



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIO DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE
Distictis buccinatoria (DC.) A. H. Gentry
“Tonacaxochitl”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA

M. en C. MARÍA GABRIELA ROJAS BRIBIESCA

COMITÉ TUTORAL

Directores:

Dr. RUBÉN ROMÁN RAMOS

Dr. JAIME TORTORIELLO GARCÍA

Asesora:

Dra. MARÍA YOLANDA RÍOS GÓMEZ

MÉXICO, D.F.

JULIO DE 2007

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

La alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana
María Gabriela Rojas Bribiesca, recibió beca del CONACYT de septiembre de 2004 a Julio de 2007.
Registro 188440

Para el desarrollo de la presente tesis se contó con el apoyo del IMSS, por medio de la convocatoria del FOFOI 2006.
Registro IMSS-FOFOI 2006/1A/1/059

**El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y
de la**

**Salud de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la Tesis
que**

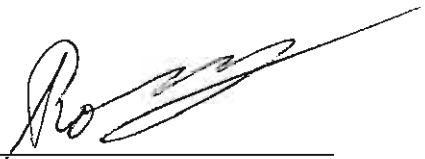
Presentó:

M. en C. MARÍA GABRIELA ROJAS BRIBIESCA

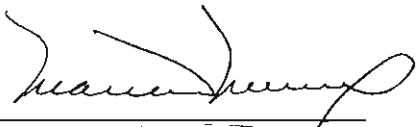
El día 25 de julio del año 2007

Sinodales:

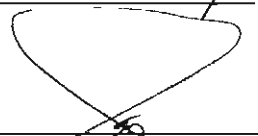
Dr. Rubén Román Ramos (Presidente)



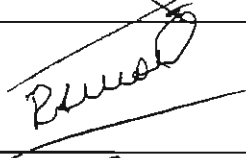
Dra. Mariana Meckes Fisher (Secretaria)



Dr. Jaime Tortoriello García (Vocal)



Dr. Ramón González Camarena (Vocal)



Dr. Francisco J. Alarcón Aguilar (Vocal)



COMITÉ TUTORAL:

DIRECTORES DE TESIS

DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS

**Profesor Titular, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II**

DR. JAIME TORTORIELLO GARCÍA

**Investigador Titular, C.I.B.I.S. del IMSS
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II**

ASESORA

DRA. YOLANDA RÍOS GÓMEZ

**Profesor Investigador, Centro de Investigaciones Químicas, Universidad
Autónoma del Estado de Morelos
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II**

La presente investigación se realizó en:

**Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación Biomédica del Sur
del Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos.**

**Laboratorio 10 del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad
Autónoma del Estado de Morelos.**

**Laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Unidad Iztapalapa.**

Con amor

A mis hijos

Josué y Husay

A mis Padres

Erenesto y María Elena

A mis hermanos

Martita, Rosita y José Ernesto

“Uno de los problemas más abrumadores del hombre ha sido descubrir las causas de sus enfermedades y cómo librarse de ellas.

Nuestro país, rico en tradiciones populares, ha mantenido en su inconsciente colectivo, a pesar del tiempo, las enseñanzas más antiguas de su medicina ancestral; en nuestro cotidiano vivir están omnipresentes té y remedios que los antiguos mexicanos hace 500 años reconocían como fundamentales para recobrar la salud perdida. Estos remedios son esenciales en la medicina y en la historia de nuestro país y reconocerlos enaltece nuestros orígenes como pueblo”.

García Saínz



ÍNDICE GENERAL

Índice General	I
Índice de Tablas	II
Índice de Figuras	III
RESUMEN	1
SUMMARY	4
INTRODUCCIÓN	7
ANTECEDENTES	11
1.1 Importancia de las enfermedades infecciosas	12
1.2 El problema de la resistencia bacteriana.	13
1.3 Plantas medicinales	15
1.4 Metabolitos secundarios	18
1.5 Ácido Ursólico.	20
1.6 Familia Bignoniaceae	21
1.7 <i>Distictis buccinatoria</i>	24
1.8 Ensayos antimicrobianos	27
1.9 Concentración Mínima Inhibitoria	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
JUSTIFICACIÓN	34
HIPÓTESIS	36

OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo General.	39
3.2 Objetivos Particulares.	39
MATERIAL Y MÉTODOS	40
6.1 Material Vegetal	41
6.2 Detección preliminar de la actividad antimicrobiana	41
6.3 Evaluación antimicrobiana de los extractos orgánicos	43
6.4 Fraccionamiento Químico Biodirigido.	48
6.5 Actividad Mínima Inhibitoria del Ácido Ursólico	55
6.6 Cuantificación de Ácido Ursólico y Oleanólico en los extractos orgánicos mediante HPLC	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	75
PERSPECTIVAS	78
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
ARTÍCULO CIENTÍFICO	99

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	Actividades biológicas de algunas especies de la familia Bignoniaceae.	23
TABLA 2	Clasificación Taxonómica de <i>Distictis buccinatoria</i>	25
TABLA 3	Características de <i>Distictis buccinatoria</i>	25
TABLA 4	Cepas bacterianas utilizadas en los ensayos.	44
TABLA 5	Cepas de hongos utilizados en los ensayos.	44
TABLA 6	Aislados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> con patrón de resistencia a antibióticos.	45
TABLA 7	Fracciones colectadas Columna I.	50
TABLA 8	Agrupación de fracciones colectadas Columna I	51
TABLA 9	Fracciones colectadas Columna II	52
TABLA 10	Agrupación de fracciones colectadas Columna II	53
TABLA 11	Agrupación de fracciones colectadas Columna III	54
TABLA 12	Rendimiento de los extractos orgánicos (II).	60
TABLA 13	Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de <i>D. buccinatoria</i> .	61

TABLA 14	Actividad antifúngica de los extractos orgánicos de <i>D. buccinatoria</i> .	62
TABLA 15	Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de <i>D. buccinatoria</i> contra cepas de aislados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a antibióticos.	63
TABLA 16	Actividad antibacteriana fracciones de la Columna I del extracto de diclorometano de las flores <i>D. buccinatoria</i> .	65
TABLA 17	Actividad antifúngica de las fracciones de la Columna I del extracto de diclorometano de las flores de <i>D. buccinatoria</i> .	67
TABLA 18	Contenido de Ac. Ursólico y Oleanólico en los extractos orgánicos de las flores y hojas de <i>Distictis buccinatoria</i> .	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1	Rutas metabólicas generales.	19
Fig. 2	<i>Distictis buccinatoria</i> (DC.) A. H. Gentry.	24
Fig. 3	Tonacaxochitl.	26
Fig. 4	Curva de Calibración Ácido Ursólico.	56
Fig. 5	Cromatograma Ácido Ursólico HPLC.	56
Fig. 6	Curva de Calibración Ácido Oleanólico.	57
Fig. 7	Cromatograma Ácido Oleanólico HPLC.	57
Fig. 8	Bioautografía directa de extractos orgánicos (I) de las flores.	59
Fig. 9	Bioautografía directa de extractos orgánicos (I) de las hojas.	59
Fig. 10	Polvo blanco del extracto de diclorometano de las flores de <i>D. buccinatoria</i> .	64
Fig. 11	Bioautografía de los polvos y extractos de diclorometano de las flores de <i>D. buccinatoria</i> .	64
Fig. 12	Estructura química del Ácido Ursólico.	68
Fig. 13	Estructura química de los ácidos Mirístico, Palmítico y Oléico.	69

Fig. 14	Estructura química del β -Sitosterol.	70
Fig. 15	Estructura química del Estigmasterol..	71
Fig. 16	Actividad Mínima Inhibitoria del Ácido Ursólico	71
Fig. 17	Estructura química del Ácido Oleanólico.	73

RESUMEN

RESUMEN

De acuerdo con los datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades infecciosas y parasitarias, tales como las infecciones agudas de las vías respiratorias, la tuberculosis, la diarrea, HIV/SIDA, y malaria, son una causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo entero. Así mismo, durante los últimos años se ha incrementado la incidencia de las infecciones causadas por hongos oportunistas debido principalmente al incremento de la población inmunocomprometida tales como pacientes receptores de transplantes de órganos, prematuros, con cáncer y SIDA entre otros. Este hecho, aunado al problema de la resistencia bacteriana, ha conducido a una intensa búsqueda de nuevas drogas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. En este sentido, los productos naturales son una fuente importante de compuestos biológicamente activos, por lo que en los últimos años se ha manifestado un interés creciente por la obtención de nuevos agentes antimicrobianos a partir de plantas.

En México las plantas medicinales han sido utilizadas durante cientos de años por la población rural para el tratamiento de afecciones gastrointestinales, respiratorias, urinarias, genitales y de la piel en las que, de acuerdo con la sintomatología descrita, pudiese estar involucrado un padecimiento infeccioso. La especie *Distictis buccinatoria* (DC) A.H. Gentry (Bignoniaceae), popularmente conocida como “Tonacaxochitl” es una planta nativa de México que ha sido utilizada desde los tiempos Prehispánicos con fines medicinales. Actualmente, los terapeutas tradicionales en el estado de Morelos, México, utilizan el cocimiento de las flores para tratar la tos, anginas, inflamación, faringitis y para la tos con sangre.

Debido a que en la literatura no existen reportes de la actividad biológica ni información química referente a esta especie, en la presente investigación se

evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de hexano, diclorometano y metanol de las flores y las hojas de esta especie y se realizó un fraccionamiento químico-biodirigido del extracto de diclorometano de las flores.

Los resultados obtenidos en el ensayo antimicrobiano permitieron concluir que *D. buccinatoria* posee actividad antimicrobiana *in vitro* contra las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* y contra los dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*.

El fraccionamiento fitoquímico-biodirigido del extracto de diclorometano de la flor permitió el aislamiento del compuesto mayoritario ácido ursólico, aislándose también en menor proporción ácido oleanólico, así como los ácidos mirístico, palmítico y oleico, β -sitosterol y estigmasterol.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran una fuerte correlación entre los usos de esta planta en la medicina tradicional mexicana y los datos experimentales obtenidos, sustentando así la importancia que tiene la etnofarmacología como guía en la selección de plantas para la obtención de compuestos bioactivos.

SUMMARY

SUMMARY

According to World Health Organization (WHO), infectious and parasitic diseases, such as acute lower respiratory infections, tuberculosis, diarrhea, HIV/AIDS, and malaria, are major causes of morbidity and mortality worldwide. In the same manner, during the last years there has been a growing incidence of opportunistic fungal infections due to the increasing immune-compromised population, such as organ transplant recipients, neonates, cancer, and HIV/AIDS patients. This fact coupled with the resistance to antibiotics have triggered and extended search for new drugs to treat infectious diseases. Thus, because natural products are rich sources of biologically active compounds, there has been an increasing interest in the development of new antimicrobial agents from plants in recent years.

In Mexico, medicinal plants have been used in rural areas for thousands of years to treat illness in which according to the symptomatology described gastrointestinal, respiratory, urinary, and skin infections could be included. *Distictis buccinatoria* (DC.) A.H. Gentry (Bignoniaceae), locally known as "Tonacaxochitl", is a native Mexican plant that has been used since Pre-Hispanic times for medical purposes. Nowadays, traditional healers in the state of Morelos in Mexico use the decoction of its flowers to treat cough, angina, inflammation, pharyngitis, and coughs with blood.

To date, no biological activity or chemical information regarding this plant has been reported, reason for which in this investigation, the antibacterial and antifungal activities of the hexane, dichloromethane, and methanol extracts from the flowers and leaves of this medicinal plant were evaluated and a chemical fractionation bio-guided by bioassay of the dichloromethane extract from the flowers was performed.

The obtained results in the antimicrobial assay let us to conclude that *D. buccinatoria* possesses *in vitro* antimicrobial activity against the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* clinical isolates, and antifungal activity against the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*.

Phytochemical bioguided fractionation of the dicloromethane extract from the flowers lead us to the isolation of the most abundant compound, ursolic acid, as well as other compounds present in smaller proportion: Oleanolic acid, miristic acid, palmitic acid, oleic acid, β -sitosterol and stigmasterol.

The results obtained in the current investigation show a strong correlation between the reported uses of this plant in Mexican folk medicine and the obtained experimental data. It also supports the importance of ethnopharmacology as a guide in the selection of plants for the discovery of bioactive compounds.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

En el transcurso de la historia, las enfermedades infecciosas y parasitarias han sido una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Con la aparición de los antibióticos y su distribución comercial a partir de 1940, se ofrecieron nuevas y mejores posibilidades para su tratamiento (Bertram, 2001). Sin embargo, a pesar de los grandes avances en el campo de la medicina, hoy día las enfermedades infecciosas causadas por bacterias, hongos, virus y parásitos siguen constituyendo un problema de salud pública, siendo los países en vías de desarrollo los principalmente afectados debido a la baja disponibilidad de servicios de salud adecuados, de medicamentos y al surgimiento de cepas resistentes (Okeke et al., 2005).

Los datos de información epidemiológica proporcionados en el año 2005 por la Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, durante el período 2000-2004, revelan que las enfermedades respiratorias agudas ocuparon el primer lugar de las veinte principales causas de enfermedad a nivel nacional por grupo de edad de la población general, seguida por las infecciones intestinales y las mal definidas, siendo la faringitis y amigdalitis la séptima causa (SSA, 2006).

Debido a que el uso de los antibióticos suele presentar problemas como inducción de resistencia bacteriana, hipersensibilidad, alergias y efectos secundarios, la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes terapéuticos es fundamental para el cuidado de la salud y todas las posibles estrategias deben ser exploradas. En este sentido, la naturaleza nos ha dotado con una gran variedad de productos con actividad biológica, por lo que en los últimos años se ha incrementado el interés por estudiar los productos naturales como una fuente potencial de nuevos productos antimicrobianos (Fostel y Lartey, 2000; Raskin, et al., 2002; Clardy y Walsh, 2004). Cabe mencionar que solamente una pequeña

porción de la gran diversidad de hongos, flora y fauna marina, bacterias y plantas superiores, ha sido explorada. La investigación llevada a cabo en este campo ha sido desarrollada principalmente en las plantas debido al amplio uso y conocimiento etnomédico que se tiene de éstas, situación que incrementa la probabilidad de encontrar moléculas bioactivas (Cordell y Colvard, 2005; Pathwardhan, 2005; Verporte et al., 2005).

En México, las plantas medicinales constituyen el recurso terapéutico tradicional más ampliamente utilizado durante cientos de años por las diversas culturas de nuestro país, existiendo una extensa bibliografía al respecto (Martínez, 1944; Díaz, 1977; Argueta, 1994; Fuentes y Aviles, 1977; Monroy, 2002, entre otros). Así, el uso de plantas en forma de infusiones, decocciones, cataplasmas, compresas, alcoholatos etc., es una práctica muy extendida en el tratamiento de diversos padecimientos, incluyendo aquellos en los que, de acuerdo a la sintomatología descrita, pudiese estar involucrado un padecimiento infeccioso (Navarro et al., 1996; Rojas et al., 2001). De acuerdo con una encuesta realizada en México a nivel nacional bajo el programa IMSS-COPLAMAR durante el periodo 1983-1985, se determinó que el 78% de las 140 plantas medicinales más frecuentemente empleadas en 2242 comunidades rurales, son especies utilizadas para curar o prevenir enfermedades gastrointestinales, respiratorias y de la piel (Lozoya et al., 1987). Sin embargo, la investigación científica sobre el potencial terapéutico de estas plantas es aún limitado. Debido a esto, es importante el estudio de plantas medicinales con potencial antimicrobiano, tomando como antecedente los datos etnomédicos.

La especie *Distictis buccinatoria*, (DC.) A. H. Gentry perteneciente a la familia Bignoniaceae es una planta de origen mexicano, los reportes que se tienen en fuentes bibliográficas que hacen referencia a la época prehispánica (De la Cruz, 1964; Navarro, 1992) demuestran que desde entonces ha sido utilizada en nuestro país con fines medicinales. En la bibliografía especializada en plantas

medicinales de México no se encuentran registros sobre ella. Sin embargo, aún hoy día esta especie sigue siendo usada por terapeutas tradicionales de la zona de Tetela del Volcán en el Estado de Morelos, para el tratamiento de afecciones respiratorias (comunicación verbal). En la literatura científica no existen reportes farmacológicos ni fitoquímicos sobre esta planta medicinal, por lo que se consideró importante estudiar su potencial antimicrobiano, contribuyendo también al conocimiento científico de esta especie.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

1.1 Importancia de las enfermedades infecciosas

Las enfermedades infecciosas y parasitarias, tales como las infecciones respiratorias agudas, tuberculosis, diarrea, HIV/SIDA y malaria, son una causa importante de morbilidad y mortalidad en el mundo entero. De acuerdo a la información proporcionada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se sabe que durante el año 2003, las enfermedades agudas de las vías respiratorias causaron 3, 963,000 muertes (WHO, 2004).

Las infecciones de vías respiratorias son de las enfermedades infecciosas más prevalentes en el mundo. La neumonía adquirida en la comunidad, afecta a 3-4 millones de personas actualmente en Estados Unidos y una quinta parte necesitará hospitalización, lo que supone más de 600,000 altas anuales. Considerando que entre el 50% y el 80% de estas neumonías se tratan en forma ambulatoria, las estadísticas son probablemente mucho más altas. A su vez, la sinusitis y la faringoamigdalitis causan unas 40 millones de visitas anuales en la atención primaria de los Estados Unidos (Calbo y Garau 2004). En México, durante el año 2000, las infecciones respiratorias agudas fueron la primera causa de los 15 casos nuevos de enfermedad más importantes (SSA, 2001). Durante el periodo 1999-2001, la neumonía e influenza fueron la octava causa de defunciones generales a nivel nacional, y las enfermedades intestinales infecciosas ocuparon la onceava posición, sin considerar las muertes debidas a otras infecciones lo que elevaría la cifra total (INEGI, 2003). Los datos de información epidemiológica del año 2005 revelan que por grupo de edad de la población general, en el período 2000-2004, las enfermedades respiratorias agudas ocuparon el primer lugar de las veinte principales causas de enfermedad a nivel nacional seguida por las infecciones intestinales y las mal definidas, encontrándose también dentro de estos primeros veinte casos de morbilidad la faringitis, la amigdalitis y algunas otras enfermedades infecciosas (SSA, 2006).

Aunado a esto, durante los últimos años se ha incrementado de manera importante la incidencia de infecciones causadas por hongos y patógenos oportunistas, lo cual se ve favorecido por un gran número de factores ligados principalmente a procedimientos terapéuticos, como el uso indiscriminado de antibióticos y esteroides, citotóxicos, trasplantes de médula ósea y órganos sólidos, instalación de catéteres venosos, nutrición parenteral así como a drogadicción, neoplasias, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), collagenopatías, prematuridad y diabetes mellitus entre otros (Hernández et al., 2003).

1.2 El problema de la resistencia bacteriana

A partir de 1928, cuando Fleming descubrió la penicilina, comenzó la llamada época de los antibióticos, y desde esa fecha, en las décadas siguientes se produjo un incremento exponencial de nuevas clases de estos agentes, especialmente en países desarrollados. En la actualidad, se cuenta con una amplia y variada gama de agentes antimicrobianos, situación que ha facilitado el empleo de la terapéutica antiinfecciosa pero, a su vez, ha tenido consecuencias negativas tales como la aparición y diseminación de microorganismos cada vez más resistentes y el encarecimiento de la asistencia médica (Neal et al., 2005).

Debido a las altas tasas de morbilidad y mortalidad producidas por las enfermedades infecciosas de las vías respiratorias y gastrointestinales, la prescripción y la automedicación de antibióticos para el tratamiento de las mismas es muy común, lo que ha conducido en muchas ocasiones al uso inapropiado o excesivo de antibióticos, favoreciendo el incremento de la resistencia microbiana, el cual se ha convertido en un problema creciente con implicaciones sociales y económicas enormes debido al incremento de morbilidad y mortalidad, al aumento de los costos de los tratamientos y de las largas estancias hospitalarias generadas (Acuña, 2003).

