

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**

**SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE  
ALGUNAS PLANTAS MEDICINALES, USADAS EN LA MEDICINA  
TRADICIONAL MEXICANA, CONTRA ENTEROBACTERIAS  
CAUSANTES DE DIARREA Y DISENTERÍA: ESTUDIO  
FARMACOLÓGICO Y QUÍMICO DEL PERICARPIO DE *PUNICA  
GRANATUM* L. (GRANADO)”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN EN MEDICINA**

**P R E S E N T A :**

**M en C. ALMA DELIA ALANÍS RÍOS**

**MÉXICO, D.F. diciembre 2006**

## ÍNDICE

TÍTULO.....	i
CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS.....	ii
ACTA DE REVISIÓN.....	iii
ÍNDICE.....	iv
GLOSARIO.....	vii
LISTA DE ESPECTROS.....	xiii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE GRÁFICAS.....	xv
LISTA DE TABLAS.....	xvii
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 Retos de las medicinas tradicionales del mundo y de los fitofármacos).....	1
II. ANTECEDENTES.....	8
II.1 Generalidades de la diarrea infecciosa.....	8
II.1.1 Enterobacterias.....	9
II.1.2 Morfología.....	9
II.1.3 Patogenicidad.....	12
II.1.4 <i>Escherichia</i> .....	14
II.1.5 <i>Shigella</i> .....	17
II.1.6 <i>Salmonella</i> .....	19
II.1.7 Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la diarrea bacteriana.....	22
II.2 Estudio fitoquímico de plantas medicinales.....	26
II.3 Generalidades de <i>Punica granatum</i> Linné.....	29
II.3.1 Constituyentes químicos.....	31
II.3.2 Propiedades farmacológicas.....	33
III. JUSTIFICACIÓN.....	36
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	36
V. OBJETIVO GENERAL.....	37
V.1 Objetivos particulares.....	37
VI. HIPÓTESIS.....	38
VII. MATERIALES Y MÉTODO.....	39
VII.1 Evaluación biológica.....	39
VII.1.1 Enterobacterias.....	39
VII.1.2 Determinación de la actividad antibacteriana.....	39

VII.2 Selección y preparación del material vegetal.....	40
VII.3 Extracción.....	40
VII.3.1 Preparación de los extractos vegetales metanólicos y acuosos en pequeña escala...	40
VII.3.2 Preparación del extracto metanólico del pericarpio de <i>Punica granatum</i> L en gran escala.....	41
VII.4 Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico.....	43
VII.4.1 Material cromatográfico.....	43
VII.4.2 Fraccionamiento biodirigido.....	43
VII.5 Compuestos fenólicos utilizados para el estudio relación estructura química actividad antibacteriana.....	48
VIII. RESULTADOS .....	51
VIII.1 Resultados de la actividad antibacteriana de los 56 extractos derivados de las 26 especies vegetales.....	51
VIII.2 Resultados de la actividad antibacteriana del extracto metanólico, del fraccionamiento y de los compuestos puros del pericarpio de <i>P. granatum</i> .....	54
VIII.3 Resultados de la actividad antibacteriana del estudio relación estructura química actividad de compuestos fenólicos.....	57
IX. ANÁLISIS.....	59
IX.1 Análisis de los resultados de la actividad antibacteriana de los 56 extractos evaluados	59
IX.2 Análisis de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto metanólico, fracciones y compuestos puros obtenidos a partir de <i>P. granatum</i> .....	65
IX.3 Análisis de los resultados del estudio de la relación estructura química actividad antibacteriana de compuestos fenólicos.....	78
X. CONCLUSIONES.....	85
XI. RECOMENDACIONES.....	88
XII. SUGERENCIAS PARA TRABAJO FUTURO.....	88
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	89
XIV. ANEXO I.....	101
A.I Caracterización estructural de los compuestos aislados del estudio fitoquímico bodirigido del extracto metanólico del pericarpio de <i>P.granatum</i> .....	101
A.I.1 Equipo utilizado para la caracterización estructural de los compuestos.....	101
A.I.2 Identificación de los compuestos obtenidos del fraccionamiento biodirigido.....	101
A.I.2.1 Caracterización estructural del $\beta$ -sitosterol (9).....	102
A.I.2.2 Caracterización estructural del 1,4-dimetil malato (10).....	104
A.I.2.3 Caracterización estructural del ácido oleanólico (11) y ácido ursólico (12).....	108
A.I.2.4 Caracterización estructural del ácido gálico (13).....	111
A.I.2.5 Caracterización estructural del ácido elágico (14).....	113

