadieron 20 ml de ácido acético glacial y se ajustó a un volumen de 100 ml con agua destilada. La presencia de manchas color anaranjado que permanecieron por más de 24 h demostraron la presencia de alcaloides.
- Yodo  
Se preparó una solución al 1 % de yodo en tetracloruro de carbono, esta reacción es inespecífica y se observa a la luz U.V. La aparición de manchas fluorescentes, especialmente amarillas indicaron la presencia de alcaloides.
- Reactivo de Meyer (cloruro mercúrico-yoduro de potasio)  
*Solución A:* Se disolvieron 13.55 g de cloruro mercúrico en 20 ml de agua destilada.  
*Solución B:* Se disolvieron 49.8 de yoduro de potasio en 20 ml de agua destilada.  
Se mezclaron A y B y se ajustaron a un volumen de 1 000 ml con agua destilada. La manifestación de manchas color amarillo indicaron la presencia de alcaloides esteroidales
- Ácido nítrico  
Se mezclaron 2 ml de ácido nítrico concentrado en 100 ml de etanol absoluto, se roció la cromatoplaca, se calentó a 120 °C durante 5 min en estufa de aire caliente y se observó a la luz U.V. La presencia de manchas fluorescentes indicaron la presencia de alcaloides.
- Ácido sulfúrico  
Se mezclaron 2 ml de ácido sulfúrico concentrado en 100 ml de etanol absoluto. Se roció la cromatoplaca y se observó a la luz U.V., la manifestación de manchas fluorescentes indicaron la presencia de alcaloides.

## LACTONAS SESQUITERPÉNICAS

- Ácido sulfúrico al 50 %  
Se mezclaron 30 ml de etanol absoluto y 30 ml de ácido sulfúrico concentrado.

cromatoplaça y se secó en un lugar oscuro; luego se calentó 3 min a 90 °C y se observó a luz normal; se calentó otros 3 min y se revisó a luz U.V. la presencia de esterol es se comprobó por la manifestación de manchas fluorescentes.

- **Reactivo de Carr-Price (cloruro de antimonio)**  
Se disolvieron 25 g de cloruro de antimonio en 75 g de cloroformo. Se roció la cromatoplaça y se calentó a 100 °C durante 10 min; se revisó la cromatoplaça con luz natural y después con luz U.V. Se detectaron glucósidos esteroidales por la presencia de manchas fluorescentes.
- **Ácido perclórico**  
Se preparó una solución acuosa al 2 % de ácido perclórico, se roció la cromatoplaça y se calentó 10 min a 150 °C. La presencia de esterol es producen manchas color castaño.
- **Hidróxido de sodio**  
Se preparó una solución acuosa de hidróxido de sodio al 10 %, se roció la cromatoplaça, se secó por 10 min a 80 °C y se observó a la luz U.V. La manifestación de manchas fluorescentes indicaron la presencia de esterol es.

## **TERPENOS**

- **Vainillina-ácido sulfúrico**  
Se preparó una solución de vainillina al 1 % en ácido sulfúrico concentrado. Se roció, calentó y observó la cromatoplaça a la luz U.V. La presencia de terpenos se comprobó al observar manchas fluorescentes a la luz U.V. y manchas moradas a la luz visible.

## ANEXO V

### PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES UTILIZADAS PARA LA EVALUACIÓN AMEBICIDA

#### MEDIO "R"

Cloruro de sodio	2.5 g
Ácido cítrico monohidratado	1.0 g
Fosfato monobásico de potasio	0.25 g
Sulfato de amonio	0.5 g
Sulfato de magnesio	0.025 g
Ácido láctico	2.0 ml

Se disolvieron todos los ingredientes en aproximadamente 50 ml de agua destilada. Se agregaron 2.3 ml de hidróxido de sodio al 10 %, se ajustó el pH a 9.2, se agregó 1.0 ml de azul de bromotimol 0.01 % y se aforó a 500 ml con agua destilada. Se esterilizó a 15 lb de presión por 15 min.

Nota: Cuando el pH se pase de 9.2, se ajusta con ácido clorhídrico concentrado (sólo unas gotas). Evitar esto lo más posible.

#### AGAR SALINO

Agar bacteriológico	3.75 g
Cloruro de sodio	1.75 g
Agua destilada	250.00 ml

El agar y el cloruro de sodio se disolvieron en agua destilada y se puso a hervir durante 1 min para su completa disolución. Se esterilizó a 15 lb de presión durante 15 min, se vació en frascos de vidrio con tapón de rosca y se inclinó hasta solidificar. Enseguida los frascos con agar se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización.

#### INACTIVACION DEL SUERO DE BOVINO, DE CARNERO O DE CABALLO

Se colocó el suero a baño maría a 63 °C, durante 3 min.



## **SOLUCIÓN DE PTALATO DE POTASIO (SOLUCIÓN MADRE)**

Ptalato de Potasio	12.50 g
Hidróxido de sodio al 40 %	6.25 g
Agua destilada	100.00 ml

Los dos primeros ingredientes se disolvieron con agua destilada, se vaciaron en frascos con tapón de rosca de 250 ml y se esterilizaron a 15 lb de presión durante 15 min, se dejaron enfriar y se mantuvieron en refrigeración hasta su utilización.

## **SOLUCIÓN DE TRABAJO 10 X DE PTALATO DE POTASIO**

De la solución madre, se tomaron 10 ml para diluirlos en 90 ml de agua destilada estéril fría.

## **SOLUCIÓN DE TRABAJO 40/60 DE PTALATO DE POTASIO**

De la solución madre, se tomaron 40 ml para diluirlos en 60 ml de agua destilada estéril fría.

## **MEDIO “BRS**

Se utilizó el medio “BR”, suero de bovino filtrado e inactivado y solución de trabajo de ptalato de potasio en partes iguales.

## **MEZCLA DE ANTIBIÓTICOS**

Previamente se esterilizaron los tubos con tapón de rosca necesarios, una probeta y dos frascos con agua destilada. Se utilizó una jeringa de 5 ml y los antibióticos penicilina 1 000 000 U y sulfato de estreptomicina 1 g.

Primero se disolvió la penicilina con el agua destilada estéril y se agitó sin sacar la jeringa, posteriormente se sacó la disolución y se inyectó en el frasco de estreptomicina, se disolvió nuevamente sin sacar la jeringa. La mezcla de antibióticos se disolvió en 15 ml de agua destilada estéril y se aforó a 20 ml. Se colocó en tubos de rosca de aproximadamente 5 ml en cada uno (los tubos que contengan el antibiótico deben protegerse de la luz). Su duración después de preparada es de aproximadamente 15 días.

## ANEXO VI

### PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA EVALUACIÓN ANTIBACTERIAL Y BACTERICIDA

#### AGAR MUELLER-HINTON

Infusión de carnero	300.0 g
Peptona de caseína ácida	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar bacteriológico	17.0 g

Se suspendieron 38 g de este agar en 1 000 ml de agua destilada y se calentó hasta ebullición para disolver completamente. Enseguida se esterilizó a 15 lb de presión durante 15 min.

#### CALDO MUELLER-HINTON

Infusión de carnero	300.0 g
Peptona de caseína ácida	17.5 g
Almidón soluble	1.5 g

Se suspendieron 21 g en 1000 ml de agua destilada, se disolvió completamente y se esterilizó a 15 lb de presión durante 15 min.