Dada la frecuencia con que se presentan las enfermedades respiratorias y diarreicas en los países en vías de desarrollo, la prescripción inadecuada y la automedicación de antibióticos genera la aparición de cepas resistentes, fenómeno que se ha hecho muy evidente en el ámbito hospitalario, a pesar de que existen guías y normas para el manejo de los mismos (Solórzano y Miranda, 1998). En la última década ha aumentado en todo el mundo la resistencia de los patógenos a los antimicrobianos, hecho de especial trascendencia en las infecciones de vías respiratorias en que la mayoría de las veces el tratamiento antibiótico es empírico (Calbo y Garau, 2004).

De acuerdo con algunos autores, la rapidez con que surgen los microorganismos multiresistentes no es igual a la velocidad con que surgen nuevos antibióticos, razón por la que se considera que pronto habrá dificultades para contar con antibióticos útiles para el tratamiento de pacientes infectados con este tipo de microorganismos. De hecho, al poco tiempo de que los fármacos antimicrobianos se empezaron a utilizar y probaron de manera contundente su efectividad para el control de las infecciones bacterianas, se hizo evidente que los patógenos bacterianos no eran propensos a rendirse incondicionalmente, y algunos de ellos mostraron la emergencia y diseminación de resistencia hacia diversos antimicrobianos. Como ejemplo de esto podemos citar el caso del *Streptococcus pneumoniae*, un importante agente infeccioso causante de otitis media, neumonía y septicemia (especialmente en población pediátrica), del cual hasta antes de 1960 todas las cepas aisladas de este microorganismo eran susceptibles a la penicilina. En México las cepas resistentes de *Streptococcus* eran relativamente raras hasta antes de 1993 y la penicilina fue el tratamiento de elección por más de 50 años. La presencia de cepas de *S. pneumoniae* con susceptibilidad disminuida a la penicilina y otros agentes antimicrobianos es ahora un hecho reconocido en el ámbito mundial y ha quedado claramente establecida como un problema de salud pública (Calderon, 1999). Otro ejemplo importante, es el *Staphylococcus aureus*, que es uno de los microorganismos que se aísla con

mayor frecuencia en las infecciones nosocomiales y las adquiridas en la comunidad presenta una patogenicidad variable que le permite causar desde infecciones de las vías respiratorias y de la piel hasta infecciones con compromiso vital tales como endocarditis, septicemias, meningitis, entre otros (Vasso et al., 2005). En las pasadas décadas se consideró como uno de los patógenos más importantes, tanto en la comunidad como en las unidades de cuidados intensivos, y se mantiene así debido a la emergencia de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), los cuales representan un importante reto para la salud pública en muchas instituciones sanitarias de todo el mundo (Velásquez, 2005; Huang et al., 2006).

1.3 Plantas medicinales

Debido a lo anteriormente expuesto, la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos es fundamental para el cuidado de la salud. Dichos agentes pueden ser obtenidos de diversas fuentes tales como: la síntesis química, la modificación de estructuras conocidas y nuevos compuestos de origen natural. En este sentido, las plantas medicinales constituyen una fuente importante para la obtención de nuevas moléculas bioactivas (Yasunaka et al., 2005).

La fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas, nunca ha dejado de tener vigencia; muchas de las especies vegetales estimadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de los textos medievales entre los que podemos citar el *Peri, hyles iatrikes logoi hex*, hoy conocido como: la Materia Médica de Dioscórides. Este conocimiento más tarde se vio enriquecido por el aporte de los conocimientos herbarios del Lejano Oriente y poco después, por la vastísima tradición fitoterapéutica del Nuevo Mundo (Thomson, 1981).

Así, el conocimiento y utilización de las plantas por los pueblos del mundo tiene una larga e interesante historia, reconociéndose que desde siempre el ser

humano ha encontrado en las plantas un fiel aliado para satisfacer muy diversas necesidades: alimento, techo, abrigo, armas, así como la recuperación y el mantenimiento de la salud. Mediante el estudio de restos fósiles, se ha determinado que en la era Paleolítica (60000 años atrás) el hombre ya utilizaba diversas plantas como medicinas (Fabricant y Farnsworth, 2001). Actualmente, la gran mayoría de los países desarrollados y en desarrollo siguen haciendo uso de ellas y los médicos tradicionales y sus plantas medicinales han dejado de ser calificados negativamente, estableciéndose programas y proyectos para la investigación, aplicación e industrialización de los productos derivados de plantas. Esto ha conducido a que muchas de las drogas utilizadas en la terapéutica moderna tienen sus orígenes en la medicina tradicional de diversas culturas antiguas (Pathwardan, 2005).

En México las plantas medicinales son el recurso material más amplio y valioso de la medicina indígena tradicional (Lozoya y Luque, 1984). Su estudio es un tema recurrente en la historia de México, tarea muy compleja si se piensa en la enorme riqueza cultural y florística del país (tercero en el mundo en biodiversidad y segundo en el hemisferio occidental de lenguas y culturas distintas). Se tiene estimado que en nuestro país existen cerca de 30,000 especies de plantas de las cuales, en 1994 el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 con usos medicinales, esto es el 10% del total de la riqueza florística del país (Argueta et al., 1994).

Como ya se mencionó, esta historia es milenaria y se remonta a los tiempos en que dominaban los grupos humanos, que organizados en bandas nómadas o seminómadas recorrían el territorio buscando cobijo temporal en cuevas y sustento en la práctica de la caza, la pesca y la recolección de plantas silvestres. Estos grupos, grandes conocedores de las posibilidades alimenticias y propiedades curativas de la flora silvestre, heredaron toda su sabiduría a los pueblos agrícolas. Las sociedades prehispánicas creadoras de grandes ciudades

y centros ceremoniales, de una economía, una organización social y una religión complejas, desarrollaron una tecnología capaz de lograr la supervivencia y el crecimiento de la población. El aprovechamiento de los recursos naturales (vegetales, animales y minerales) para la salud incluía, además de tratamientos curativos, prácticas de higiene, cuidados y embellecimiento del cuerpo humano. La medicina prehispánica estuvo íntimamente vinculada a la religión y a la magia, lo cual resulta natural debido a la necesidad del hombre de explicarse las notables propiedades curativas que indudablemente había encontrado en algunas de ellas y que no podía comprender. De tal manera que los pueblos mesoamericanos asociaron e identificaron cualidades y poderes de plantas, animales y elementos de la naturaleza a los de sus divinidades (Ochoa y Alonso, 1996).

Los datos sobre las características vegetales, formas de uso, propiedades terapéuticas, recolección y comercio de numerosas plantas medicinales utilizadas en nuestro país, han dado origen a diversos textos. Entre los más conocidos podemos citar los siguientes: el Códice Florentino o *Historia de las cosas de la Nueva España* realizado por Fray Bernardino de Sahagún, el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* del indígena Mexicano Martín de la Cruz y Juan Badiano, conocido como el Códice Badiano, otra fuente importante son las obras completas de Francisco Hernández denominadas *Historia Natural de Nueva España*. En las últimas décadas hubo un resurgimiento en cuanto al interés sobre el registro y documentación de las plantas medicinales utilizadas por nuestras culturas, siendo algunos de los textos más conocidos: Las Plantas medicinales de México escrito por Maximino Martínez; Las Monografías de Nombres, Sinonímias y Usos de las Plantas Medicinales de México de José Luis Díaz; el Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana escrito por Arturo Argueta y colaboradores, así como diversos listados de plantas de herbarios y jardines botánicos especializados en el tema como es el caso del Catálogo de Plantas Medicinales del Jardín Etnobotánico del Instituto Nacional de Antropología e Historia escrito por Margarita Aviles y Guillermo Suárez, y los diversos textos de

Abigail Aguilar especializados en la flora de los diferentes estados de la república. En el caso de Morelos podríamos citar: De Enfermos y Curanderos Medicina tradicional en Morelos, y el de Etnobotánica en el estado de Morelos, escritos por Bernardo Baytelman.

1.4 Metabolitos secundarios

Las plantas verdes son esenciales en la vida del hombre y de los animales debido a que utilizan la energía solar para convertir materia inorgánica en compuestos de carbono que, a su vez, producen otros compuestos importantes. A partir de moléculas de agua, dióxido de carbono y energía solar, las plantas elaboran carbohidratos, grasas y proteínas, metabolitos primarios o esenciales que son necesarios para su crecimiento y multiplicación. Las plantas no sólo elaboran estas sustancias, también producen otros miles de compuestos a los que se les llama metabolitos secundarios, muchos de los cuales los utiliza el hombre para diversos propósitos.

El término metabolitos secundarios se refiere a los compuestos que utiliza la planta para llevar a cabo diversas funciones que generalmente involucran las interacciones de la planta con el medio ambiente. Algunos de estos compuestos ayudan a la planta a defenderse de patógenos y depredadores; a tolerar condiciones ambientales adversas y al proceso de polinización entre otros. Estos compuestos son de naturaleza química diversa.

Se señala que pueden existir de 50000 a 100000 compuestos secundarios en el reino vegetal, de los cuales ya se han identificado algunos miles como los glicósidos, compuestos aromáticos, flavonoides y compuestos afines, alcaloides, terpenoides, compuestos esteroideos, entre otros, los que son sintetizados mediante diferentes rutas metabólicas (Figura 1).

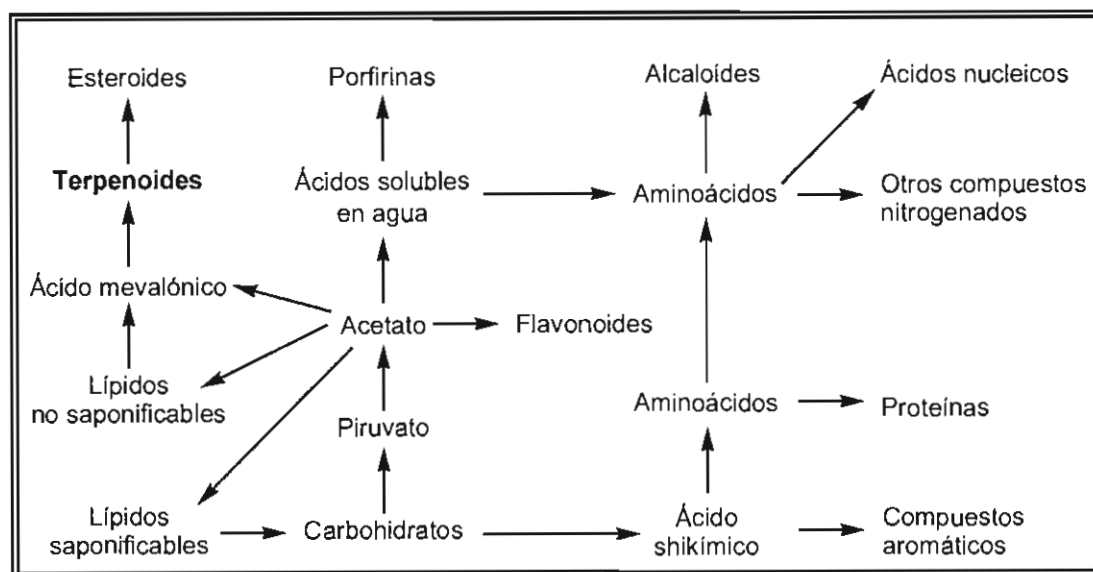


Figura 1. Rutas metabólicas generales.

En la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas provenientes de plantas superiores es necesario primero hacer una selección adecuada del material a estudiar, para ello, se utilizan principalmente cuatro estrategias sistematizadas:

Rastreo fitoquímico

Esta estrategia consiste en llevar a cabo la búsqueda de cierto tipo de metabolitos secundarios (alcaloides, flavonoides, terpenos etc.) mediante la realización de pruebas químicas en diferentes extractos vegetales.

Búsqueda al azar

Se colectan y ensayan diversas partes de plantas aún cuando no existan antecedentes en cuanto a su uso o composición química.

Aproximación taxonómica

Se buscan especies relacionadas filogenéticamente a una especie de reconocido interés farmacológico.

Aproximación etnomédica

En esta estrategia, se seleccionan las especies a estudiar con base en la información escrita o verbal de su uso médico tradicional.

Una quinta forma no sistematizada de obtener metabolitos de interés es la serendipia, en la que la planta es seleccionada en base a un determinado uso tradicional, pero donde se descubre una bioactividad inesperada (Fabricant y Farnsworth, 2001).

1.5 Ácido Ursólico

El ácido ursólico (ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oico), es un compuesto triterpenoide formado por la unión cabeza cola de unidades isoprénicas sintetizado mediante la ruta biosintética del ácido mevalónico.

Este compuesto se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal y ha sido reportado como un constituyente bioactivo de diversas plantas utilizadas en la medicina tradicional siendo también consumido en diversos vegetales que forman parte de la dieta humana.

Durante las últimas décadas se han llevado a cabo diversas investigaciones científicas en las que se ha puesto de manifiesto una gran variedad de importantes actividades biológicas lo que ha generado un gran interés por su estudio desde el punto de vista farmacológico y fitoquímico con la finalidad de sintetizar derivados químicos de baja toxicidad, que además sean más hidrosolubles aumentando así su biodisponibilidad (Liu 1995, 2005).

1.6 Familia Bignoniaceae

La familia Bignoniaceae esta compuesta aproximadamente de 113 géneros y 800 especies, de distribución tropical y subtropical con algunos géneros en regiones de climas cálidos. La familia está dividida en ocho tribus. Las Tecomeae se encuentran en el Viejo y Nuevo Mundo. Las Bignonieae, Crescentieae, Schlegelieae, Eccremocarpeae y Tourretieae están restringidas al Nuevo Mundo. Las Oroxyleae y Coleeae están restringidas al Viejo Mundo (Gentry, 1973).

Esta familia es predominantemente leñosa e incluye varios géneros de árboles de gran tamaño, bejucos y arbustos, muchos de hábito trepador, más raramente herbáceas; hojas sin estípulas, opuestas, a veces ternadas, simples o compuestas, en las formas volubles el foliolo terminal está transformado en zarcillo, inflorescencias cimosas, mononciasios o dicasios, flores hermafroditas, zigomorfas, a menudo muy grandes y vistosas; cáliz sinsépalo de cinco lóbulos casi siempre desiguales; androceo de 4 estambres epipétalos, didínamos, anteras de dos tecas divergentes; gineceo de un solo pistilo, ovario súpero bicarpelar, bilocular o a veces unilocular, placentación axilar, o bien, si el ovario es unilocular la placentación es parietal, estilo terminal, estigma bilobulado; fruto capsular, corto y ancho o bien delgado y alargado –semejante a una vaina por su aspecto-, dehiscencia septicida o loculicida, en raros casos el fruto es carnoso e indehiscente; semillas muchas en los frutos secos, sin endosperma, a menudo aladas, o bien, portando un penacho de pelos (Gentry, 1973, 1977, 1982; Marroquin, 1985).

Las Bignoniaceae se distinguen de otras familias relacionadas por la ausencia de endospermo en las semillas, por la estructura del fruto, las semillas visiblemente aladas y en que son predominantemente vides tropicales. Las escamas de las yemas terminadas en pseudoestípulas son con frecuencia conspicuas y proveen un carácter útil desde el punto de vista taxonómico. Un carácter que se debe usar con mucha precaución es el de la presencia o ausencia

de glándulas peltadas concentradas en los nudos (campos glandulares interpeciolares) o menos comúnmente en el ápice del pecíolo ya que estas zonas glandulares pueden desaparecer en las ramas adultas o pueden no encontrarse en algunas especies. Algunos miembros de esta familia tienen gran valor económico por su madera, y por su valor ornamental en parques y jardines ya que posee flores vistosas (Lawrence, 1951). La gran mayoría de las especies mexicanas de esta familia son plantas que se desarrollan en los países cálidos por lo que se distribuyen a lo largo de la tierra caliente de ambas vertientes del territorio del país (Rzedowski y Calderón, 1993).

En la literatura científica se describen diversas especies de la familia Bignoniaceae que han sido ampliamente utilizadas en la medicina tradicional de diferentes países para el tratamiento de enfermedades como la malaria, diabetes, tuberculosis, inflamación, cáncer, dolor, problemas de las vías respiratorias, infecciones urinarias, intestinales y de la piel; como hepatoprotectores y como remedios contra la picadura de animales venenosos entre otros. Las especies medicinales de esta familia empleadas en la medicina tradicional Mexicana son: el Bejuco morado (*Arrobidaea floribunda* (Kunth.) Loes.), Cebol (*Arrabidaea floribunda* (H.B.K) Standl.), Ahuejote (*Astianthus viminalis* Kunth.Baillon), Cuatecomate (*Crescentia alata* Kunth), Cuatecomate (*Crescentia cujete* L.), Anikab (*Cydista potosina* Schum & Loes.), Hiedra (*Macfadyena agnus cati* (L.) A. Gentry), Cuajilote (*Parmentiera aculeata* CD.), Palo de rosa (*Tabebuia crhisantha* (Jacq.) Nicholson) y Tronadora (*Tecoma stans* (L.) Juss. Ex Kunth) (Argueta, 1994). En el estado de Morelos se reportan las especies *Tronadora Tecoma stans* var. *velutina* DC. y la Jacaranda *Jacaranda mimosaeifolia* D.Don.(Monroy, 2000).

En la Tabla 1, se enlistan las actividades biológicas reportadas en la literatura, de algunas especies de esta familia que son utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de diversas afecciones en las que pudiera estar involucrado un proceso infeccioso.

Tabla. 1

Actividades biológicas de algunas especies de la familia Bignoniaceae

Especie vegetal	Actividades biológicas	Referencia
<i>Catalpa bignonioides</i> Walt.	Citotóxica, antiinflamatoria.	Muñoz-Mingarro et al., 2003.
<i>Catalpa ovata</i> G. Don.	Antimicrobiana, antitumoral, antiinflamatoria.	Kapadia et al., 1996; An et al., 2002; Oh et al., 2002; Moon et al., 2003; Pae et al., 2003.
<i>Crescentia cujete</i> L.	Antimicrobiana, anticancerígeno.	Cáceres et al., 1990; Monroy-Ortiz y Castillo, 2000.
<i>Fernandoa adenophylla</i> (Wall. Ex G. Don).	Antifúngica.	Ali et al., 1998.
<i>Incarvillea sinensis</i> LAM.	Antinociceptiva.	Nakamura et al., 1999, 2001.
<i>Macfadyena unguis-cati</i> (L).A. Gentry.	Antitumoral, antimalárica, antiinflamatoria, antitripanosómica.	Duarte et al., 2000.
<i>Mansoa alliaceae</i> (Lam.) A.G.	Antifúngica, antitumoral.	Freixa et al., 1998; Itokawa et al., 1992.
<i>Mansoa hirsuta</i> D.C.	Antifúngica.	Duarte et al., 2004.
<i>Oroxylum indicum</i> (L). Vent.	Antifúngica, antioxidante, antimutagénica, anticancerígena, antiinflamatoria.	Ali et al., 1998; Chen et al., 1990; Nakahara et al., 2001; 2002; Jiwajinda et al., 2002.
<i>Tecoma stans</i> L. (H.B.K.)	Hipoglucemiante, hipotensora, glucogenolítica, hipocolesterolemia, antimicrobiana.	Lozoya-Meckes y Mellado, 1985; Meckes-Lozoya y Camacho, 1985; Román et al., 1991; Constantino et al., 2003a, b; Binutu y Lajubutu, 1994.

1.7 *Distictis buccinatoria* (DC.) A. H. Gentry. “Tonacaxochitl”



Fig. 2 *Distictis buccinatoria* (DC.) A. H. Gentry.

Sinonimias: *Bignonia cherere* Lindl.; *Bignonia buccinatoria* Mairet ex D.C.; *Phaedranthus buccinatorius* (DC.) Miers.

Nombre común: Bignonia, Distictis, Phaedranthus, Trompetero, Trompetilla grande, Clarín, Hiedra bocina.

Nombres utilizados en la medicina tradicional mexicana: Tonacaxochitl o flor que nace con el sol, Tonalxochitl de Ocuituco, Totonacaxochitl.

Clasificación:

Tabla. 2 Clasificación Taxonómica de *Distictis buccinatoria*.

CLASIFICACIÓN	TAXONOMICA
Familia	Bignoniaceae
Género	<i>Distictis</i>
Especie	<i>buccinatoria</i>

Características:

Tabla. 3 Características de *Distictis buccinatoria*.