A.I.2.6 Caracterización estructural de los metil ésteres de ácidos grasos (15-20).....	115
A.I.2.7 Caracterización estructural del metil galato (21).....	119
A.I.2.8 Caracterización estructural del trimetil malato (22).....	121
XV. ANEXO II.....	122
A.II.1 Artículo.....	123

## GLOSARIO

OMS	Organización Mundial de la Salud
%	por ciento
OPS	Organización Panamericana de la Salud
VIH	virus de inmunodeficiencia adquirida
ESCOF	European Scientific Cooperative for Phytotherapy
Comisión E	Comisión europea del Ministerio de Sanidad Alemán
CYTED	Programa iberoamericano de ciencia y tecnología para el desarrollo
QFB	Químico farmacéutico biólogo
etc.	etcétera
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECET	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
ECEI	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ECVT	<i>Escherichia coli</i> productora de verotoxina
ECEP	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ECEH	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ECEagg	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<i>E. invadens</i>	<i>Entamoeba invadens</i>
sp	sin especie
Ala	alanina
Glu	glucosa
Lys	lisina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico (por sus siglas en inglés)
RNA	ácido ribonucleico
ATP asa	trifosfatasa de adenosina
DNA	ácido desoxi-ribonucleico
LPS	lipopolisacáridos
TL	termolábil
TS	termoestable
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono

C	carbono
H	hidrógeno
O	oxígeno
N	nitrógeno
C-H	carbono-hidrógeno
H <sub>2</sub>	hidrógeno molecular
O <sub>2</sub>	oxígeno molecular
OH	hidroxilo
DPPH	difenilpicrilhidracilo
TPA	acetato de tetradecanoilforbol
L1	lote 1
L2	lote 2
S-S	Salmonella-Shigella
<i>S. dysenteriae</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>S. sonnei</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<i>S. boydii</i>	<i>Shigella boydii</i>
<i>S. rimosus</i>	<i>Streptomyces rimosus</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. sp</i>	<i>Salmonella sp</i>
<i>S. paratyphi</i>	<i>Salmonella paratyphi</i>
<i>S. schotlmueLLeri</i>	<i>Salmonella schotlmueLLeri</i>
<i>S. hischteldii</i>	<i>Salmonella hischteldii</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>S. typhi</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>B. anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
µm	micromicras
nm	nanómetro
MDa	milidaltón

ml	mililitro
°C	grado centígrado
kDa	kilodalton
cm	centímetro
mm	milímetro
mg	miligramo
mg/ml	miligramo por mililitro
CL <sub>50</sub>	concentración letal cincuenta
ppm	partes por millón
µg/ml	microgramo por mililitro
mg/kg	miligramo por kilogramo
g/ml	gramo por mililitro
mg/l	miligramo por litro
µl	microlitro
g	gramos
Kg	kilogramo
l	litro
m	metro
mm	milímetro
Mµ	milimicras
m/z	relación masa/carga
MHz	mega hertz
UMA	unidad masa atómica
CMI	concentración mínima inhibitoria
CMB	concentración mínima bactericida
EUA	Estados Unidos de América
ATCC	American typed culture collections
M-H	Muller-Hilton
HE	medio Hektoen
TSI	agar de azúcar-hierro triple
XLD	medio xilosa-lisina desoxicolato

PMN	polimorfonucleares
UFC	unidad formadora de colonias
DMSO	dimetil sulfóxido
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
L	Linné
Dr.	doctor
M. en C.	maestra en ciencias
CCF	cromatografía en capa fina
UV	ultra violeta
<i>Ch. ambrosoides</i>	<i>Chenopodium ambrosoides</i>
<i>C. pulcherria</i>	<i>Caesalpinia pulcherria</i>
<i>Ch. pentadactylon</i>	<i>Chirantodendron pentadactylon</i>
<i>C. nucifera</i>	<i>Coco nucifera</i>
<i>G. mexicanum</i>	<i>Geranium mexicanum</i>
<i>H. excelsa</i>	<i>Hippocratea excelsa</i>
<i>O. basilicum</i>	<i>Occimum basilicum</i>
<i>P. granatum</i>	<i>Punica granatum</i>
<i>T. vulgaris</i>	<i>Timus vulgaris</i>
FP	fracción primaria
FS	fracción secundaria
FT	fracción terciaria
PA	partes aéreas
R	raíz
r	rojo
v	verde
ac.	ácido
c/u	cada una
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
MeOH	metanol
M	metanólico
A	acuoso