• Origen	México
• Altura Aproximada	3-5 m
• Exposición	Sol
• Resistencia a Heladas	Delicada >5 °C
• Vel. de Crecimiento	Medio
• Tipo de Hoja	Perenne
• Meses de Floración	Enero, Febrero, Marzo, Noviembre, Diciembre

Descripción

Distictis buccinatoria, es una planta trepadora vigorosa, siempre verde, con dos hojuelas, la tercera usualmente representada por un zarcillo, oblonga-oval u ovada-elíptica de 5 a 9 cm. de largo. El ápice agudo a redondeado, en la base redonda o subcordada, entera, en la parte mas baja es escamosa, coriáceas; flores en panículas de color púrpura a rojo, panículas terminales con pocas flores, el cáliz es acampanado, de 1 a 1.5 cm. de largo, vagamente 5-dentado, densamente tomentoso; corola coriácea, con forma de tubo o embudo, de 9 a 11 cm de largo, externamente tomentosa, los lóbulos cortos, redondeados (Standley, 1926).

Historia

De acuerdo a los datos obtenidos de fuentes históricas del siglo XVI se puede constatar que esta planta es utilizada en México con fines medicinales desde los tiempos prehispánicos. En la obra de Martín de la Cruz *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* manuscrito azteca de 1552 conocido como el Códice Badiano se hace referencia a la *tonacaxóchitl* en el capítulo denominado Contra la Fetidez de los Enfermos “Este mal olor se quita si se unge el cuerpo con el jugo de las hierbas *ayauhtonixiuh*, *papaloquilitl*, *xiuhecapatli*, bien molidas en agua, más el de las ramas de pino, y de las flores de *ocoxochitl*, *tonacaxochitl*, *totolochtzin* y también espigas” (De la Cruz, 1964). Fray Juan Navarro describe que “Un puño bebido en el agua de cebada o achicoria, sana las fiebres; como emplasto es útil en la erisipela” (Navarro, 1992) siendo éstas las únicas referencias bibliográficas encontradas de esta especie (Figura 2).

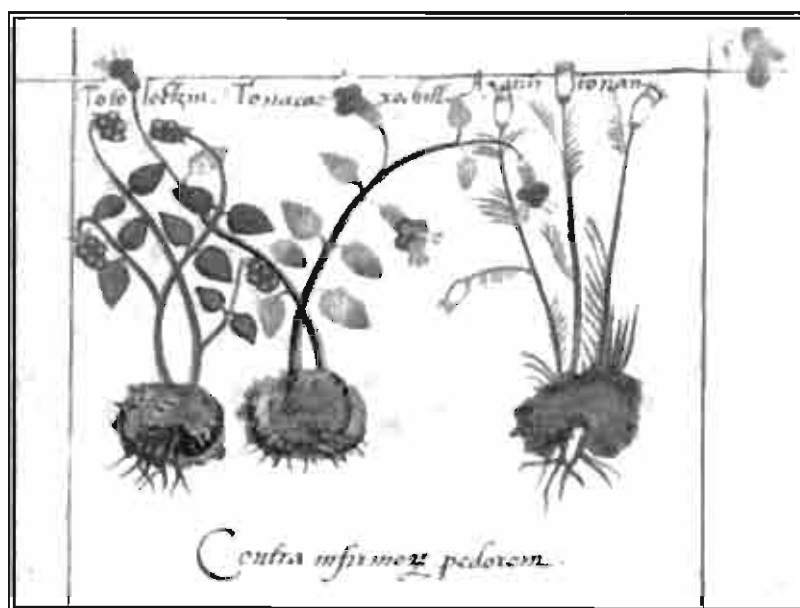


Fig. 3 Tonacaxochitl.

Como se ha podido señalar en el Códice Badiano, la “tonacaxochitl” es un ejemplo de las plantas que aún conserva su nombre inalterado desde época prehispánica hasta la actualidad. El nombre náhuatl de la planta hace referencia a

la “abundancia de flores” que se presentan en el periodo de floración. Del *ton* – abundante y *xóchitl* – flor (Rëmi, 1977).

Datos etnomédicos

El cocimiento de las flores de la “tonacaxochitl” es utilizado por terapeutas tradicionales de la parte norte del estado de Morelos para el tratamiento de problemas de la garganta y para tratar la tos con sangre (comunicación verbal terapeutas tradicionales).

Datos farmacológicos y fitoquímicos

Se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva y no se encontró información al respecto en esta especie ni en el género.

1.8 Ensayos antimicrobianos

La actividad antimicrobiana de extractos, fracciones o productos puros provenientes de plantas, puede ser determinada mediante la observación de la respuesta del crecimiento de los microorganismos al estar en contacto con dichas muestras. Existen varios métodos para medir la actividad antibacteriana y antifúngica, los cuales difieren en cuanto a su sensibilidad y principios. Éstos pueden ser clasificados en tres grupos principales: difusión, dilución y bioautografía (Cos et al., 2006).

Difusión en agar

En este método, una concentración conocida del material a probar es colocada en un reservorio que se pone en contacto con un medio inoculado con el microorganismo, después de un periodo de incubación adecuado se mide el diámetro de inhibición (zona clara rodeada por el desarrollo microbiano). Pueden utilizarse diferentes tipos de reservorios, tales como: discos de papel filtro, cilindros de acero inoxidable, o agujeros en el medio de cultivo, este último se

recomienda principalmente para extractos acuosos ya que no existe ningún tipo de interferencia con el reservorio. La pequeña cantidad de muestra requerida para este ensayo y la posibilidad de probar varias muestras al mismo tiempo en una misma placa, son ventajas de este método (Hadacek y Greger, 2000). Este método no es recomendado para probar muestras no polares ya que no difunden en el agar, lo que daría como resultado falsos negativos (Cos, 2006).

Dilución

En los métodos de dilución, las muestras a ensayar son incorporadas a un medio de cultivo apropiado, en el que se siembran posteriormente los microorganismos. Puede llevarse a cabo en medio líquido o en medio sólido. En el caso del método de dilución en agar, la concentración mínima inhibitoria (CMI) es definida como la concentración más baja capaz de inhibir el desarrollo visible del microorganismo. En el método de dilución en líquido, se mide la actividad mediante el uso de colorantes vitales, mediante el cambio de turbidez en forma visual, o de una manera más exacta midiendo la densidad óptica a 405 nm. Sin embargo, las muestras que no están totalmente solubilizadas pueden interferir con las lecturas de turbidez, por lo que es indispensable utilizar controles negativos de la muestra en el medio de cultivo.

En general, los métodos de dilución son apropiados para ensayar extractos o compuestos polares y no polares (Elof, 1998; Gabrielson et al., 2002; Cos et al., 2006).

Bioautografía

La bioautografía es una técnica que permite detectar actividad antimicrobiana de un extracto, fracción o compuesto puro, directamente en una placa cromatográfica en la que los compuestos bioactivos son observados como manchas blancas sobre un fondo colorido (proporcionado por un colorante vital) de desarrollo microbiano. Esta técnica es de gran utilidad para la búsqueda, detección y aislamiento de agentes antimicrobianos mediante ensayos químico-biodirigidos.

Existen tres diferentes variantes de este método (Hamburguer y Cordell, 1987; Navarro et al., 1988; Rahalison et al., 1994):

Bioautografía directa

En esta técnica, el microorganismo crece directamente sobre una placa de cromatografía en placa fina (TLC).

Bioautografía de contacto

En esta, los compuestos antimicrobianos son transferidos de la placa de TLC a una caja de agar inoculada con el microorganismo.

Bioautografía de recubrimiento con agar

En ésta variante, se aplica directamente sobre la placa cromatográfica, el medio de cultivo previamente inoculado

1.9 Concentración Mínima Inhibitoria

Como se mencionó anteriormente, el método de dilución es ampliamente utilizado y recomendado para determinar la potencia antimicrobiana *in vitro* de extractos complejos, fracciones o compuestos puros y establecer su espectro antimicrobiano (Ríos y Recio, 2005), el cual es expresado en valores numéricos tales como: concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀), concentración inhibitoria al 90% (IC₉₀), concentración mínima inhibitoria (CMI) etc., el más utilizado de éstos, es la determinación de la CMI. Existen muchas controversias con respecto al criterio que debe aplicarse para determinar el nivel de potencia de los extractos, en realidad, a la fecha no existe un criterio establecido sobre el rango de actividad que debe ser considerado como aceptable para los extractos de plantas. Algunos autores han tratado de establecer valores que permitan comparar dicha actividad

contra la de los antibióticos estándar y consideran solamente como activos, aquellos extractos cuyo valor de CMI es igual o menor a 1 mg/mL, y de 100 µg/mL para los productos puros, considerando como una actividad de interés aquellos casos en los que el valor de CMI es igual o menor a 100 µg/mL para los extractos y de 10 µg/mL para los compuestos puros (Ríos y Recio, 2005; Cos et al., 2006). Sin embargo, en nuestra experiencia y de acuerdo a estudios antimicrobianos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Laboratorio de Microbiología, Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS), extractos crudos de plantas con valores de CMI entre 2.5 y 15 mg/mL (Lozoya et al., 1992; Navarro et al., 1996) han conducido al aislamiento de importantes compuestos antimicrobianos (Navarro y Delgado 1999; Alvarez et al., 2001; Zamilpa et al., 2002), y a la producción de fitomedicamentos estandarizados que tienen actividad antifúngica y cuya efectividad clínica ha sido demostrada sin presentar efectos colaterales (Herrera et al., 2003, 2004). De acuerdo con este criterio, extractos con valores de CMI iguales o menores a 8 mg/mL, pueden ser considerados como activos y potencialmente útiles para el cuidado de la salud.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades infecciosas son un problema de salud pública en el mundo (WHO, 2004). En México, según estadísticas del Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI), durante el periodo 1900-2000, la neumonía e influenza fueron la octava causa de defunciones generales a nivel nacional, y las enfermedades intestinales infecciosas, ocuparon la onceava posición (INEGI, 2001). Durante el periodo 2000-2004, las infecciones respiratorias agudas fueron la primera causa de morbilidad de los 15 casos nuevos de enfermedad más importantes, seguida por las infecciones intestinales y las mal definidas (SSA, 2006). Estas estadísticas muestran la importancia que este problema tiene en nuestro país, aun sin considerar en conjunto el número de muertes debidas a otras infecciones, lo que elevaría la cifra total.

Este hecho, aunado al problema de la resistencia microbiana, ha conducido a la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antibiótica (Fostel y Larrey, 2000). En este sentido, gracias a la enorme diversidad de constituyentes químicos que biosintetizan los productos naturales, ya sea como compuestos puros o en forma de extractos estandarizados de plantas, proveen una fuente ilimitada para el descubrimiento de nuevas drogas.

Debido a los problemas ya mencionados, resulta importante volver la vista a la medicina tradicional y al uso de productos naturales. Así, en la última década la utilización y la investigación de plantas medicinales en el mundo han tenido un gran auge, encontrándose que en los países desarrollados se comercializan de manera importante diversos medicamentos herbolarios denominados "fitofármacos". Hoy día, los fitofármacos son utilizados y aceptados ampliamente por la sociedad por lo que las instituciones de investigación e industrias farmacéuticas se han dado a la tarea de desarrollar tecnologías y métodos que

permitan conocer las propiedades farmacológicas y la naturaleza química de los compuestos activos de las plantas a fin de ofrecer productos estandarizados y con dosificaciones adecuadas (Cabieses, 2001).

Otro aspecto a considerar es que una gran parte de la población en nuestro país no tiene acceso a la medicina oficial y recurren al uso de plantas medicinales. De hecho en las áreas rurales de nuestro país muchas de las infecciones de las vías respiratorias, de la piel, intestinales y heridas, son tratadas con remedios tradicionales (Navarro, 2003).

En la presente propuesta de investigación, se plantea el estudio del potencial antimicrobiano de la planta medicinal *Distictis buccinatoria*, la cual es de origen mexicano y ha sido utilizada desde los tiempos prehispánicos con fines medicinales.

En la literatura no existen reportes farmacológicos ni fitoquímicos sobre esta especie, por lo cual su estudio resulta de interés, ya que permitirá valorarla científicamente como antimicrobiana debido a que es utilizada popularmente para el tratamiento de padecimientos en los que, de acuerdo con la sintomatología descrita, pudiese estar involucrado un proceso infeccioso. La información generada, además de fundamentar científicamente el uso etnomédico que se le da a esta planta, puede servir como fuente de nuevos productos antimicrobianos que posteriormente pueden ser utilizados en forma de extractos, fracciones o compuestos puros para generar algún fitomedicamento.

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

El estudio del potencial antimicrobiano de *Distictis buccinatoria*, permitirá el conocimiento y validación científica de esta especie utilizada en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de infecciones, y contribuirá a la obtención de nuevas moléculas antibióticas de origen natural.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

Si *Distictis buccinatoria* es utilizada en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones, entonces debe contener al menos un metabolito secundario con actividad antimicrobiana.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial antimicrobiano de la especie medicinal *Distictis buccinatoria* y detectar, aislar y purificar mediante un estudio químico biodirigido, al menos un compuesto con actividad antimicrobiana.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Recolectar material vegetal de *Distictis buccinatoria* en su hábitat natural y preparar los ejemplares de herbario para su identificación y registro.
2. Preparar extractos de *n*-hexano, diclorometano y metanol con la finalidad de obtener extractos de diferente polaridad.
3. Llevar a cabo las evaluaciones antimicrobianas (mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos orgánicos contra diferentes cepas de microorganismos patógenas para el hombre.
4. Obtener mezclas (fracciones) menos complejas del extracto más activo, mediante cromatografía en columna.
5. Identificar la fracción activa utilizando el método antimicrobiano de dilución en placa.
6. De la fracción activa identificar los compuestos bioactivos mediante el método bioautográfico.
7. Aislar los compuestos activos mediante la aplicación de diferentes técnicas de cromatografía (columna, TLC preparativa, TLC analítica, HPLC).
8. Determinar la CMI de los compuestos activos mediante el método de dilución en placa.
9. Identificar y determinar con la ayuda de las diferentes técnicas espectroscópicas la estructura de algún compuesto activo.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal

Se colectaron flores y hojas de *Distictis buccinatoria* en el municipio de Tetela del Volcán, Morelos. Se prepararon ejemplares de herbario, para su identificación y clasificación en el herbario del Instituto Nacional de Antropología e Historia Morelos (INAHM), quedando registrada bajo el código INHAM-2007.

El material vegetal se extendió en camas de secado en un cuarto oscuro y bien ventilado hasta su completa deshidratación y se trituró con ayuda de un molino eléctrico.

6.2 Detección preliminar de la actividad antimicrobiana

Con el fin de determinar de manera preliminar si el material vegetal colectado tenía actividad antimicrobiana, se prepararon extractos orgánicos de diferente polaridad los cuales fueron sometidos a la prueba de bioautografía directa en la forma que se describe a continuación.

Preparación de extractos I

Extractos de flor

Se colocaron 20 g de flores secas y molidas en 5 matraces Erlenmeyer de 250 mL, a cada uno de ellos se adicionó uno de los siguientes disolventes: metanol, etanol, acetato de etilo, diclorometano y acetona, hasta cubrir totalmente el material vegetal y se extrajeron mediante maceración durante 24 horas a temperatura ambiente. Cada extracto se filtró y concentró mediante evaporación del disolvente a presión reducida en un rotavapor.

Extractos de hoja

Mediante el procedimiento descrito anteriormente, se prepararon extractos de metanol, hexano, acetona, acetato de etilo y diclorometano, utilizando para la preparación de cada uno de ellos 20 g de hoja seca y molida.

Cepa microbiana

El microorganismo utilizado para la evaluación fue el *Staphylococcus aureus* de la colección American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD 29213).

Prueba bioautográfica

Para la prueba bioautográfica se utilizó el método descrito por Navarro y col. (1998). Para ello, los extractos orgánicos obtenidos de la flor fueron aplicados en 2 placas de aluminio de sílica gel 60, las cuales se desarrollaron utilizando como sistema de elución diclorometano:metanol 9.5:0.5. Una de las placas fue revelada con una solución de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico 2N. Sobre la otra placa cromatográfica se dispersó uniformemente una suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* en una concentración de 10^7 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), incubándose durante 24 horas a 37°C. La cromatoplaque se asperjó con cloruro de 2, 3,5-trifeniltetrazolium y se incubó durante 4 horas a 37°C (Fig. 8).

Para la evaluación antimicrobiana preliminar de los extractos orgánicos de la hoja de *D. buccinatoria* (Fig. 9) se utilizó la metodología descrita para la evaluación de los extractos orgánicos de la flor.

6.3 Evaluación antimicrobiana de los extractos orgánicos

Preparación de extractos II

Extractos de flor

De acuerdo al uso médico tradicional de la especie *D. buccinatoria* por terapeutas tradicionales del estado de Morelos (comunicación verbal), se seleccionó la flor como la parte de la planta a ser estudiada químicamente, por lo cual se procedió a preparar una mayor cantidad de extracto con la finalidad de llevar a cabo la evaluación antimicrobiana y el fraccionamiento químico biodirigido.

Cinco kilos ochocientos cincuenta gramos de flores secas y molidas fueron extraídas secuencialmente dejándolas macerar con *n*-hexano durante 24 - 48 horas a temperatura ambiente, después de lo cual, se filtró el disolvente y se evaporó a presión reducida en un rotavapor, se añadió nuevamente el disolvente al material vegetal, repitiendo el proceso 5 veces. Se extendió el material vegetal en una campana de extracción para evaporar los restos del disolvente. Para la obtención del extracto de diclorometano, el material vegetal libre de restos de hexano, fue extraído mediante el procedimiento y número de extracciones descrito anteriormente utilizando diclorometano como disolvente. Finalmente, se realizó el proceso de extracción nuevamente con metanol para obtener el extracto correspondiente. Los extractos obtenidos fueron colocados en frascos de vidrio y se mantuvieron en una campana de extracción, hasta que se evaporaron completamente los restos del disolvente. Se determinó el rendimiento para cada uno de los extractos (Tabla 12).

Extractos de hoja

Debido a que en la prueba bioautográfica se evidenció actividad antimicrobiana en los extractos de las hojas de *D. buccinatoria* y con la finalidad de realizar la evaluación antimicrobiana correspondiente, se prepararon extractos

secuenciales de hexano, diclorometano y metanol, a partir de 200 g de hojas secas y molidas, utilizando la metodología descrita en el párrafo anterior. Se determinó también el rendimiento para cada uno de ellos.

Para llevar a cabo la evaluación antimicrobiana de las hojas y flores de *D. buccinatoria* se utilizó el modelo de doble dilución en agar descrito por Ríos (Ríos et al., 1988), determinándose los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada uno de los extractos orgánicos contra las siguientes cepas de bacterias y hongos, todos ellos patógenos para el hombre.

Tabla. 4 Cepas bacterianas utilizadas en los ensayos.

Microorganismo	Clasificación
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC* 29213
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 08668
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 06539

*ATCC. American Type Culture Collection (Rockville, MD)

Tabla. 5 Cepas de hongos utilizados en los ensayos.

Microorganismo	Clasificación
<i>Candida albicans</i>	ATCC* 10231
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	ATCC 28185
<i>Trichophyton rubrum</i>	ATCC 28188
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 10335

*ATCC. American Type Culture Collection (Rockville, MD)

Tabla.6 Aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* con patrón de resistencia a antibióticos.

Clasificación	Patrón de Resistencia
<i>Staphylococcus aureus</i> CL20-211 (A)	*Dc, Am, Pn
<i>Staphylococcus aureus</i> CL20-523 (B)	Dc, Am, Pn
<i>Staphylococcus aureus</i> CL20-604 (C)	Pn, Amp, Er
<i>Staphylococcus aureus</i> CL20-625 (D)	Pn, Amp, Te
<i>Staphylococcus aureus</i> CL20-630 (E)	Er, Dc, Am, Pn, Er

* Antibióticos: DC= dicloxacilina; Am = amikacina; Pn = penicilina; Amp= ampicilina; Te= tetraciclina.

Evaluación antibacteriana

Para la evaluación antibacteriana de los extractos de hexano, diclorometano y metanol de las hojas y flores de *Distictis buccinatoria* se utilizó el método de doble dilución en agar como se describe en Rojas (Rojas et al., 2001).

Los extractos se disolvieron en Dimetilsulfoxido (DMSO; Merck) y agua; se prepararon diluciones seriadas dobles, las cuales se incorporaron en cajas Petri al medio de cultivo licuado (agar Muller-Hinton). El rango de concentración ensayado estuvo comprendido en el rango de 0.25 - 8 mg/mL.

Las bacterias se mantuvieron en cajas Petri con agar tripticasa de soya (TSA Merck) y se añadió un 5% de sangre de carnero para el mantenimiento de *Streptococcus pyogenes*.

Para el desarrollo de la prueba se inocularon caldos Muller-Hinton (BHM Merck) con cada una de las bacterias a ensayar, los cuales fueron incubados en una estufa bacteriológica a 37 °C. Una vez desarrolladas las bacterias, se ajustó la concentración de los inóculos a una turbidez de 0.5 de McFarland lo que corresponde a una concentración de 10^8 UFC/mL. La densidad del inóculo fue

corroborado espectrofotométricamente (absorbancia de 0.08-0.10 a una longitud de onda de 625 nm). Cada inóculo se diluyó (1:20) y se aplicó en la superficie del agar con una pipeta calibrada, en un volumen de 0.002 mL, para obtener una gota que se dispersó en forma de círculo con un diámetro de 5 a 8 mm y que contenía 10^4 UFC. Las placas se incubaron por 24 horas a 37 °C.

Como estándar de referencia se utilizó Gentamicina y como controles de la prueba Dimetilsulfoxido y el medio de cultivo. Las observaciones se llevaron a cabo por duplicado y los resultados se expresaron como la concentración más baja de extracto que produjo la completa supresión del crecimiento bacteriano (CMI).

Evaluación antifúngica

El ensayo antifúngico se realizó mediante el método de doble dilución seriada en agar como se describe en Navarro et al. (2003).

Los extractos orgánicos de las flores y hojas de *D. buccinatoria* se disolvieron y diluyeron en la forma descrita para el ensayo antibacteriano y se incorporaron al medio de cultivo agar Dextrosa Sabouraud al 4% (SGA Merck) en cajas Petri. El rango de concentración ensayado de los extractos fue de 1-8 mg/mL.

Los hongos filamentosos y la levadura utilizados en el ensayo fueron mantenidos en agar dextrosa papa (SDA Merck).

Para el desarrollo de la prueba se prepararon inóculos de 10^5 células/mL para *Candida albicans* y 10^6 esporas/mL para los hongos filamentosos. De estos inóculos se sembraron 5 µL sobre la superficie del agar. Las cajas Petri fueron incubadas a 29 °C durante 24, 48 y 72 h, dependiendo del tiempo requerido para

observar un crecimiento visible en los controles se consideró 24 h para *C. albicans*, 48 h para *A. niger* y 72 h para los dermatofitos. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la más baja concentración que inhibió el crecimiento visible de los hongos sobre el agar.

· Como estándares de referencia se utilizaron Nistatina y Miconazol. Como controles de la prueba se utilizaron DMSO y el medio de cultivo. Los experimentos fueron realizados por duplicado.

Evaluación antibacteriana contra aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*.

Las cepas de aislados clínicos de *S. aureus* utilizados en el ensayo fueron obtenidos en clínicas del IMSS en la ciudad de Cuernavaca Morelos. Dichas cepas fueron aisladas de exudados faríngeos de pacientes con infecciones recurrentes (5 o más por año) de vías respiratorias altas (faringitis, faringoamigdalitis) y presentaban resistencia a varios antibióticos.

Para el mantenimiento de las cepas, el ajuste del inóculo y la evaluación antimicrobiana, se utilizaron los procedimientos descritos anteriormente en el ensayo antibacteriano.

Las observaciones se llevaron a cabo por duplicado y los resultados se expresaron como la concentración más baja de extracto que produjo la completa supresión del crecimiento bacteriano (CMI).

6.4 Fraccionamiento Químico Biodirigido

Debido a que la flor de *Distictis buccinatoria* es la parte de la planta utilizada por los terapeutas tradicionales del municipio de Tetela del Volcán en el estado de Morelos, y a que el extracto de diclorometano de la flor fue el que demostró mayor actividad en los ensayos antimicrobianos, se decidió realizar el fraccionamiento químico biodirigido de dicho extracto.

Precipitación y separación del polvo blanco

Al concentrar los extractos de diclorometano de las flores de *D. buccinatoria* se observó la formación de un anillo de color blanco (Figura 10), quedando también adherido al matraz un residuo blanquecino al recuperar el extracto concentrado (este residuo fue disuelto para su recuperación con una mezcla de diclorometano-metanol 1:1).

Debido a que en el extracto íntegro se formó una gran cantidad de precipitado blanco, se decidió separarlo del resto del extracto. Para esto, el extracto de diclorometano (79.12 g) fue molido en un mortero y colocado en un matraz de 1000 ml al cual se agregó una mezcla de Diclorometano:Hexano en una proporción 2:1. Se formó un precipitado blanco que fue separado por filtración. El sobrenadante (aguas madres) se concentró nuevamente a presión reducida y se repitió el procedimiento de precipitación en cuatro ocasiones, obteniéndose por un lado 43 g de precipitado blanco (54.35% del extracto total), y por otro lado, 36.12 g del extracto de aguas madres (45.65 % del extracto total).

Se desarrollaron dos placas cromatográficas del polvo blanco, extracto íntegro y extracto de las aguas madres, utilizando como sistema de elusión una mezcla de Hexano:Acetona 7:3, con las cuales se realizó una bioautografía en la forma descrita anteriormente (Figura 11).

Mediante técnicas espectroscópicas y de acuerdo con los datos descritos en la literatura, fue posible determinar la estructura química del compuesto mayoritario (Polvo Blanco) del extracto de diclorometano, el cual fue identificado como ácido ursólico.

Aislamiento y purificación de compuestos

Con la finalidad de separar el extracto de aguas madres en fracciones menos complejas y obtener los compuestos bioactivos, se aplicaron técnicas cromatográficas en columna en forma sucesiva, utilizando sílica gel como fase estacionaria y como fase móvil, mezclas de disolventes de polaridad creciente formadas por hexano y la adición de acetona. La homogeneidad y composición de las fracciones fue monitoreada por cromatografía en placa fina, usando luz UV y una solución de Sulfato Cérico Amoniacal en ácido sulfúrico 2N como reveladores.

Columna I

El extracto de aguas madres de Diclorometano (36.12 g) se sometió a una separación cromatográfica en un embudo de 13 cm de diámetro por 15 cm de largo, a la cual se aplicó el sistema VLC (low vacuum chromatography). La columna se empacó con sílica gel para cromatografía en capa fina (0,015-0,040 mm Merck), agregando hexano y compactándolo hasta una altura de 6.5 cm (con un vaso de precipitado). La elusión de la columna se llevó a cabo con una mezcla de polaridad creciente de n-hexano: acetona y diclorometano: metanol.

Se colectaron 406 fracciones en alícuotas de 225 mL utilizando el siguiente sistema de elusión:

Tabla 7. Fracciones colectadas Columna I

Fracción	Sistema eluyente (columna)	Sistema eluyente TLC
1-36	Hexano: acetona 9:1	Hexano: Acetona 8 : 2
37-84	9:1	7.5 : 2.5
85-142	8.5 : 1.5	7.5 : 2.5
143-214	8.5 : 1.5	7:3
215-298	8 : 2	7:3
299-360	7:3	7:3
361-366	5:5	7:3
367-368	10:0	7:3
369-397	Diclorometano: MeOH 8.5:1.5	Diclorometano: MeOH 8.5:1.5
398- 401	Acetato de etilo: MeOH 9:1	Diclorometano: MeOH 8.5:1.5
402-406	MeOH 100 %	Diclorometano: MeOH 8.5:1.5

La homogeneidad y composición de las 406 fracciones obtenidas fue monitoreada mediante TLC utilizando un sistema Hexano:Acetona 7:3. Las fracciones fueron agrupadas de acuerdo a la homogeneidad y semejanza de las manchas reveladas con sulfato cerico amoniacal en ácido sulfúrico 2N, quedando agrupadas de la siguiente manera:

Tabla 8. Agrupación de fracciones colectadas Columna I

Fracciones	Peso (g)
1-12	0.1065
13-23	5.6932
24-37	1.9311
38-67	1.4995
68-75	0.3854
76-129	0.561
130-149	0.4194
150-296	1.0128
297-301	0.0383
302-368	1.9258
369-372	2.7111
373-402	1.6664
403-406	0.8588

Se determinó la actividad antibacteriana y antifúngica de estas fracciones mediante el método de doble dilución seriada en agar descrito previamente.

Del grupo de fracciones 76-129 se obtuvo un polvo blanco que fue identificado como ácido ursólico, el cual aparece en la mayoría de las fracciones siguientes.

Columna II

De acuerdo con los resultados de los valores de CMI de las fracciones obtenidas en la Columna I, se seleccionaron las fracciones 24-67 (3.4306 g) para aislar los constituyentes bioactivos. Las fracciones fueron disueltas previamente con una pequeña cantidad de diclorometano: metanol, se reunieron y se dejaron secar para redissolver en una mezcla de Hexano: Acetona 9:1.

Se montó una columna de vidrio gravitacional (50 cm de largo por 2.5 cm de diámetro) empacada con 90 g de sílica gel abierta para cromatografía en columna (0.040-0.063mm Merck). La sílica se mezcló con hexano en un vaso de

precipitado, se colocó una capa de arena en la parte inferior de la columna y se le agregó la sílica gel suspendida en hexano. Posteriormente se agregó más hexano y se le administró presión con una bomba para eluir el hexano.

Se colectaron 139 fracciones en alícuotas de 15 mL utilizando el siguiente sistema de elusión:

Tabla 9. Fracciones colectadas Columna II

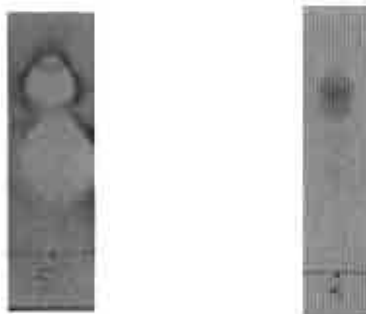
FRACCIONES	SISTEMA columna	TLC
1-42	Hexano: Acetona 9:1	Hexano:Acetona 8:2
43-65	9:1	7:3
66-84	8:2	7:3
85-94	7:3	7:3
95-129	1:1	7:3
130-139	1:1	Diclorometano: MeOH 9:1

La homogeneidad y composición de las fracciones fue monitoreada mediante TLC utilizando un sistema Hexano:Acetona 7:3. Las fracciones fueron agrupadas de acuerdo a su homogeneidad y semejanza al ser reveladas con Sulfato Cérico Amoniacal en ácido sulfúrico 2N, quedando agrupadas de la siguiente manera:

Tabla 10. Agrupación de fracciones colectadas Columna II

Fracciones	Peso (g)
1-4	0.7205
5-7	0.4674
8-18	0.4511
19-22	0.1293
23-38	0.2836
39-42	0.0510
43-86	0.2594
87-107	0.1786
108-112	0.0661
113-129	0.0591
130-135	0.0420
136-139	0.0525

Mediante bioautografía directa se determinó que en el grupo de fracciones 5-18 se encuentran presentes compuestos bioactivos.



Del grupo de fracciones 43-86 se aisló un polvo blanco, que por comparación con los datos espectroscópicos reportados en la literatura se identificó como ácido ursólico.

Columna III

Con la finalidad de obtener los constituyentes presentes en las fracciones 5-18 de la columna II, se reunieron dichas fracciones (0.9185 g) y se sembraron en una columna de vidrio como se describió anteriormente. La columna se empacó utilizando 30 g de sílica gel (0.040-0.063mmMerck) y se eluyó con el sistema Hexano:Acetona (9:1).

Se colectaron 99 fracciones de 5 mL, las cuales fueron monitoreadas mediante TLC utilizando un sistema hexano:Acetona 7:3 y reunidas de acuerdo a su semejanza al ser reveladas con el reactivo de Sulfato Cérico Amoniacal.

Tabla 11. Agrupación de fracciones colectadas Columna III

Fracciones	Peso (mg.)
1-5	0.0182
6-8	0.1543
9-14	0.0464
15-23	0.1331
24-31	0.0662
32-63	0.0401
64-78	0.0655
79-95	0.0164
96	0.0708
97-99	0.0862

Mediante la técnica de separación por Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de Masas, fue posible determinar la estructura química de los compuestos presentes en las fracciones 6-8; 15-23 y 32-63 de esta columna.

6.5 Actividad Mínima Inhibitoria del Ácido Ursólico

Se determinó la actividad mínima inhibitoria del ácido ursólico mediante la técnica de bioautografía directa descrita anteriormente.

6.6 Cuantificación de Ácido Ursólico y Oleanólico en los extractos orgánicos mediante HPLC

Debido a que en muchas especies vegetales se biosintetizan el ácido ursólico y el ácido oleanólico juntos, se decidió determinar y cuantificar en los extractos orgánicos de la flor la presencia de ambos compuestos mediante HPLC.

Curva de Calibración:

Se obtuvo la curva de calibración de ambos compuestos, utilizando estándares comerciales (Sigma) en un equipo Alliance Waters, con un detector de arreglo de fotodiodos Waters 2996 a una $\lambda = 225$ nm y un módulo de separación Waters 2695. Se utilizó una Columna Merck Lichrocart 125-4 Lichrospher 100 RP-18 (5 μ m) de 10 cm, un sistema de elución: Acetonitrilo:Metanol (CH₃-CN: MeOH 65:35) y un flujo de 0.5 mL/min.

Preparación de los estándares:

Se pesaron 2.5 mg de cada uno de los estándares y se disolvieron individualmente en 1 mL de MeOH grado HPLC, se hicieron las siguientes diluciones de cada uno:

50 μ L de estándar + 950 μ L de MeOH

100 μ L de estándar + 900 μ L de MeOH

200 μ L de estándar + 800 μ L de MeOH

400 μ L de estándar + 600 μ L de MeOH

Así se prepararon muestras en un rango de concentración de 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/mL inyectando 20 μ L al HPLC para consruir las curvas repectivas.

El valor de r^2 para la curva del ácido ursólico fue de 0.9922, y el tiempo de retención de 5.087 minutos.

Fig. 4 Curva de Calibración ácido ursólico.

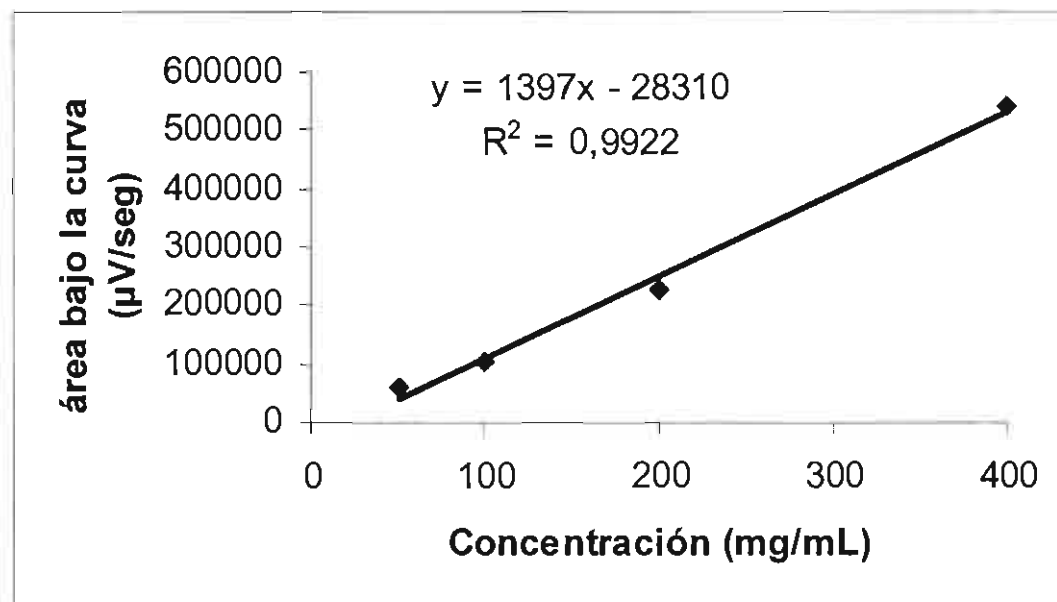
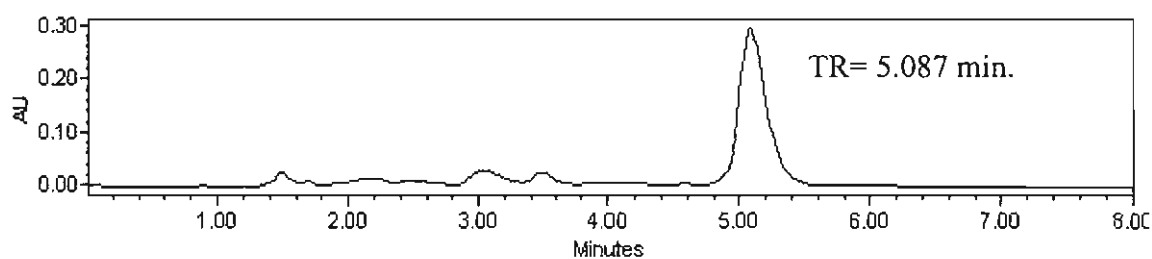


Fig. 5 Cromatograma ácido ursólico HPLC.



El valor de r^2 para la curva del el Ácido Oleanólico fue de 0.997 y el tiempo de retención de 4.98 minutos.

Fig. 6 Curva de Calibración ácido óleanólico.

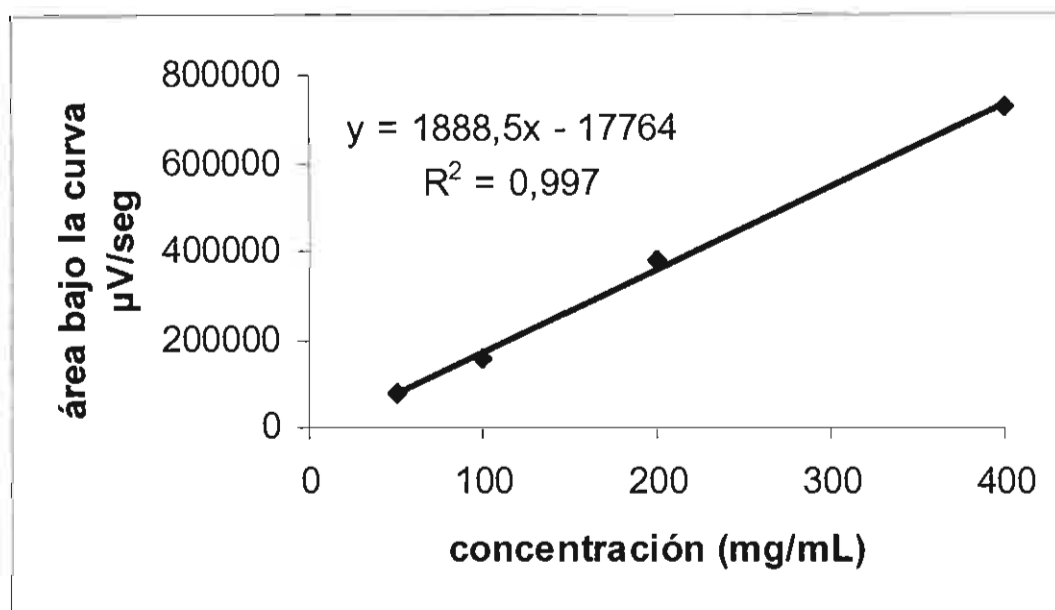
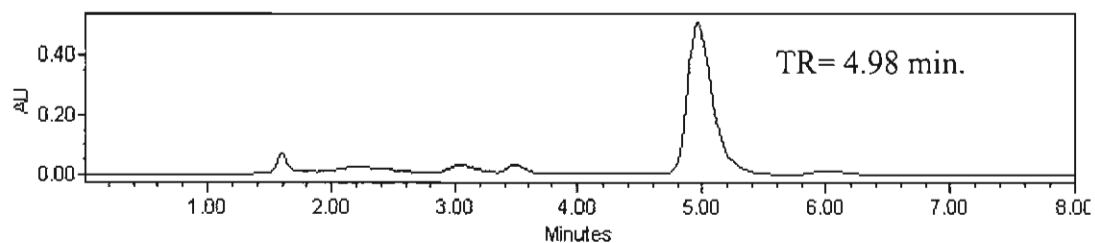


Fig. 7 Cromatograma ácido oleanólico HPLC.