CHCl <sub>3</sub>	cloroformo
AcOEt	acetato de etilo
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
EMIE	Espectroscopía de masa de impacto electrónico
IR	Infra rojo
MS	Mass Spectroscopy
NRM	Nuclear Resonance Magnetic
DMM	1,4-dimetil malato
AM	araquidato de metilo
BM	behenato de metilo
EM	estearato de metilo
HM	hexacosanoato de metilo
LM	linoleato de metilo
PM	palmitato de metilo
MEMAG	mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos
MG	metil galato
TM	trimetil malato
AB	ácido benzoico
AHB	ácido 4-hidroxi-benzoico
ADB	ácido 3,4-dihidroxi-benzoico
AG	ácido gálico
AFA	ácido fenil acético
APHFA	ácido <i>para</i> -hidroxi-fenil-acético
ADHC	ácido 2,3-dihidro-4'-hidroxi-cinámico
AHFA	ácido 4'-hidroxi-fenil acético
AHTC	ácido 4-hidroxi- <i>trans</i> -cinámico
ADC	ácido 3',4'-dihidroxi-cinámico
DAC	ácido 2,3-dihidro-3',4'-dihidroxi-cinámico
ATC	ácido <i>trans</i> -cinámico
DHC	ácido 3',5'-dimetoxi-4'-hidroxi-cinámico

TMS	tetrametil silano
$\text{CDCl}_3$	cloroformo deuterado
$\text{DMSO-d}_6$	dimetil sulfóxido deuterado
$\text{CeSO}_4$	sulfato cérico

## LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. IR del $\beta$ sitosterol.....	103
Espectro 2. RMN <sup>1</sup> H del $\beta$ sitosterol.....	103
Espectro 3. IR del 1,4-dimetil malato.....	105
Espectro 4. RMN <sup>1</sup> H del 1,4-dimetil malato.....	106
Espectro 5. RMN <sup>13</sup> C del 1,4-dimetil malato.....	107
Espectro 6. EMIE del 1,4-dimetil malato.....	107
Espectro 7. IR de la mezcla del ácido oleanólico y ursólico.....	109
Espectro 8. RMN <sup>1</sup> H de la mezcla del ácido oleanólico y ursólico .....	109
Espectro 9. EMIE de la mezcla del ácido oleanólico y ursólico .....	110
Espectro 10. RMN <sup>1</sup> H del ácido gálico.....	112
Espectro 11. RMN <sup>13</sup> C del ácido gálico.....	112
Espectro 12. RMN <sup>1</sup> H del ácido elágico.....	114
Espectro 13. RMN <sup>13</sup> C del ácido elágico.....	114
Espectro 14. IR de la mezcla de los metil ésteres de ácidos grasos.....	116
Espectro 15. RMN <sup>1</sup> H de la mezcla de los metil ésteres de ácidos grasos .....	117
Espectro 16. EMIE de la mezcla de los metil ésteres de ácidos grasos .....	117
Espectro 17. RMN <sup>1</sup> H del metil galato .....	120
Espectro 18. RMN <sup>13</sup> C del metil galato .....	120
Espectro 19. RMN <sup>1</sup> H del trimetil malato.....	121
Espectro 20. RMN <sup>13</sup> C del trimetil malato .....	122
Espectro 21. EMIE del trimetil malato .....	122

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Obtención del extracto metanólico del pericarpio de <i>Punica granatum</i> .....	41
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de <i>Escherichia</i> .....	15
Figura 2. Mecanismo de patogenicidad de <i>Shigella</i> .....	18
Figura 3. Mecanismo de patogenicidad de <i>Salmonella</i> .....	21
Figura 4. Fruto de <i>Punica granatum</i> L.....	30
Figura 5. Estructuras de los compuestos aislados del fraccionamiento biodirigido primario del extracto metanólico del pericarpio de <i>P. granatum</i> .....	44
Figura 6. Estructuras de los compuestos aislados del fraccionamiento biodirigido secundario y terciario del extracto metanólico del pericarpio de <i>P. granatum</i> .....	48
Figura 7. Estructuras de los compuestos fenólicos usados en el estudio relación estructura química actividad antibacteriana.....	49