Preparación de muestras:

Se pesaron 2 mg de extracto y se disolvieron en 1 mL de MeOH grado HPLC y se inyectaron alícuotas de 20 μL al cromatógrafo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las Figuras 8 y 9 se muestran los resultados de la evaluación antimicrobiana preliminar mediante las pruebas bioautográficas de los 5 extractos (I) de las flores y hojas de *D. buccinatoria*.

Figura 8. Bioautografía directa de extractos (I) de las flores

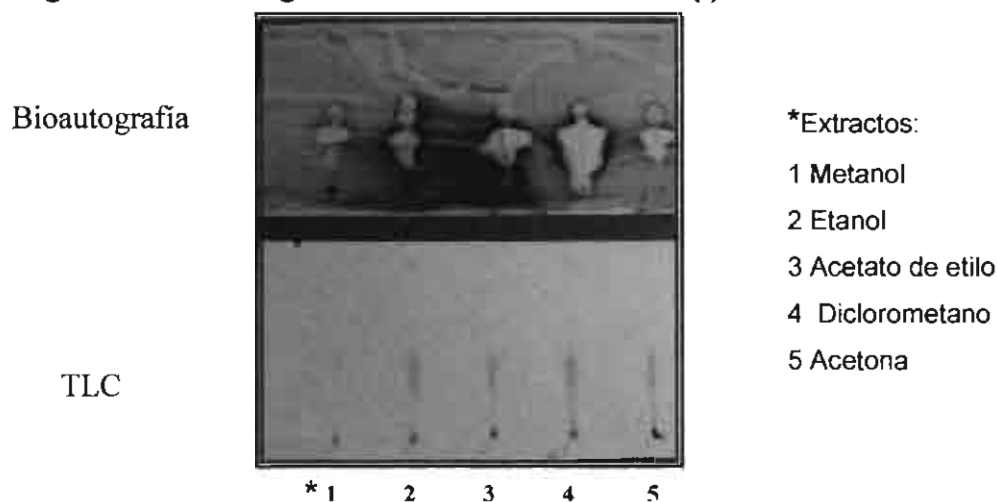
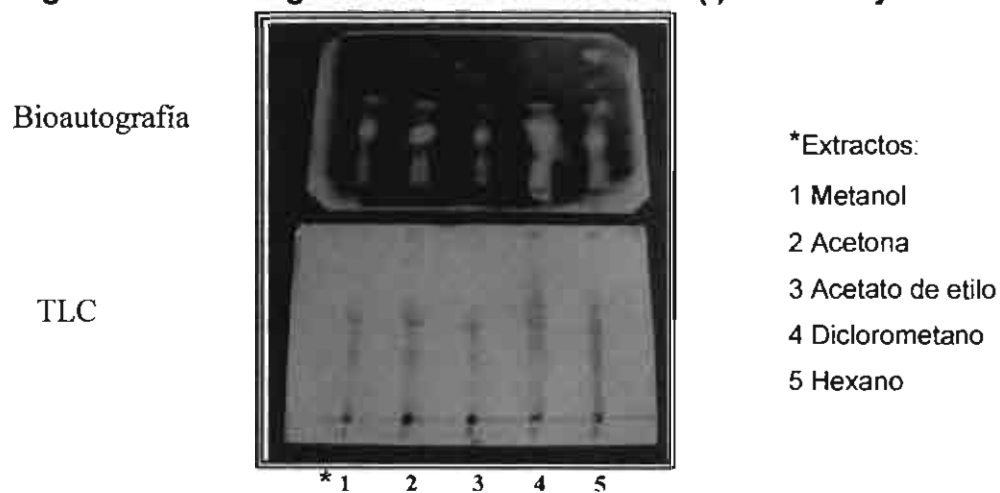


Figura 9. Bioautografía directa de extractos (I) de las hojas



Mediante esta prueba fue posible determinar la presencia de manchas blancas de inhibición bacteriana sobre un fondo colorido de desarrollo bacteriano, lo que indica la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana.

En la Tabla 12 se muestran los rendimientos de los extractos (II) por extracción sucesiva con hexano, diclorometano y metanol de las flores y hojas de *Distictis Buccinatoria*, los cuales fueron calculados en relación al peso seco del material vegetal que se utilizó para el proceso de extracción.

Tabla 12. Rendimiento de los extractos (II)

Parte aérea	Extracto	Rendimiento % ^a
Flor	Hexano	0.99
Flor	Diclorometano	1.36
Flor	Metanol	8.33
Hoja	Hexano	0.95
Hoja	Diclorometano	2.08
Hoja	Metanol	9.42

^a Residuo seco del extracto en relación al peso seco del material vegetal

De los extractos orgánicos obtenidos mediante el proceso de extracción secuencial de las hojas y flores de *D. buccinatoria*, el metanol fue el disolvente que proporcionó un mayor rendimiento en ambos casos. El rendimiento de los extractos hexánico y metanólico obtenidos de las hojas fue mayor que el obtenido de los extractos de las flores.

En la Tabla 13 se muestran los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos (II) de las hojas y flores de *D. buccinatoria*, así como los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenidos para los extractos correspondientes.

**Tabla 13. Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de
*D. buccinatoria***

Parte Ensayada	Extracto	CMI mg/mL					
		S.a. ^a	S.p.	S.f.	E.c.	K.n.	S.t.
Flor	Hexano	4	2	>8	>8	>8	>8
Flor	Diclorometano	0.5	0.25	8	>8	>8	>8
Flor	Metanol	8	4	>8	>8	>8	>8
Hoja	Hexano	4	4	>8	>8	>8	>8
Hoja	Diclorometano	4	2	>8	>8	>8	>8
Hoja	Metanol	8	8	>8	>8	>8	>8
Gentamicina ^b		5	5	10	10	10	10

^a Especies bacterianas: S.a. = *Staphylococcus aureus*; S.p. = *Streptococcus pyogenes*; S.f.= *Enterococcus faecalis*; E.c.= *Escherichia coli*; K.n. = *Klebsiella pneumoniae*; S.t. = *Salmonella typhi*.

^bAntibiótico de referencia (µg/mL)

Los resultados de CMI obtenidos en la evaluación antibacteriana mostraron que todos los extractos ensayados tanto de la flor como de la hoja inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, presentando valores de CMI en el rango de 0.25 - 8 mg/mL. El extracto de diclorometano de la flor, fue el que presentó mayor actividad contra estas dos bacterias con valores de CMI de 0.5 y 0.25 mg/mL respectivamente. El extracto de diclorometano de la flor fue el único que inhibió el desarrollo de *Enterococcus faecalis* a una concentración de 8 mg/mL. Ninguno de los extractos evaluados inhibió el desarrollo de las bacterias Gram-negativas a una concentración de 8 mg/mL.

En la Tabla 14 se muestran los resultados de la evaluación antifúngica de los extractos (II) de las hojas y flores de *D. buccinatoria*, y los valores de

concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenidos para los extractos correspondientes.

Tabla 14. Actividad antifúngica de los extractos orgánicos de *D. buccinatoria*

Parte Ensayada	Extracto	CMI mg/mL			
		C.a. ^a	T.m.	T.r.	A.n.
Flor	Hexano	>8	8	8	>8
Flor	Diclorometano	>8	8	4	>8
Flor	Metanol	>8	>8	>8	>8
Hoja	Hexano	>8	8	8	>8
Hoja	Diclorometano	>8	4	4	>8
Hoja	Metanol	>8	8	8	>8
Nistatina ^b		0.008	NE	NE	NE
Miconazol ^b		NE ^c	0.008	0.008	0.016

^a C.a. = *Candida albicans*; T.m. = *Trichophyton mentagrophytes*; T.r. = *Trichophyton rubrum*; A.n. = *Aspergillus niger*.

^b Antimicóticos de referencia (µg/mL)

^c NE = No ensayado

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo antifúngico se puede observar lo siguiente: Ninguno de los extractos ensayados inhibió el desarrollo de la levadura *Candida albicans* a una concentración de 8 mg/mL. Los dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum* fueron inhibidos por los extractos de hexano y diclorometano de la flor y por los tres extractos orgánicos de la hoja en el rango de concentración de 4-8 mg/mL, siendo el extracto de diclorometano de la hoja el que presentó un mayor efecto, con valores de CMI de 4 mg/mL para ambos dermatofitos. Ninguno de los extractos ensayados inhibió el desarrollo del hongo *Aspergillus niger* a una concentración de 8 mg/mL.

En la Tabla 15 se muestran los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos (II) de las hojas y flores de *D. buccinatoria* contra aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*, así como los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenidos para los extractos correspondientes.

Tabla 15. Actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de *D. buccinatoria* contra cepas de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos.

Parte Ensayada	Extracto	CMI mg/mL				
		Aislados clínicos de <i>Staphylococcus aureus</i>				
		^a A	B	C	D	E
Flor	Hexano	8	8	8	8	>8
Flor	Diclorometano	1	0.5	0.5	1	2
Flor	Metanol	>8	>8	>8	>8	>8
Hoja	Hexano	1	1	0.5	1	2
Hoja	Diclorometano	1	1	1	1	2
Hoja	Metanol	2	2	2	2	4
Gentamicina ^b		5	5	5	5	5

^a Aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* (CL20): A=211; B=523; C= 604; D= 625; E= 630

^b Antibiótico de referencia (µg/mL)

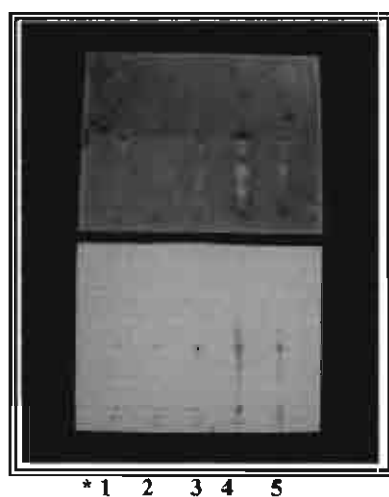
En la Figura 10 se muestra el anillo blanco formado al concentrar el extracto de diclorometano de las flores de *D. buccinatoria* y el residuo que queda adherido al matraz.

Figura 10. Polvo blanco del extracto de diclorometano de las flores de *D. buccinatoria*.



En la Figura 11 se muestra la bioautografía directa del polvo blanco, así como de los extractos íntegro y de aguas madres de Diclorometano.

Figura 11. Bioautografía de los polvos y extractos de diclorometano de las flores de *D. buccinatoria*.



*1, 2, 3 = Polvo blanco; 4= Extracto íntegro de diclorometano (DM);
5= Extracto de Aguas madres de DM.

En la bioautografía se observa que el polvo blanco, corresponde al compuesto mayoritario del extracto y posee actividad antimicrobiana. Así mismo, se puede observar la presencia de otros compuestos bioactivos.

En la tabla 16 se muestran los resultados de la evaluación antibacteriana de las fracciones obtenidas de la Columna I del extracto de Diclorometano de las flores de *D. buccinatoria*.

Tabla 16. Actividad antibacteriana de las fracciones de la Columna I del extracto de diclorometano de las flores de *D. buccinatoria*

Fracciones	CMI mg/mL					
	S.a.*	S.p.	S.f.	E.c.	K.n.	S.t.
1-12	>1	>1	>1	>1	>1	>1
13-23	>1	1	>1	>1	>1	>1
24-37	0.5	0.25	1	>1	>1	>1
38-67	0.5	0.50	1	>1	>1	>1
68-75	1	0.50	>1	>1	>1	>1
76-129	1	0.50	>1	>1	>1	>1
130-149	0.5	0.50	>1	>1	>1	>1
150-296	1	1	>1	>1	>1	>1
297-301	1	1	>1	>1	>1	>1
302-368	1	1	>1	>1	>1	>1
369-372	>1	>1	>1	>1	>1	>1
373-406	>1	>1	>1	>1	>1	>1
Gentamicina ^b	5	5	10	10	10	10

^a Especies bacterianas: S.a. = *Staphylococcus aureus*; S.p. = *Streptococcus pyogenes*; S.f.= *Enterococcus faecalis*; E.c.= *Escherichia coli*; K.n. = *Klebsiella pneumoniae*; S.t. = *Salmonella typhi*.

^b Antibiótico de referencia (µg/mL)

Las fracciones 1-12 fueron inactivas, las fracciones 13-368 presentaron actividad inhibitoria contra *Streptococcus pyogenes* en un rango de concentración de 0.25-1 mg/mL, siendo éste el microorganismo que demostró mayor susceptibilidad. Las fracciones 24-368 presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus* en un rango de concentración de 0.5-1 mg/mL. El *Enterococcus faecalis* fue inhibido por las fracciones 24-67 a una concentración de 1 mg/mL. Ninguna de las fracciones demostró actividad inhibitoria contra las bacterias Gram-negativas a una concentración de 1 mg/mL.

En la tabla 17 se muestran los resultados de la evaluación antifúngica de las fracciones obtenidas de la Columna I del extracto de Diclorometano de las flores de *D. buccinatoria*.

Tabla 17. Actividad antifúngica de las fracciones de la Columna I del extracto de diclorometano de las flores de *D. buccinatoria*

Fracciones	CMI mg/mL			
	C.a. ^a	T.m.	T.r.	A.n.
1-12	>1	>1	>1	>1
13-23	>1	>1	>1	>1
24-37	>1	0.25	0.125	>1
38-67	>1	0.25	0.125	>1
68-75	>1	1	0.50	>1
76-129	>1	1	0.50	>1
130-149	>1	0.50	0.25	>1
150-296	>1	0.50	0.25	>1
297-301	>1	1	0.5	>1
302-368	>1	1	0.5	>1
369-372	>1	>1	>1	>1
373-406	>1	>1	>1	>1
Nistatina ^b	10	NE	NE	NE
Miconazol ^b	NE ^c	8	8	16

^a C.a. = *Candida albicans*; T.m. = *Trichophyton mentagrophytes*; T.r. = *Trichophyton rubrum*; A.n. = *Aspergillus niger*. ^b Antimicóticos de referencia. ^c NE = No ensayado

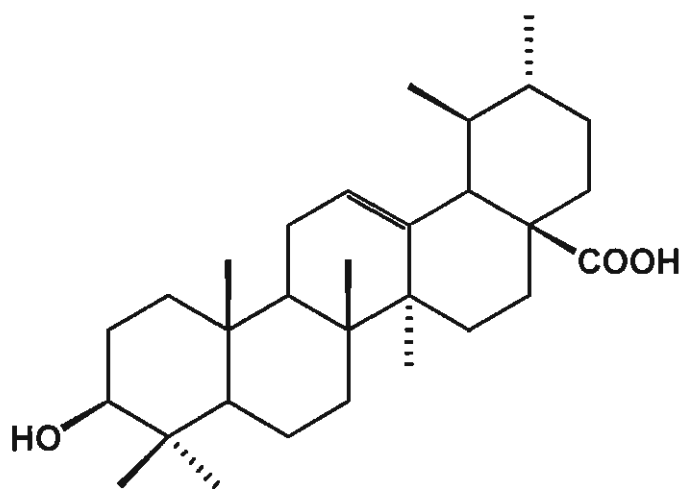
^b Antifúngicos de referencia (µg/mL)

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede observar que ninguna de las fracciones inhibió el desarrollo de *C. albicans* y *A. niger* a una concentración de 1 mg/mL. Las fracciones 24 a la 368 inhibieron el desarrollo de *T. mentagrophytes*, con valores de CMI en un rango de 1 a 0.25 mg/mL, siendo las fracciones 24-67 las que presentaron una actividad antifúngica más potente (CMI de 0.25 mg/mL). Las fracciones 1-23 y 369-406 no presentaron actividad contra este dermatofito. Las fracciones 24-368 presentaron actividad antifúngica contra

T. rubrum con valores de CMI en un rango de concentración de 0.5 a 0.125 mg/mL, siendo las fracciones más activas las 24-67 con un valor de CMI de 0.125 mg/mL. Las fracciones 1-23 y 369-406 no inhibieron el desarrollo de este hongo a una concentración de 1 mg/mL.

En la Figura 12 se muestra la estructura del compuesto mayoritario del extracto de diclorometano, el cual de acuerdo a pruebas espectroscópicas y a los datos reportados en la literatura, se identificó como ácido ursólico.

Figura 12. Estructura química del ácido ursólico.

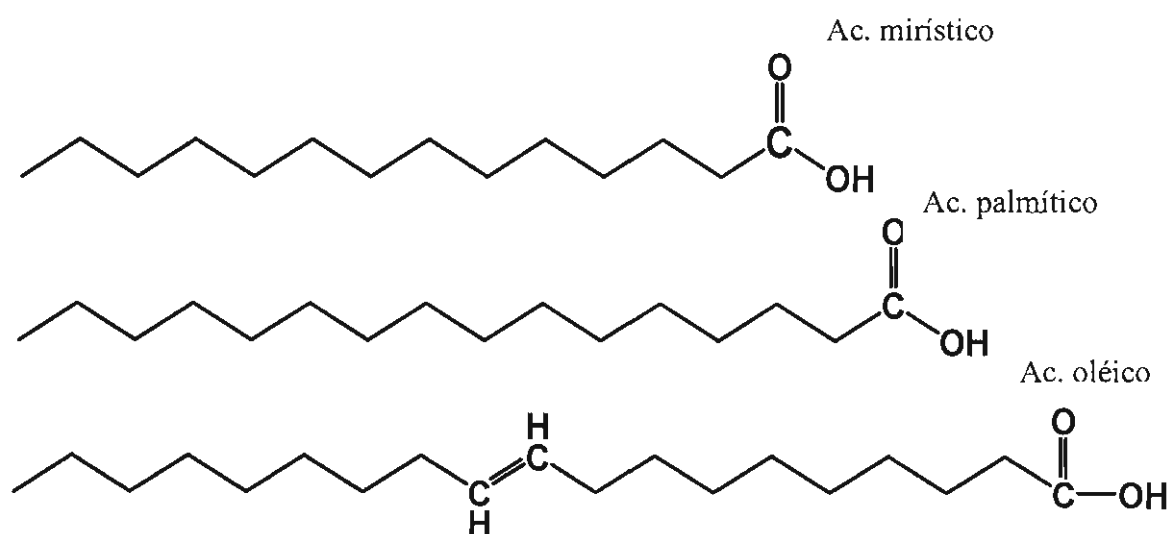


El ácido ursólico ((ácido 3β-hidroxi-urs-12-en-28-oico) es un compuesto triterpenoide, ampliamente distribuido en el reino vegetal. Diversas investigaciones científicas llevadas a cabo con el ácido ursólico han demostrado que este compuesto posee importantes actividades biológicas tales como: hepatoprotector (Ma et al., 1986; Lin et al., 1988; Gan y Lin 1988; Shukia et al., 1992; Vidal et al., 2007), antitumoral (Ohigashi et al., 1986; Casi et al., 2007), quimioterapéutico por su actividad como inhibidor de la metástasis de las células

tumorales (Liu 2005), antimicrobiano (Collins y Charles 1987; Becher 2005), antiinflamatorio (Kosuge et al., 1985; Hang et al., 1994; Vasconcelos et al., 2006), citotóxico (Lee et al., 1988), antimutagénico (Aparecida et al., 2006), antiviral (Yim et al., 2006), analgésico (Vasconcelos et al., 2006), antituberculoso (Woldemichael et al., 2003; Jiménez et al., 2005), se reporta también actividad antimicrobiana contra *Streptococcus pneumonia*, *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE), y *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) (Hourichi et al., 2007).

La técnica de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas permitió determinar que la reunión de fracciones 6-8 de la columna III está constituida por una mezcla de los ácidos grasos: palmítico, oléico y mirístico (Figura 13).

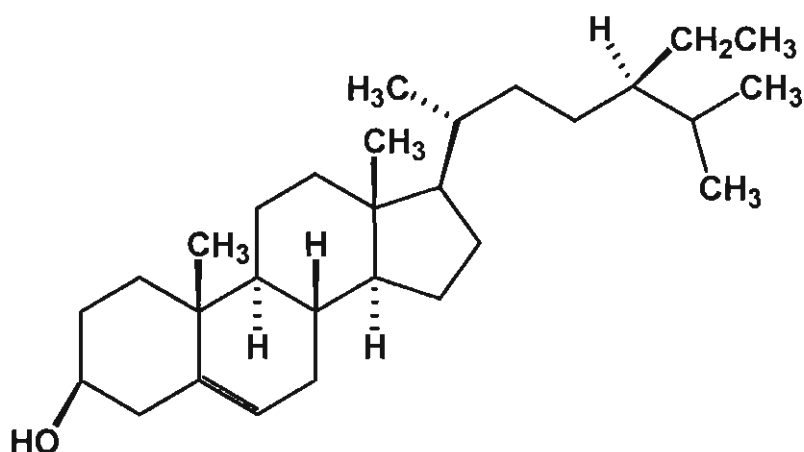
Figura 13. Estructura química de los ácidos mirístico, palmítico y oléico.



Las fracciones 15-23 de la columna III, contienen una mezcla de β -sitosterol y estigmasterol en una proporción 80:20. De las fracciones 32-63 de la columna III

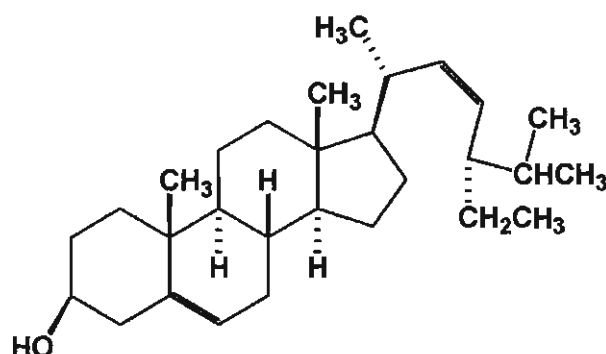
se obtuvieron cristales blancos identificados como β -sitosterol. Las estructuras de estos compuestos se muestran en las figuras (14 y 15).

Figura 14. Estructura química del β -sitosterol.



De acuerdo con los reportes encontrados en la literatura, el β -sitosterol posee actividad gastroprotectora (Navarrete et al., 2002), citotóxica (Naguyen 2004), antipirética e inmunomoduladora (Navarro et al., 2001). En ensayos antimicrobianos llevados a cabo mediante la técnica de difusión en agar, se reporta actividad antibacteriana y antifúngica a concentraciones de 1 mg/disco (Singh y Dubey, 2001; Sing y Singh, 2003), así como una concentración mínima inhibitoria de 128 mg/mL contra *Mycobacterium tuberculosis* (Saludes et al., 2002). Se reporta actividad antiinflamatoria en una mezcla de β -sitosterol, estigmasterol y campesterol (Navarro et al., 2001).

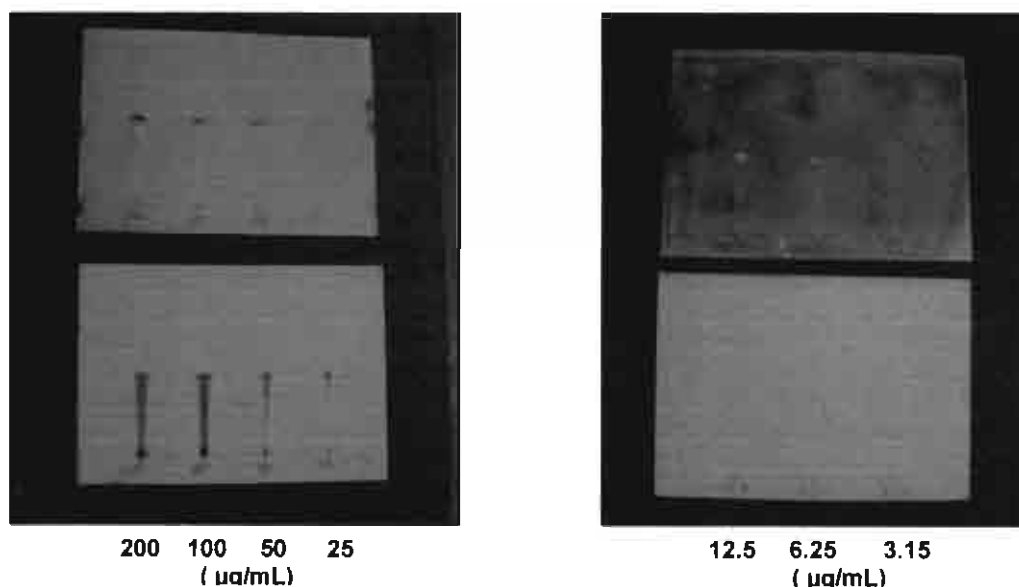
Figura 15. Estructura química del Estigmasterol.



En la literatura se describe que el estigmasterol posee actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* a una CMI de 32 mg/mL (Saludes et al., 2002) y actividad antiinflamatoria (Navarro et al., 2001).

En la figura 16 se puede observar la determinación de la Actividad Mínima Inhibitoria (AMI) del ácido ursólico mediante la técnica de bioautografía directa, la cual tiene un valor de 6.2 µg/mL. Para el Ac. oleanólico se determinó una AMI de 1.5 µg/mL, para la mezcla de ácidos grasos una AMI de 3.1 µg/mL y el β-sitosterol no presentó actividad a una concentración de 100 µg/mL.

Figura 16. Actividad Mínima Inhibitoria del Acido Ursólico.



En la tabla 18 se presentan los resultados de la cuantificación de las concentraciones de ácido ursólico y ácido oleanólico en los extractos orgánicos de *D. buccinatoria* mediante HPLC.

Tabla 18. Contenido de ácidos ursólico y oleanólico en los extractos orgánicos de las flores y hojas de *Distictis buccinatoria*.

Muestra	Extracto	Ac. ursólico mg/g de extracto	Ac. oleanólico mg/g de extracto
FR-H ^a	Flor hexano	112.56	58.34
FR-DM	Flor diclorometano	733.6	ND ^b
FR-M	Flor metanol	ND	ND
FR-D Lavado	Sobrenadante del extracto de diclorometano que se limpio del polvo	18.66	ND
FRDM-POLVO	Precipitado formado en el extracto de diclorometano	997.76	ND
HR-H	Hoja hexano	22.19	17.27
HR-DM	Hoja diclorometano	236.24	93.24
HR-M	Hoja metanol	ND	ND

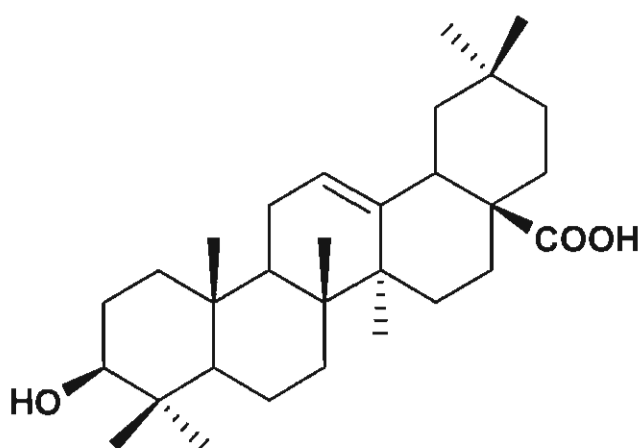
^a: FR-H = Extracto de flor hexánico; FR-D= Extracto de flor diclorometano; FR-M= Extracto de flor metanólico; Extracto de hoja hexánico; FR-D= Extracto de hoja diclorometano; FR-M= Extracto de hoja metanólico.

^b: No detectado.

Como puede observarse, la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución de los extractos orgánicos de las hojas y flores de *D. buccinatoria*, permitió evidenciar que las flores de *D. buccinatoria*, biosintetizan una gran cantidad de ácido ursólico (73 % del extracto de diclorometano), encontrándose también presente en la hoja, aunque en mucho menor proporción. Así mismo, se

biosintetiza el ácido óleanólico (Figura 17), tanto en la hoja como en flor, aunque se encuentra en mucho menor concentración que el ácido ursólico.

Figura 17. Estructura química del ácido oleanólico.



De acuerdo a los datos reportados en la literatura, el ácido oleanólico ha sido aislado de diversas especies vegetales y posee importantes actividades biológicas, tales como: hepatoprotectora, antifúngica, antiinflamatoria, (Liu 1995), anticancerosa (Ohigashi et al., 1986; Wang et al., 2006) inmunomoduladora y antimicrobiana (Liu 2005), teniendo también una importante actividad antimicrobiana contra bacterias resistentes (Houruchi et al., 2007).

Cabe mencionar que la evaluación antimicrobiana preliminar de los extractos orgánicos (I) obtenidos de las flores y hojas de *Distictis buccinatoria* mediante el método de bioautografía directa resultó pertinente debido a que evidenció actividad inhibitoria del desarrollo microbiano, por lo que se consideró importante continuar con el estudio de esta especie vegetal.

Las pruebas de bioautografía directa del polvo blanco, de los extractos íntegro y de aguas madres de diclorometano, así como de las fracciones obtenidas de la Columna I del extracto de aguas madres de diclorometano, pusieron de manifiesto que la actividad antimicrobiana del extracto de diclorometano de las flores de *D. buccinatoria* es debida a la presencia e interacción de varios compuestos.

De acuerdo con los valores de CMI obtenidos de la evaluación antibacteriana de los extractos orgánicos se pudo observar que ésta planta medicinal presentan un efecto antibacteriano selectivo hacia las bacterias Gram-positivas. Estos resultados, convalidan el uso médico que dan a esta especie los terapeutas tradicionales del estado de Morelos, quienes utilizan las flores de este vegetal para el tratamiento de enfermedades de la garganta y la tos. Los microorganismos que presentaron una mayor sensibilidad hacia los extractos fueron el *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus pyogenes*. Ambos microorganismos, son patógenos frecuentes en éstos padecimientos.

Los resultados obtenidos en el estudio antibacteriano contra aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resultan especialmente importantes y sugieren que esta especie puede constituir una alternativa en el tratamiento de procesos infecciosos causados por cepas de este microorganismo, con resistencia a algunos de los antibióticos utilizados en la clínica.

Los resultados obtenidos en esta investigación constituyen el primer reporte científico de esta especie y permiten proponer a *D. buccinatoria* como una especie con potencial antimicrobiano. Así mismo, de acuerdo a la naturaleza de los compuestos mayoritarios aislados, se sugiere que esta especie vegetal pudiese tener también actividad antiinflamatoria, citotóxica, antitumoral, hepatoprotectora, inmunomoduladora y antituberculosa.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en las evaluaciones antimicrobianas llevadas a cabo con los extractos orgánicos de las flores y hojas de *Distictis buccinatoria* y el fraccionamiento químico-biodirigido de extracto de diclorometano de las flores permitieron concluir que esta planta medicinal:

- Tiene un efecto antibacteriano selectivo hacia bacterias Gram-positivas.
- Inhibe el desarrollo de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* provenientes de exudados faríngeos que presentan resistencia a algunos de los antibióticos utilizados en la clínica.
- Posee actividad antifúngica contra los dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton rubrum*.
- Biosintetiza en sus flores ácido ursólico como compuesto mayoritario, encontrándose también en menor proporción β -sitosterol, estigmasterol y los ácidos oleanólico, mirístico, palmítico y oleico.
- Posee compuestos que de acuerdo a los reportes de la literatura tienen actividad antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, citotóxica, antitumoral, hepatoprotectora y antituberculosa.
- Representa una alternativa para el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias causadas por *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*.

- La actividad antimicrobiana del extracto de diclorometano de las flores es debida a la presencia e interacción de varios compuestos.
- Los datos experimentales obtenidos y las actividades biológicas reportadas en la literatura de los compuestos identificados, convalidan los usos de *Distictis buccinatoria* por los terapeutas tradicionales del estado de Morelos para el tratamiento de infecciones de vías respiratorias, inflamación, fiebre y la tos con sangre. Así mismo, sustentan que el criterio etnobotánico es útil en la selección de especies bioactivas.
- Los resultados de ésta investigación constituyen el primer reporte en la literatura que brinda un sustento científico al uso medico tradicional de *D. buccinatoria*, la cual ha sido utilizada en México desde los tiempos prehispánicos con fines medicinales.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación y acorde al uso médico tradicional de *Distictis buccinatoria*, se consideran importantes las siguientes perspectivas:

- Determinar el potencial antimicrobiano de esta planta medicinal contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina.
- Determinar el potencial antimicrobiano contra cepas sensibles y resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria.
- Continuar con el estudio fitoquímico para determinar la naturaleza química de los otros compuestos presentes en esta especie y por ende, otras posibles actividades biológicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acuña G. (2003). Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. *Rev Chil Infect.* 20: 7-10.
2. Ali RM, Houghton PJ, Hoo TS. (1998). Antifungal activity of some Bignoniaceae found in Malaysia. *Phytother Res.* 12: 331-334.
3. Álvarez L, Pérez MC, González JL, Navarro V, Villarreal ML, Olson JO. (2001): An Antimycotic Spirostan Saponin from *Solanum chrysotrichum*. *Planta Med.* 67: 372-374.
4. An SJ, Pae HO, Oh GS, Choi BM, Jeong S, Jang SI, Oh H, Kwon TO, Song CE, Chung HT. (2002). Inhibition of TNF-alpha, IL-6 productions and NF-kappaB activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *Int Immunopharmacol.* 2: 1173-1181.
5. Aparecida F, Aparecida C, Silva M, Hibary F, Cunha W, Crispim D. (2006). Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. *Life Sci.* 22:1268-1273.
6. Argueta A, Cano L, Rodarte M. (1994). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Tomo 1-3. Instituto Nacional Indigenista, México D.F. 1786 pp.
7. Bayon R, Lovink JS, Veening W. (2000). Financiamiento de la conservación de la biodiversidad. Serie de informes técnicos del

Departamento de Desarrollo Sostenible. Banco Interamericano de Desarrollo Washington D.C. p. 4.

8. Becher H, Scher JM, Speaman JB, Zapp J. (2005). Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from *Lythrum salicaria*. *Fitoterapia*. 76: 580-584.
9. Bertram GK. (2001). Farmacología básica y clínica octava edición. Editorial El Manual Moderno. México, D.F. p. 849.
10. Binutu OA, Lajubutu BA. (1994). Antimicrobial potentials of some plant species of the Bignoniaceae family. *Afr J Med Med Sci*. 23: 269-273.
11. Binutu OA, Adesogan K, Okogun J. (1996). Antibacterial and Antifungal Compounds from *Kigelia pinnata*. *Planta Med*. 62: 352-353.
12. Cabieses F. (2001). A favor y en contra del uso de las plantas medicinales. En 5° Simposio Internacional de Fitofármacos. Farmasa México, D.F. p. 7.
13. Cáceres A, Cano O, Samayoa B, Aguilar L. (1990). Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders and a screening of 48 plants against enterobacteria. *J Ethnopharmacol*. 30: 55-73.
14. Calbo E, Garau J. (2004). Telitromicina. *Revista Española de Quimioterapia*. 17: 15-25.
15. Calderon JE. (1999). La resistencia antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* como problema de salud pública. *Salud Pública de Méx*. 41: 397-404.

16. Carvalho LH, Rocha EM, Raslan DS, Olivera AB, Kretti AU. (1988). In vitro activity of natural and synthetic naphthoquinones against erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Braz J Med Biol Res.* 21: 485-487.
17. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. (1990). Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radical Biol Med.* 9: 19-21.
18. Clardy J, Walsh C. (2004). Lessons from natural molecules. *Nature.* 432: 829-837.
19. Collins MA, ND Charles HP. (1987). Antimicrobial activity of carnosol and ursolic acid: two anti-oxidant constituents of *Rosmarinus officinalis*. *Food Microbiol.* 4: 311-315.
20. Constantino L, Raimondi L, Pirisino R, Brunetti T, Pessotto P, Giannessi F, Lins PA, Barlocco D, Antolini L, El-Abady S. (2003). Isolation and pharmacological activities of the *Tecoma stans* alkaloids. *Farmaco.* 58: 781-785.
21. Constantino L, Lins A, Barlocco D, Celotti F, el-Abady S, Brunetti T, Maggi R, Antolini L. (2003). Characterization and pharmacological actions of tecostanine, an alkaloid of *Tecoma stans*. *Pharmazie.* 58: 140-142.
22. Cordell GA, Colvard MD, (2005). Some thoughts on the future on the future of ethnopharmacology. *J Ethnopharmacol.* 100: 5-14.
23. Cos P, Vlietick A, Vanden D, MaesL, (2006). Anti-infective potencial of natural products: How to develop a stronger in vitro Prof-of-cincept. *J Ethnopharmacol.* 106: 290-302.

24. Díaz JL. (1977). Usos de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas II. IMEPLAM AC, México, D.F. 329 pp.
25. De la Cruz, M. (1964). *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*: Manuscrito Azteca de 1552 según traducción latina de Juan Badiano I.M.S.S., México D. F. pp. 121, 213.
26. Duarte A, Braga A, Días J, Lombarda J, and Castro F. (2004). Antifungal constituents of *Clystoma ramentaceum* and *Mansoa hirsute*. *Phytother Res.* 18: 463-467.
27. Duarte DS, Dolabela MF, Salas CE, Raslan DS, Oliveras AB, Nenninger A, Wiedemann B, Wagner H, Lombardi J, Lopes MT. (2000). Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). *J Pharm Pharmacol.* 52: 347-352.
28. Eloff JN. (1998). A sensitive and quick microlate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med.* 64: 711-713.
29. Fabricant DS, Farnsworth NR. (2001). The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect.* 109: 69-75.
30. Freixa B, Vila R, Vargas L, Lozano N, Adzet T, Cañiguerral S. (1998). Screening for antifungal activity of Nineteen Latin American plants. *Phytother Res.* 12: 427-430.
31. Foster JM, Larter PA. (2000). Emerging novel antifungal agents. *Drug Discovery Today.* 5: 25-32.

32. Fuentes M, Avilés M. (1997). Informe Registro de las Plantas Medicinales Reportadas en el Estado de Morelos. Centro INAH, Cuernavaca, Morelos, México, 125 pp.
33. Gabrielson J, Hart M, Jarelov A, Kuhn I, McKenzie D, Mollby R, (2002). Evaluation o redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. *J Microbiol Methods*. 50: 63-73.
34. Gan KH. and Lin CN. (1988). Studies on the constituents of Formosan *gentianaceous* plants. XI. Constituents of *Gentian flavo-maculata* an *Tripterosperum taiwanense* and the antihepatotoxic activity of ursolic acid derivates. *Chinese Pharmaceutical Journal*. 40: 77-84.
35. García Sáenz en el prólogo de: Monardes N., 1990. *Herbolaria de Indias*. Instituto Mexicano del Seguro Social. México D.F. 319 pp.
36. Gentry AH. (1973). Family Bignoniaceae. En: Woodson, R.E., Shery R.W., *Flora of Panama*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 60: 781-977.
37. Gentry AH. (1977). Notes on Midle American Bignoniaceae. *Rhodora* 79, 819: 430-444.
38. Gentry AH. (1982). *Flora de Veracruz*, Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos Xalapa, Veracruz, México. Fascículo 24: 1-4.
39. Gentry AH. (1992). A sinopsis of Bignoniaceae, ethnobotany and economic botany. *Ann. Missouri Bot. Gard*. 79: 53-64.