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos y acuosos (8 mg/ml) de tres de las especies que inhibieron a todas las cepas bacterianas.....	60
Gráfica 2. Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos activos (8 mg/ml) contra las cepas de <i>E. coli</i> .....	60
Gráfica 3. Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos activos (8 mg/ml) contra las cepas de <i>Shigella</i> .....	61
Gráfica 4. Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos activos (8 mg/ml) contra las cepas de <i>Salmonella</i> .....	62
Gráfica 5. Porcentajes de inhibición de los extractos acuosos activos (8 mg/ml) contra las cepas de <i>E. coli</i> .....	62
Gráfica 6. Porcentajes de inhibición de los extractos acuosos activos (8 mg/ml) contra las cepas de <i>Shigella</i> .....	63
Gráfica 7. Porcentajes de inhibición de los extractos acuosos activos (8 mg/ml) contra las cepas de <i>Salmonella</i> .....	64
Gráfica 8. CMI de los extractos metanólicos y acuosos de las especies de <i>G. mexicanum</i> (PA y R) y <i>P. granatum</i> contra <i>S. flexneri</i> .....	65
Gráfica 9. Porcentajes de inhibición de los dos lotes del extracto metanólico de <i>P. granatum</i> (8 mg/ml).....	66
Gráfica 10. Porcentajes de inhibición del $\beta$ sitosterol y el extracto metanólico de <i>P. granatum</i> (8 mg/ml).....	67
Gráfica 11. Porcentajes de inhibición de la fracción primaria FP3 y el extracto metanólico de <i>P. granatum</i> (8 mg/ml) .....	68
Gráfica 12. Porcentajes de inhibición del extracto metanólico de <i>P. granatum</i> , la fracción primaria FP3 (8 mg/ml), el ácido oleanólico y el ácido ursólico (400 $\mu$ g/ml).....	68
Gráfica 13. Porcentajes de inhibición de la fracción primaria FP3 (8 mg/ml) y del 1,4-dimetil malato (DMM) a 1 mg/ml.....	69
Gráfica 14. Porcentajes de inhibición de la fracción primaria FP9 (8 mg/ml) y del ácido gálico (400 $\mu$ g/ml).....	70
Gráfica 15. Porcentajes de inhibición de la fracción primaria FP11 (8 mg/ml) y del ácido Elágico (1 $\mu$ g/ml).....	71
Gráfica 16. Porcentajes de inhibición del extracto de <i>P. granatum</i> y de la fracción primaria FP7 (8 mg/ml) .....	71
Gráfica 17. Porcentajes de inhibición de la fracción primaria FP7(8 mg/ml) y de las fracciones secundarias FS1, FS8 y FS12 (400 $\mu$ g/ml).....	72
Gráfica 18. Porcentajes de inhibición del extracto, la fracción primaria FP7 (8 mg/ml), la fracción	

secundaria FS1 (400 µg/ml) y de la mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (MEMAG) (200 µg/ml).....	73
Gráfica 19. Porcentajes de inhibición de los ésteres metílicos: AM, BM, EM, HM, LM y PM (200 µg/ml).....	74
Gráfica 20. Porcentajes de inhibición de las fracciones FP7 (8 mg/ml), FS8 (400 µg/ml), FTI y el metil galato (GM) (200 µg/ml).....	75
Gráfica 21. Porcentajes de inhibición de las fracciones FP7 (8 mg/ml), FS12 (400 µg/ml), FTi y el trimetil malato (TM) (200 µg/ml).....	76
Gráfica 22. Porcentajes de inhibición de los compuestos trimetil malato (TM) y el metil galato (GM) (200 µg/ml).....	77
Gráfica 23. Porcentajes de inhibición del trimetil malato (TM), el metil galato (GM), el sulfametoxazol y la trimetoprima (200 µg/ml).....	77
Gráfica 24. Porcentajes de inhibición a 1 mg/ml del ácido benzoico y ácido fenil acético.....	79
Gráfica 25. Porcentajes de inhibición a 1 mg/ml del ácido fenil acético, trimetoprima y sulfametoxazol.....	79
Gráfica 26. Porcentajes de inhibición del ácido benzoico (29), (AB); el ácido 4-hidroxi-benzoico (30), (AHB); el ácido 3,4-dihidroxi-benzoico (31), (ADB) y el ácido gálico (13), (AG).....	80
Gráfica 27. Porcentajes de inhibición del ácido fenil acético (33), (AFA) y del ácido <i>para</i> -hidroxi-fenil acético (34), (APHFA).....	81
Gráfica 28. Porcentajes de inhibición del ácido 2,3-dihidro-4'-hidroxi-cinámico (32), (ADHC); el ácido 4'-hidroxi-fenil acético (34), (AHFA) y el ácido 4-hidroxi-benzoico (30), (AHB).....	82
Gráfica 29. Porcentajes de inhibición del ácido 4-hidroxi- <i>trans</i> -cinámico (24), (AHTC); el ácido 3',4'-dihidroxi-cinámico (28), (ADC); el ácido 2,3-dihidro-4'-hidroxi-cinámico (32), (ADHC) y el ácido 2,3-dihidro-3',4'-dihidroxi-cinámico (25), (DAC).....	83
Gráfica 30. Porcentajes de inhibición del ácido <i>trans</i> -cinámico (23), (ATC); el ácido 4-hidroxi- <i>trans</i> -cinámico (24), (AHTC), el ácido 3',4'-dihidroxi-cinámico (28), (ADC) y el ácido 3',5'-dimetóxi-4'-hidroxi-cinámico (27), (DHC).....	84

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Correlación entre el cuadro clínico y el agente etiológico.....	9
Tabla 2. Agentes etiológicos, mecanismos patogénicos, modo de acción y manifestación clínica de la diarrea y de la disentería.....	13
Tabla 3. Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la diarrea bacteriana.....	22
Tabla 4. Nombres comunes, distribución, parte usada y usos de <i>P. granatum</i> .....	31
Tabla 5. Especie botánica, familia, nombre común, voucher, parte recolectada y usos de las 26 especies recolectadas.....	42
Tabla 6. Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.....	43
Tabla 7. Resumen del fraccionamiento primario del extracto metanólico de <i>P. granatum</i> .....	44
Tabla 8. Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción primaria FP7.....	46
Tabla 9. Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción secundaria FS1.....	47
Tabla 10. Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción secundaria FS8.....	47
Tabla 11. Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción secundaria FS12.....	48
Tabla 12. Concentraciones mínimas inhibitorias de cuatro extractos con actividad inhibitoria contra <i>Shigella flexneri</i> .....	51
Tabla 13. Resultados de la actividad antibacteriana de los 28 extractos metanólicos.....	52
Tabla 14. Resultados de la actividad antibacteriana de los 28 extractos acuosos.....	53
Tabla 15. Resultados de la actividad antibacteriana y rendimiento del extracto metanólico y de las fracciones primarias obtenidas a partir del extracto metanólico de <i>P. granatum</i> ...	54
Tabla 16. Resultados de la actividad antibacteriana y rendimiento de las fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria FP7.....	55
Tabla 17. Resultados de la actividad antibacteriana y rendimiento de las fracciones terciarias obtenidas a partir de la fracción secundaria FS1.....	56
Tabla 18. Resultados de la actividad antibacteriana y rendimiento de las fracciones terciarias obtenidas a partir de la fracción secundaria FS8 y FS12.....	56
Tabla 19. Resultados de la actividad antibacteriana de los compuestos obtenidos a partir del fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico de <i>Punica granatum</i> .....	57
Tabla 20. Resultados de la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos.....	58
Tabla 21. Resultados de la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos más activos.....	58

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ALGUNAS PLANTAS MEDICINALES, USADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA, CONTRA ENTEROBACTERIAS CAUSANTES DE DIARREA Y DISENTERÍA: ESTUDIO FARMACOLÓGICO Y QUÍMICO DEL PERICARPIO DE *PUNICA GRANATUM* L. (GRANADO)”

**RESUMEN**

La presente disertación se divide en tres partes: la primera parte comprende la actividad antibacteriana obtenida del cernimiento de 56 extractos metanólicos y acuosos derivados de 26 plantas medicinales (24 géneros en 20 familias), usadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la diarrea y la disentería. El ensayo utilizado para la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los diferentes extractos, fracciones y compuestos puros fue una adaptación del bioensayo descrito por Gavan y Barry (Lennette *et al.*, 1980). La segunda parte incluye el estudio fitoquímico biodirigido del pericarpio del fruto de *Punica granatum* y por último la tercera parte se refiere al estudio de la relación estructura química actividad antibacteriana de 14 ácidos fenólicos.