40. Grifo F, Rosenthal J. (1997). Biodiversity and Human Health. *Island Press*. Washington D.C. 379 pp .
41. Hadacek F, Greger H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. *Phytochem Anal.* 11: 137-147.
42. Hamburger MO, Cordell GA. (1987). A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *J Nat Prod* 50: 19-22.
43. Hang MT, Ho CT, Wang ZY, Ferrato T, Lou YR, Stauber K, Ma W, Georgiadis C, Laskin JD, Coney AH. (1994). Inhibition of skin tumorigenesis by *rosemary* and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Res.* 54: 701-708.
44. Heltzel CE, Gunatilaka A, Glass TE, Kingston DG. (1993). Bioactive furanonaftoquinonas from *Crescentia cujete*. *J Nat Prod* 56: 1500-1505.
45. Hernández F, Cordova E, Manzano P, López R, Bazán E, López R. (2003). Frecuencia de micosis en pacientes inmunosuprimidos en un hospital regional de la ciudad de México. *Salud Pública de México.* 45: 455-460.
46. Herrera A, Rodriguez A, Martinez M, Martinez E, Zamilpa A, Alvarez L, Tortoriello J. (2003). Effectiveness and tolerability of a standardized phytodrug derived from *Solanum chrysotrichum* on *Tinea pedis*: A controlled and randomized clinical trial. *Planta Med.* 69: 390-395.
47. Herrera A, Jimenez E, Vega A, Martines M, Hernández M, Zamilpa A, Tortoriello J. (2004). Clinical and mycological evaluation of therapeutic effectiveness of *Solanum chrysotrichum* standardized extract on patients

with *Pityriasis capitis* (Dandruff). A double blind and randomized clinical trial controlled with Ketoconazole. *Planta Med.* 70: 483-488.

48. Houriuchi K, Shiota S, Hatano T, Yoshida T, Kuroda T, Tsuchiya T. (2007). Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol Pharm Bull.* 30: 1147-1149.
49. Huang SS, Yokoe DS, Hinrichsen VL, Spurchsen LS, Datta R, Miroshnik I, Platt R. (2006). Impact of routine intensive care unit surveillance cultures and resultant barrier precautions on hospital-wide methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis.* 1: 766-767.
50. INEGI. (2003). Estadísticas vitales, 1990- 2001. Base de datos.
51. Itokawa H, Matsumoto K, Morita H, Takeya K, (1992). Citotoxic naphthoquinones from *Mansoa alliaceae*. *Phytochem.* 31: 2271-2276.
52. Jiménez A, Meckes M, Alvarez V, Torres J, Parra R. (2005). Secondary metabolites from *Chamaedora tepejilote* (Palmae) are active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Phytother Res.* 19: 320-322.
53. Jiwajinda S, Santisopasri V, Murakami A, Kim OK, Kim HW, Ogigashi H. (2002). Suppressive effects of edible Thai plants on superoxide and nitric oxide generation. *Asian Pac J Cancer Prev.* 3: 215-223.
54. Kanchanapoom T, Kasai R, Yamasaki K. (2001). Lignan and phenylpropanoid glycosides from *Fernandoa adenophylla*. *Phytochem.* 57: 1245-1248.

55. Kapadia GJ, Sharma SC, Tokuda H, Nishino H, Ueda S. (1996). Inhibitory effect of iridoids on Epstein-Barr virus activation by a short-term *in vitro* assay for anti-tumor promoters. *Cancer Lett.* 102: 223-226.
56. Kassi E, Papoutsi Z, Pratsinis H, Aligiannis N, Manoussakis M, Moutsatsou P. (2007). Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, demonstrates anticancer activity on human prostate cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 133, 7: 493-500.
57. Kosuge T, Yolota M, Sugiyama K, Mure T, Yamazawa H, Yamamoto T. (1985). Studies on bioactive substances in crude drugs used for arthritic diseases in tradicional Chinese medicine. III. Isolation and identification of anti-inflammatory and analgesic principles from the whole herb of *Pyrola rotundifolia* L. *Chem Pharm Bull.* 33: 5355-5357.
58. Lara F, Márquez C. (1996). Plantas Medicinales de México. Composición Usos y Actividad Biológica. Instituto de Química. UNAM. México D.F. 137 pp.
59. Lawrence GM. (1951). Taxonomy of vascular plants. Bignoniaceae. Bignonia Family. *The Macmillan Company*, New York, p. 698-700.
60. Lee KH, Lin YM, Wu TS, Zhan DC, Yamagishi T, Hayashi T, Hall IH. Chang J, Wu RY, Yang TS. (1988). The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens* and *Hyptis capitata*. Ursolic acid and related derivatives, *Planta Med.* 54: 308-311.
61. Lin CN, Chung MI, and Gan XH. (1988). Novel antihepatotoxic principles of *Solanum incanum*. *Planta Med.* 54: 222.

62. Liu J. (1995). Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *J Ethnopharmacol.* 49: 57-68.
63. Liu J. (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *J Ethnopharmacol.* 100: 92-94.
64. Lozoya M, Mellado C. (1985). Is the *Tecoma stans* infusion an antidiabetic remedy? *J. Ethnopharmacol.* 14: 1-9.
65. Lozoya X, Aguilar A, Camacho R. (1987). Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana. *Revista Médica del IMSS.* 25: 283-291.
66. Lozoya X, Navarro V, García M, Zurita M. (1992). *Solanum chrysotrichum* (Schld.) a plant used in Mexico for the treatment of skin mycosis. *J Ethnopharmacol.* 36: 127-132.
67. Lozoya X, Zolla C. (1984). La Medicina Invisible. Introducción al Estudio de la Medicina Tradicional de México. Folios 2ª Ed., México D.F. 274 pp.
68. Ma HX, Zhao YC, Yin L, Han DW, Wang MS. (1986). Studies on the preventive and therapeutic effects of ursolic acid on acute hepatic injury in rats. *Acta Pharmaceutica Sinica.* 21: 332-335.
69. Marroquín JS. (1985). Bignoniaceae. En: Rzedowski J., Rzedowski G., Flora Fanerogámica del Valle de México. Volumen II, Dicotyledoneae. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas Instituto Politécnico Nacional e Instituto de Ecología, México D.F. pp. 365-366.

70. Machado TB, Pinto AV, Pinto MC, Leal IC, Silva MG, Amaral AC, Kuster RM, Netto KR. (2003). In vitro activity of Brazilian plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J Antimicrob Agents*. 21: 279-284.
71. Martínez M. (1944). Las plantas Medicinales de México. Editorial Botas, 3ª ed. México D.F. 630 pp.
72. Meckes M, Ibáñez C. (1985). Glucogenólisis hepática producida por la administración intraperitoneal del extracto total de *Tecoma stans*. *Arch. Invest Med. (Méx)* 16: 387-393.
73. Mitaine AC, Sauvain M, Deharo E, Muñoz V, Zeches M. (2002). A New Diterpene from *Tanaecium joroba*. *Planta Med*. 68: 568-569.
74. Monroy C. Castillo P. (2000). Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. 400 pp.
75. Moon MK, Choi B, Oh G, Pae H, Kim J, Oh H, Oh Ch, Kim D, Rho Y, Shin M, Lee H, Chung H. (2003). Catalposide protects Neuro 2A cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity via the expression of heme oxygenase-1. *Toxicol Lett*. 145: 46-54.
76. Muñoz D, Acero N, Llenares F, Pozuelo J, Galán A, Vincent J, Morales L, Alguacil L, Pérez C. (2003). Biological activity of extracts from *Catalpa bignonioides* Walt. (Bignoniaceae). *J. Ethnopharmacol*. 87: 163-167.
77. Nguyen A., Malonne H., Duez P., Vanhaelen-Fastre R, Vanhaelen M., Fontaine J. (2004). Cytotoxic constituents from *Plumbago zeylanica*. *Fitoterapia* 75: 500-504

78. Nakahara K, Onishi K, Ono H, Yoshida M, Trakontivakorn G. (2001). Antimutagenic activity against Trp-P-1 of the edible Thai plant, *Oroxylum indicum* Vent. *Biosci Biotechnol*. 65: 2358-2360.
79. Nakahara K, Trakoontivakorn G, Alzoreky NS, Ono H, Onishi-Kameyama M, Yoshida M. (2002). Antimutagenicity of Some Edible Thai plants, and a bioactive carbazole alkaloid, mahanine, isolated from *Micromelum minutum*. *J Agric Food Chem*. 50: 4796-4802.
80. Nakamura M, Chi YM, Yan WM., Nakasugi Y, Yoshizawa T, Irino N, Hashimoto F, Kinjo J, Nohara T, Sakurada S. (1999). Strong antinociceptive effect of incarvillateine, a novel monoterpene alkaloid from *Incarvillea simensis*. *J Nat Prod*. 62: 1293-1294.
81. Navarrete A, Trejo-Miranda JL, Reyes-Trejo L. (2002). Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. *J Ethnopharmacol* 79: 383-388.
82. Navarro A, de la Heras B, Villar A. (2001). Anti-inflammatory and immunomodulating properties of a sterol fraction from *Sidens foetens* CLEM. *Pharm & Biol Bull*. 24: 470-473.
83. Navarro FJ. (1992). Historia Natural o Jardín Americano [Manuscrito de 1801]. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Mexicano del Seguro Social, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado. México D.F. p. 176, 226.

84. Navarro V, Rojas G, Delgado G, Lozoya X. (1988). Antimicrobial Compound Detected in *Bocconia arborea* extracts by a direct bioautographic method. *Arch Med Res.* 29: 191-194.
85. Navarro V, Villarreal ML, Rojas G, Lozoya X. (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J Ethnopharmacol.* 53:143-147.
86. Navarro V, Delgado G. (1999). Two antimicrobial alkaloids from *Bocconia arborea*. *J Ethnopharmacol* 66: 223-226.
87. Navarro V, González A, Fuentes M, Avilés M, Ríos Y, Zepeda G. Rojas G. (2003). Antifungal properties of some medicinal plants used in México. *J Ethnopharmacol.* 87: 85-88.
88. Neal MD, Eugene HS, Shively MD, Hiram C., Polk MD. (2005). Clinical and economic outcomes of oral linezolid versus intravenous vancomycin in the treatment of MRSA-complicated, lower-extremity skin and soft-tissue infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Am J Surg.* 189: 425-428.
89. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep.* 17: 215-234.
90. Ochoa F, Alonso Carmen. (1996). Plantas Medicinales de México Composición, Usos y Actividades Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. p. 7-8.

91. Oh H, Pae HO, Oh GS, Lee SY, Chai KY, Song CE, Kwon TO., Chung HT. (2002). Inhibition of inducible nitric oxide synthesis by catalposide from *Catalpa ovata*. *Planta Med.* 68: 685-689.
92. Ohigashi H, Takamura H, Koshimizu K, Tekuda H, Ito Y. (1986). Search for possible antitumor promoters by inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation: ursolic acid and oleanolic acid from an anti-inflammatory Chinese medicinal plant, *Glechoma hederaceae* L. *Cancer Lett.* 30: 143-151.
93. Okeke IN, Laxmaninarayan R, Bhutta ZA, Duse AG, Jenkins P, O'Brien TF, Pablos MA, Klugman KP. (2005). Antimicrobial resistance in developing countries. Part 1: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis.* 5: 481-493.
94. Olivera AB, Raslan DS, Miraglia MC. (1990). Estructura química e actividade biológica de naftoquinonas de Bignoniáceas brasileiras. *Quim Nova.* 13: 302-307.
95. Organización Mundial de la Salud. (2002). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra, OMS, 65pp.
96. Otero R, Núñez V, Jiménez SL, Fonnegra R, Osorio RG, García ME, Díaz A. (2000). Snakebites and ethnobotany in the northwest region of Colombia Part II: Neutralization of the lethal and enzymatic effects of *Bothrops atrox* venom. *J Ethnopharmacol.* 71: 505-511.
97. Pae HO, Oh GS, Choi BM, Shin S, Chai KY, Oh H, Kim JM, Kim HJ, Jang SI, Cheng HT. (2003). Inhibitory effects of the inner bark of *Catalana ovata* G. Don. (Bignoniaceae) on the productions of tumor necrosis factor- α and nitric

oxide by the lipopolisaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Ethnopharmacol.* 88: 287-291.

98. Patwardhan B. (2005). Ethnopharmacology and drug discovery. *J Ethnopharmacol.* 100: 50-52.
99. Pio Correa M, Penna L, (1978). Dicionario das plantas teis do Brasil e das exóticas cultivadas. Imprensa Nacional, Ministerio de Agricultura: Río de Janeiro, IBDF, Río de Janeiro Brasil 6, 1926-1954.
100. Rahalison L, Hamburger M, Monod M, Frenk E, Hostettmann K. (1994). Antifungal tests in phytochemical investigations: comparision of bioautographic methods using phytopathogenic andhuman pathogenic fungi. *Planta Med* 60: 41-44.
101. Raskin I, Ribnicky, DM, Komarnytsky S, Llic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A., Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B. (2002). Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.* 20: 522-531.
102. Rëmi S. (1977). Diccionario de la Lengua Nahuatl o Mexicana. Siglo XXI, México, D.F. p. 715, 774.
103. Ríos JL, Recio MC, Villar A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature, *J Ethnopharmacol.* 23:127-149.
104. Ríos JL, Recio MC. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 100: 80-84.

105. Rojas G, Lévaro J, Tortoriello J, Navarro V. (2001). Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J Ethnopharmacol.* 74: 97-101.
106. Román R, Flores JL, Partida G, Lara A, Alarcón F. (1991). Experimental study of the hypoglycemic effect of some antidiabetic plants. *Arch Invest Med. (Méx).* 22: 87-93.
107. Rzedowski Jerzy y Graciela Calderón de Rzedowski, (1993). Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes, BIGNONIACEAE, Fascículo 22, Instituto de Ecología, A.C. p-2.
108. Saludes J, Garson M, Franzblau S, Aguinaldo A. 2002. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). *Phytother Res.* 16: 683-685.
109. Singh B, Singh S. (2003). Antimicrobial activity of terpenoids from *Trichodesma amplexicaule* Roth. *Phytother Res* 17: 814-816
110. Shukia B, Viser S, Patnaik GK, Tripathi SC, Primal RC, Day S, and Dobhal PC. (1992). Hepatoprotective activity in the rat of ursolic acid isolated from *Eucaliptus hybrid*. *Phytother Res.* 6: 74-79.
111. Solórzano F, Miranda MG. (1998). Resistencia de bacterias respiratorias y entéricas a antibióticos. *Salud Pública de México.* 40: 510-516.
112. SSA. (2001). Boletín de Información Estadística No. 20. Vol. II, Daños a la salud, Tasa de morbilidad de los 15 casos nuevos de enfermedad más importantes, 2000. México D.F. (medios magnéticos).

113. SSA. SUIVE (2006). Dirección General de Epidemiología. Febrero de 2006. Tasa de morbilidad de los principales casos nuevos de enfermedades, 200 a 2004. [www. dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)
114. Standley P. (1976). Trees and Shrubs of México. Smithsonian Institution United States National Museum. Contributions United States National Herbarium. Vol. 23. Washington-Government printing office. 1929-1926. p 1316.
115. Thomson WAR. (1981). Guía Práctica Ilustrada de Las Plantas Medicinales. Editorial Blume. Barcelona España. 219 pp.
116. Vasconcelos MA, Royo VA, Ferreira DS, Crotti AE, Andrade e Silva ML, Carvalho JC, Bastos JK, Cunha WR. (2006). In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). *Z Naturforsch.* 61: 477-482.
117. Vasso S, Chin CM, Tambyah PA. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Endocarditis after transurethral prostatic resection. *Urology.* 65: 21-23.
118. Velásquez ME. (2005). *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emerges and dissemination. *Salud Pública Mex.* 47: 381-387.
119. Verpoorte R, Choi YH, Kim HK. (2005). Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. *J Ethnopharmacol.* 100: 53-56.
120. Viday SM, Manjunatha BK, Mankani KL, Ahmed M, Singh SD. (2007). Evaluation of hepatoprotective activity of *Clerodendrum serratum* L. *Indian J Exp Biol.* 45: 538- 542.

121. Wang F, Hua H, Pei Yuehu, Chen D, Jing Y. 2006. Triterpenoids from the Resin of *Styrax tonkinensis* and their antiproliferative and differentiation effects in human leukemia HL-60 Cells. *J Nat Prod.* 69: 807-810.
122. Woldemichael GM, Franzblau SG, Zhang F, Wang Y, Timmermann BN. (2003). Inhibitory effect of sterols from *Ruprechtia triflora* and diterpenes from *Calceolaria pinnifolia* on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Planta Med.* 69: 628-631.
123. World Health Organization. (2001). General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. WHO, Geneva, Switzerland, p. 1.
124. World Health Organization. (2004). The World Health Report. Changing History. Statistical annex. Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO Regions, estimates for 2002. WHO, Geneva, Switzerland. pp. 120-121.
125. Yasunaka K, Abe F, Nagayama A, Okabe H, Lozada L, López E, Estrada E, Aguilar A, Reyes R. (2005). Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *J Ethnopharmacol.* 97: 293-299.
126. Yim EK, Lee MJ, Lee KH, Um SJ, Park JS, (2006). Antiproliferative and antiviral mechanisms of ursolic acid and dexamethasone in cervical carcinoma cell lines. *Int J Gynecol Cancer.* 16: 2023-2031.

127. Zamilpa A, Tortoriello J, Navarro V, Delgado G, Alvarez L. (2002). Five new steroidal saponins from *Solanum chrysotrichum* leaves and their antimicrobial Activity. J Nat Prod. 65: 1815-181.

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Antibacterial, Antifungal, and Cytotoxic Activities of *Distictis buccinatoria*

María Gabriela Rojas^{1,2}, Víctor Navarro¹, Daniel Alonso¹, María Yolanda Ríos³, Jaime Tortoriello¹, and Rubén Román-Ramos⁴

¹Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Xochitepec, Morelos, México;

²Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F., México;

³Centro de Investigaciones Químicas Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos,

México; ⁴División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México, D.F., México

Abstract

The current study was undertaken to evaluate the *in vitro* antimicrobial and cytotoxic activity of six crude extracts obtained from the leaves and flowers of *Distictis buccinatoria* (DC.) A.H. Gentry (Bignoniaceae). Antimicrobial activity was tested against the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Streptococcus faecalis*; the Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Salmonella typhi*; and the fungi *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, and *Aspergillus niger*. The cytotoxic activity of each extract was determined using two human tumor cell lines in culture, nasopharyngeal carcinoma (KB) and colon carcinoma (HCT-15). The results showed that extracts from *D. buccinatoria* possess antimicrobial activity against the Gram-positive bacteria and against both dermatophyte fungal species. The strongest antibacterial activity observed was that of the dichloromethane extract prepared from flowers, and the best antifungal activity was demonstrated by the dichloromethane extract from the leaves. The hexane and dichloromethane extracts from the flowers exhibited cytotoxicity against KB cells. These results support the traditional folk medicinal uses of this plant.

Keywords: Antibacterial activity, antifungal activity, cytotoxic activity, *Distictis buccinatoria*, folk medicine, medicinal plants.

Introduction

Infectious and parasitic diseases, such as acute lower respiratory infections, tuberculosis, diarrhea, HIV/AIDS, and malaria, are major causes of morbidity and mortality worldwide (WHO, 2004). In addition, in recent years, there has been a growing incidence of opportunistic fungal infections due to the increasing immunocompromised population, including organ transplant recipients, neonates, cancer, and HIV/AIDS patients. Moreover, antibiotic resistance is a growing problem. These facts have triggered an extended search for new drugs to treat infectious diseases (Fostel & Larrey, 2000). Cancer treatment is poorly defined in terms of traditional folk medicine; nevertheless, some medicinal plants used for the treatment of infectious diseases, fever, and inflammation have shown cytotoxic *in vitro* activity against human tumor cell lines and are an important source of potential anticancer agents (Cragg & Newman, 2005; Kim et al., 2005).

According to World Health Organization estimates, herbal remedies serve the health needs of about 80% of the world's population, especially in developing countries (WHO, 2001). Data on prescription drugs dispensed from community pharmacies in the United States from 1959 to 1980 indicate that about 25% contained plant extracts or active compounds derived from plants (Newman et al., 2000). Thus, because natural products are rich sources of biologically active compounds, there has been an increasing interest in the development of

Accepted: December 5, 2006.

Address correspondence to: María Gabriela Rojas Bribiesca, Laboratorio de Microbiología, Centro de Investigación Biomédica del Sur, Instituto Mexicano del Seguro Social, Argentina 1, Xochitepec, Morelos, C.P. 62790, México; E-mail: gabrb02@yahoo.com.mx

DOI: 10.1080/13880200701214847 © 2007 Informa Healthcare

new antimicrobial agents from plants in recent years (Raskin et al., 2002).

In México, medicinal plants have been used in rural áreas for thousands of years to treat gastrointestinal, respiratory, hepatic, genital, urinary, and skin illness, as well as conditions consistent with cancer symptomatology (Martínez, 1944; Díaz, 1977; Lozoya et al., 1987; Fuentes & Aviles, 1997). However, scientific investigation to determine the therapeutic potential of these plants is scarce. The research presented below is part of a series of studies performed in our laboratory as part of a permanent program to investigate the antimicrobial and cytotoxic potential of local medicinal plants (Popoca et al., 1998; Navarro et al., 1998, 2003; Rojas et al., 2001).

Disticlis buccinatoña (DC.) A.H. Gentry (Bignoniaceae), locally known as "tonacaxochitl," is a native Mexican plant that has been used since pre-Hispanic times for medical purposes (De la Cruz, 1964; Navarro, 1992). Nowadays, empirical midwives and herbalists in the state of Morelos in México use the decoction of its flowers to treat cough, angina, inflammation, pharyngitis, and coughs with blood. To date, no biological activity or chemical information regarding this plant has been reported. In this study, we report on the *in vitro* antibacterial, antifungal, and cytotoxic activities of the hexane, dichloromethane, and methanol extracts from the flowers and leaves of *D. buccinatoña*.

Materials and Methods

Collection of plant material

Aerial parts of *D. buccinatoña* were collected during spring 2004 from plants growing in Tétela del Volcan, Morelos State, México. Voucher specimens were prepared and authenticated by Margarita Aviles and Macrina Fuentes at the Herbarium of the Instituto Nacional de Antropología e Historia Morelos (INHAM) Medicinal Botanical Garden in the city of Cuernavaca, in the state of Morelos, México; the classified reference voucher was deposited at this institution under the code number INHAM-2007.

Preparation of extracts

Plant materials (leaves and flowers) were shade-dried at room temperature, powdered, and individually extracted sequentially with *n*-hexane, dichloromethane, and methanol (100 g per 100 mL) at room temperature. Each solvent was replaced three-times with fresh solvent, remaining in contact with the plant material for 48 h on each occasion. After filtration, the extracts were concentrated under low pressure at 40°C. Finally, the percentage yield (w/w) for each type of extract was determined. The resulting crude extracts were stored at -20°C until they were tested.

Microorganisms and media

The microorganisms used for the antimicrobial evaluation were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA). The following Gram-positive bacteria were used: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 08668), and *Streptococcus faecalis* (ATCC 29212). The following Gram-negative strains were used: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), and *Salmonella typhi* (ATCC 06539). The following fungi were tested: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 28185), *Trichophyton rubrum* (ATCC 28188), and *Aspergillus niger* (ATCC 10335). All bacteria were maintained on tryptic soy agar (TSA; Merck, Darmstadt, Germany) and assayed on Mueller-Hinton agar (MH; Merck). Defibrinated sheep blood (5%) was added to the medium for *Streptococcus pyogenes*. The filamentous fungi were maintained on potato dextrose agar (PDA; Merck). Sabouraud 4% glucose-agar (SGA; Merck) was used to maintain the yeast and as the assay medium.

Antimicrobial activity assays

The antibacterial and antifungal activities of the crude extracts were determined using the agar dilution method (Jorgensen et al., 1999). The hexane, dichloromethane, and methanol extracts were individually dissolved in 2% dimethylsulfoxide (DMSO; Merck). Further two-fold dilutions of each extract were performed using sterile distilled water and were added to melted agar culture medium in 100 mmx 15 mm Petri dishes (Falcon Franklin Lakes, New Jersey, USA) at the following final concentrations: 0.25, 0.50, 1, 2, 4, and 8 mg/mL. Agar culture medium and DMSO 2% were used as negative controls. The procedures followed for the antibacterial and antifungal assays are described below.

Antibacterial activity assay

Bacterial suspensions for each bacterium were prepared by transferring five or six colonies, chosen after overnight growth on tryptic soy agar, to 5 mL of Mueller-Hinton broth (MHB; Merck). Cultures were incubated at 36°C until they were visibly turbid, and the suspensions were then diluted until the turbidity matched the 0.5 McFarland standard turbidity equivalents [10^8 colony-forming units (CFU)/mL]. Microbial suspensions were further diluted 1:10 to obtain a concentration of 10^7 CFU/mL. The diluted inoculum of each bacterium was applied with a loop calibrated to deliver 0.002 mL, resulting in a spot covering a circle of 5 to 8 mm diameter and containing 10^4 CFU/mL. The plates were incubated for 24 h at 36°C. Gentamicin (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) was used as reference standard. Observations were performed

in duplicate, and results are expressed as the lowest concentration of plant extract that produced a complete suppression of colony growth, the minimal inhibitory concentration (MIC) (Ríos et al., 1988).

Antifungal activity assay

C. albicans inoculum was prepared by diluting the yeast suspension (adjusted to McFarland 0.5 scale) in 0.85% NaCl solution to a final concentration of 10^5 cells/mL. The filamentous fungi inoculums were prepared by diluting the scraped cells mass in 0.85% NaCl to a final concentration of 10^6 spores/mL. The diluted inoculums were delivered on the top of the solidified agar with a loop calibrated to deliver 0.005 mL. The plates were incubated at 29°C. Fungal growth was checked both in control plates prepared without any test sample and in experimental plates; the time at which fungal growth was checked was either 24, 48, or 72 h, depending on the incubation time required for a visible growth; 24 h for *C. albicans*, 48 h for *A. niger*, and 72 h for the dermatophytes. Experiments were duplicated, and results were expressed as MIC. Positive controls were prepared with miconazole (Sigma) and nystatin (Merck).

Cytotoxic assay

In accordance with international methods and following the regulations of the National Cancer Institute (NCI) described in the literature (Suffness & Pezzuto, 1991; Villarreal et al., 1992), HCT-15 (colon) and KB (nasopharynx) human tumor cell lines (donated by Dr. J. Pezzuto of the University of Illinois at Chicago) were maintained in RPMI1640 (*in vitro*) culture medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (*in vitro*) and were cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in air (100%

humidity). During the log phase of their growth cycle, the cells were treated with different concentrations of the extracts (1, 10, and 100 µg/mL), each concentration being repeated three-times, and were incubated for 72 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. The cell concentration was determined by protein analysis (Oyama & Eagle, 1956). The results, the mean of three distinct experiments, were expressed as the concentration that inhibited 50% of growth with respect to control growth after the incubation period (ED₅₀). The values were estimated from a semi-log plot of the extract concentration (ng/mL) against the percent of viable cells. Ellipticine (Sigma) was used as a positive control.

Results and Discussion

In Table 1, the plant parts employed, the percentage yield, and the obtained MIC values from the antibacterial and antifungal assays of the crude extracts are summarized. The solid dilution method used in this investigation has been employed frequently and recommended as a good method for determining the relative potency of complex extracts and for establishing their antimicrobial spectrum (Ríos & Recio, 2005). Although there is no agreement on the level of acceptance for plant extracts when compared with standard antibiotics and some authors consider only activity comparable with standard antibiotics, in our experience and according to previous antimicrobial studies carried out in our laboratory, crude plant extracts with MIC values between 2.5 and 15 mg/mL (Lozoya et al., 1992; Navarro et al., 1996) have led to the isolation of strong antimicrobial compounds (Navarro & Delgado 1999; Alvarez et al., 2001; Zamilpa et al., 2002) and to the production of standardized phytodrugs with high rates of clinical and

Table 1. Antibacterial and antifungal activity of crude extracts from *D. buccinatoria* (MIC, mg/mL).

Plant part tested	Extract ^a	Extract yield (%) [*]	Microorganisms ^b									
			<i>S.a.</i>	<i>S.p.</i>	<i>S.f.</i>	<i>E.c.</i>	<i>K.n.</i>	<i>S.t.</i>	<i>C.a.</i>	<i>T.m.</i>	<i>T.r.</i>	<i>A.n.</i>
Flowers	H	0.99	4	2	>8	>8	>8	>8	>8	8	8	>8
	DC	1.35	0.5	0.5	8	>8	>8	>8	>8	8	4	>8
	M	8.33	8	4	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8	>8
Leaves	H	0.95	4	4	>8	>8	>8	>8	>8	8	8	>8
	DC	2.08	4	2	>8	>8	>8	>8	>8	4	4	>8
	M	9.42	8	8	>8	>8	>8	>8	>8	8	8	>8
Gentamicin ^c			5	5	5	10	10	10	NT	NT	NT	NT
Nystatin ^c			NT	NT	NT	NT	NT	NT	010	NT	NT	NT
Miconazole ^c			NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	8	8	16

^aExtract: H, hexane; DC, dichloromethane; M, methanol.

^{*}Dry residue of the extract in terms of dry starting material.

^bMicroorganisms: *S.a.*, *Staphylococcus aureus*; *S.p.*, *Streptococcus pyogenes*; *S.f.*, *Streptococcus faecalis*; *E.c.*, *Escherichia coli*; *S.t.*, *Salmonella typhi*; *C.a.*, *Candida albicans*; *T.m.*, *Trichophyton mentagrophytes*; *T.r.*, *Trichophyton rubrum*; *A.n.*, *Aspergillus niger*.

^cReference standard antibiotics (ng/mL). NT, not tested.

mycological effectiveness with no side effects (Herrera et al., 2003, 2004). Under this criterion, and considering that in this study only crude extracts were employed, extracts with MIC values of 8 mg/mL or below against any of the microorganisms tested were considered active.

From all extracts assayed, five of them (83%) showed antimicrobial activity against at least two of the microorganisms tested. All extracts were active against the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*, the most active being the dichloromethane extract from flowers with MIC values of 0.5 mg/mL for both bacteria, whereas only the dichloromethane extract from flowers was active against the Gram-positive bacterium *Streptococcus faecalis* with a MIC value of 8 mg/mL. None of the crude extracts were active against the Gram-negative bacteria. The MIC values obtained in the antifungal evaluation showed that the hexane and dichloromethane extracts from flowers and leaves and the methanolic extract from leaves were active against the dermatophytes (*T. mentagrophytes* and *T. rubritri*) with MIC values of 4–8 mg/mL; the dichloromethane extract from leaves was the most active with MIC values of 4 mg/mL. No antifungal activity was observed against *Candida albicans* and *Aspergillus niger*.

Table 2 shows the cytotoxic data of the tested organic extracts against the two cultured human tumor cell lines. According to the NCI guidelines (Geran et al., 1972), extracts with ED₅₀ values of 20 µg/mL or below are considered active. As shown, the hexane and dichloromethane extracts from the flowers displayed significant cytotoxicity against KB cells, with ED₅₀ values of 15.8 and 8.3 µg/mL, respectively, whereas none of the organic extracts were active against HCT-15 cells. The cytotoxic activity exhibited by the hexane and dichloromethane extracts against the KB cells coupled with the non-cytotoxicity against the HCT-15 cells is a significant observation that suggests that *D. buccinatoria* is a good candidate for future antitumoral testing.

Table 2. Cytotoxicity of crude extracts from *D. buccinatoria* (ED₅₀, µg/mL).

Plant part tested	Extract	Cell lines ^a	
		KB	HCT-15
Flowers	Hexane	15.8	>20
	Dichloromethane	8.3	>20
	Methanol	>20	>20
Leaves	Hexane	>20	>20
	Dichloromethane	>20	>20
	Methanol	>20	>20
EUipticine		1.7	1.5

^aCell line: KB, human nasopharyngeal carcinoma; HCT-15, human colon carcinoma. ^bPositive control.

No previous reports on the pharmacological activity or chemical nature of *Disiectis* could be found in the literature. Experimental studies carried out on some Bignoniaceae species used in traditional folk medicine for the treatment of infectious diseases have displayed antimicrobial and antitumoral activities: *Catalpa ovata* G. Don has been shown to possess antimicrobial, antitumoral, and anti-inflammatory properties (Moon et al., 2003); *Clystoma ramentaceum* Bur. & K. Schum and *Mansoa hirsute* DC. inhibited the growth of the fungi *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum* (Rocha et al., 2004); a mixture of ellagitannins isolated from *Punica granatum* L. and two naphthoquinones isolated from *Tabebuia avellanedas* Lorenz ex Grisebach demonstrated antibacterial activity against multiresistant *Staphylococcus aureus* strains (Machado et al., 2003); the alcoholic extracts of the pods and flowers of *Tecoma sambucifolia* H.B.K. displayed cytotoxicity against a human hepatoma cell line (Alguacil et al., 2000); the biological screening of some fractions derived from the leaves and liana of *Macfadyena unguis-cati* (L.) revealed antitumoral and antitrypanosomal activities (Duarte et al., 2000); and an aqueous ethanol extract of *Jacaranda cancan* Pittier showed *in vivo* antitumoral and *in vitro* cytotoxic activity against the P-388 lymphocytic leukemia system (Ogura et al., 1977).

The results obtained in the current investigation indicate that *D. buccinatoria* possesses antibacterial, antifungal, and cytotoxic properties, showing a strong correlation between the reported uses of this plant in Mexican folk medicine and the obtained experimental data. It also supports the importance of ethnopharmacology as a guide in the selection of plants for the discovery of bioactive compounds.

Phytochemical bioguided studies are currently under way in order to isolate and characterize the compounds responsible for the antimicrobial and cytotoxic activities of *D. buccinatoria*.

Acknowledgments

The authors would like to thank empirical midwife Sofia Barranco and traditional healer Fladiano Saavedra for ethnobotanical information, as well as M.C. Margarita Aviles and Macrina Fuentes for assistance in the collection and identification of plant specimens. We also wish to acknowledge the help of Mrs. Katharine M. Román and Mr. Yuriy Román from the University of Wisconsin-Madison for their collaboration in the revision of the English writing of this paper.

References

- Alguacil LF, Mera AG, Gómez J, Lunares F, Morales L, Muñoz-Mingarro MD, Pozuelo JM, Orellana V. (2000): *Tecoma sambucifolia*: Anti-inflammatory and

- antinociceptive activities, and "in vitro" toxicity of extracts of the "huarumbo" of Peruvian Incas. *J Ethnopharmacol* 70: 227-233.
- Alvarez L, Pérez MC, González JL, Navarro V, Villarreal ML, Olson JO (2001): SC-1, an antimycotic spirostan saponin from *Solanum chrysotrichum*. *Planta Med* 67: 372-374.
- Cragg GM, Newman DJ (2005): Plants as source of anti-cancer agents. *J Ethnopharmacol* 100: 72-79.
- De la Cruz M (1964): *Libellus de Medicinalibm Indorum Herbis: Manuscrito Azteca de 1552 según Traducción latina de Juan Badiana*. México DF, IMSS, pp. 121-213.
- Díaz JL (1977): *Usos de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas II*. México, D.F., IMEPLAM A.C., p. 329.
- Duarte DS, Dolabela MF, Salas CE, Raslan DS, Oliveiras AB, Nenninger A, Wiedemann B, Wagner H, Lombarda J, Lopes MT (2000): Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguis-cai* (Bignoniaceae). *J Pharm Pharmacol* 52: 347-352.
- Fostel JM, Lartey PA (2000): Emerging novel antifungal agents. *Drug Discov Today* 5: 25-32.
- Fuentes M, Aviles M (1997): *Informe Registro de las Plantas Medicinales Reportadas en el Estado de Morelos*. Cuernavaca, Morelos, México, INAH, p. 125.
- Geran RI, Greenberg NH, Me Donald MN, Schumacher AM, Abbott BJ (1972): Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cáncer Chemother Rep* 3: 1-17.
- Herrera-Arellano A, Rodríguez A, Martínez MA, Martínez E, Zamilpa A, Alvarez L, Tortoriello J (2003): Effectiveness and tolerability of a standardized phytodrug derived from *Solanum chrysotrichum* on *Tinea pedis*: A controlled and randomized clinical trial. *Planta Med* 69: 390-395.
- Herrera-Arellano A, Jiménez E, Vega AM, Martínez MA, Hernández M, Zamilpa A, Tortoriello J (2004): Clinical and mycological evaluation of therapeutic effectiveness of *Solanum chrysotrichum* standardized extract on patients with *Pityriasis capitis* (dandruff). A double blind and randomized clinical trial controlled with ketoconazole. *Planta Med* 70: 483-488.
- Jorgensen JH, Turnidge JD, Washington JA (1999): Antibacterial susceptibility tests: Dilution and disk diffusion methods. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. Washington, DC, ASM Press, pp. 1526-1530.
- Kim YS, Kim JS, Choi SU, Kim JS, Lee HS, Roh SH, Jeong YC, Kim YK, Ryu SY (2005): Isolation of a new saponin and cytotoxic effect of saponins from the root of *Platycodon grandiflorum* on human tumor cell lines. *Planta Med* 71: 563-566.
- Lozoya X, Aguilar A, Camacho R (1987): Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana. *Arch Med Res* 25: 283-291.
- Lozoya X, Navarro V, García M, Zurita M (1992): *Solanum chrysotrichum* (Schldl.) a plant used in México for the treatment of skin mycosis. *VE7/mof/z<mKzcol.?*: 127-132.
- Machado TB, Pinto AV, Pinto MC, Leal TC, Silva MG, Amaral AC, Kuster RM, Nettodos- Santos KR (2003): In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 21: 279-284.
- Martínez M (1944): *Las plantas Medicinales de México*. México D.F., Bolas, p. 630.
- Moon MK, Choi BM, Oh GS, Pae HO, Kim JD, Oh H, Oh CS, Kim DH, Rho YD, Shin MK, Lee HS, Cheng H (2003): Calyposide protects Neuro 2 A cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity via the expression of heme oxygenase-1. *Toxicol Lett* 145: 46-54.
- Navarro FJ (1992): *Historia. Natural o Jardín Americano (Manuscrito de 1801)*. México D.F., Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Mexicano del Seguro Social, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, pp. 176, 226.
- Navarro V, Villarreal ML, Rojas G, Lozoya X (1996): Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J Ethnopharmacol* 53: 143-147.
- Navarro V, Rojas G, Delgado G, Lozoya X (1998): Antimicrobial compounds detected in *Boconia arborea* extracts by a direct bioautographic method. *Arch Med Res* 29: 191-194.
- Navarro V, Delgado G (1999): Two antimicrobial alkaloids from *Boconia arborea*. *J Ethnopharmacol* 66: 223-226.
- Navarro VM, González A, Fuentes M, Aviles M, Ríos Y, Rojas MG (2003): Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 87: 85-88.
- Newman DJ, Cragg GM, Snader KM (2000): The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep* 17: 215-234.
- Ogura M, Cordell GA, Farnsworth R (1977): Potential anticancer agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucaria* Piliier (Bignoniaceae). *Lloydia* 40: 157-168.
- Oyama I, Eagle H (1956): Measurements of cell growth in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 88: 305-307.
- Popoca J, Aguilar A, Alonso D, Villarreal ML (1998): Cytotoxic activity of selected plants used as antitumorals in Mexican traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 59: 173-177.
- Raskin I, Ribnicky DM, Komarnyisky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B (2002): Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol* 20: 522-531.
- Ríos JL, Recio MC, Villar A (1988): Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *J Ethnopharmacol* 23: 127-149.
- Ríos JL, Recio MC (2005): Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 100: 80-84.

- Rocha AD, Oliveira AB, Souza JD, Lombardi JA, Braga FC (2004): Antifungal constituents of *Clystoma rametaceum* and *Mansoa hirsute*. *Phytother Res* 18: 463-467.
- Rojas G, Levaro J, Tortoriello J, Navarro V (2001): Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J Ethnopharmacol* 74: 97-101.
- Suffness M, Pezzuto JM (1991): Assays related to cancer drug discovery. In: *Methods in Plant Biochemistry, Assays for Bioactivity*, Vol. 6. London, Academic Press, pp. 71-134.
- Villarreal ML, Alonso D, Melesio G (1992): Cytotoxic activity of some Mexican plants used in traditional medicine. *Fitoterapia LXIII*: 518-522.
- WHO (World Health Organization) (2001): General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. Geneva, Switzerland. WHO, p. 1.
- WHO (World Health Organization) (2004): The World Health Report. Changing History. Statistical Annex. Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO Regions, estimates for 2002. Geneva, Switzerland, WHO, pp. 120-121.
- Zamilpa A, Tortoriello J, Navarro V, Delgado G, Alvarez L (2002): Five new steroidal saponins from *Solanum chrysotrichum* leaves and their antimicrobial activity. *J Nat Prod* 65: 1815-1819.