Una vez preparados los extractos metanólicos y acuosos se sometieron a un cernimiento de actividad antibacteriana contra ocho cepas bacterianas enteropatógenas. Las cepas empleadas fueron *Escherichia coli* enterohemorrágica 0157:H7, *Shigella sonnei* (dos cepas), *Shigella flexneri* (dos cepas), *Salmonella* sp (dos cepas) y como cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922.

Las plantas estudiadas difirieron en sus actividades contra las cepas evaluadas y la mejor actividad antibacteriana se observó en la concentración de 8 mg/ml. Ambos extractos de *Caesalpinia pulcherrima*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Cocos nucifera*, *Geranium mexicanum* (R y PA), *Hippocratea excelsa* y *Punica granatum* mostraron actividad contra todas las bacterias

De la determinación del potencial antibacteriano de las 26 plantas, *P. granatum* se seleccionó por discriminación del efecto farmacológico como una de las especies más activas, de la cual mediante el estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico de la cáscara se lograron aislar 14 compuestos: ácido gálico, ácido elágico,  $\beta$  sitosterol, ácido ursólico, ácido oleanólico, 1,4-dimetil malato, trimetil malato, metil galato, araquidato de metilo, behenato de metilo, estearato de metilo, hexacosanoato de metilo, linoleato de metilo y palmitato de metilo.

Los compuestos encontrados en las fracciones del ensayo biodirigido del extracto activo, especialmente el metil galato y el trimetil malato mostraron una alta actividad antibacteriana.

En el estudio relación estructura química actividad antibacteriana se encontró que un incremento de las funciones oxigenadas en el anillo aromático en los ácidos fenólicos analizados disminuye la actividad antibacteriana. En cuanto a lo largo de la cadena, se encontró que el aumento de la cadena incrementa la actividad antibacteriana. En el análisis de la ausencia o presencia del doble enlace se observó que cuando el compuesto tiene esta insaturación la actividad antibacteriana es mayor que si no la tiene.

De este estudio se concluye que los extractos con poca actividad antibacteriana son susceptibles de análisis mediante una metodología fitoquímica biodirigida ya que conforme se van aislando los constituyentes de las fracciones de los extractos de cada planta, se va encontrando un aumento actividad mayor lo que permite obtener compuestos con eficacia antibacteriana. En el caso de *C. pulcherria*, *Ch. pentadactylon*, *C. nucifera*, *T. vulgaris*, *G. mexicanum* (R y PA) e *H. excelsa* que son plantas con actividad antibacteriana significativa, se consideran candidatas idóneas para su estudio fitoquímico biodirigido.

La actividad demostrada por el trimetil malato y el metil galato, aislados del extracto metanólico del pericarpio de *P. granatum*, permite proponerlos como candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos. El conocimiento de la capacidad antibacteriana de 14 ácidos fenólicos y sus variaciones estructurales como característica para mostrar actividad contra estas enterobacterias, nos proporciona una guía de la estructura química idónea para inhibir a estas enterobacterias.

## ABSTRACT

In order to discover natural products with a potential use as antibacterial agents against diarrhoea. In the present study, we screened 26 plants used in the Mexican traditional medicine to treat diarrhea and dysentery because their ability to inhibit the growth of enteropathogen strains. Of these results we selected an active species to perform its pharmacological and chemical study. These were dried pulverized by a mechanical grinder. In each case, powdered air-dried plant material was extracted with methanol or water and the solutions were filtered, evaporated or lyophilized.

The bacterial strains used in this study were isolated from faeces of children: *Escherichia coli* enterohemorrágica 0157:H7, *Shigella sonnei* (two strains), *Shigella flexneri* (two strains), *Salmonella* sp (two strains, and *Escherichia coli* ATCC 25922 used as control. Antibacterial activity was measured using a dilution in agar technique.

*C. pulcherrima*, *Ch. pentadactylon*, *C. nucifera*, *G. mexicanum*, (roots and aerial parts), *H. excelsa*, and *P. granatum* are plants with significant antibacterial activity against enteropathogens and offer an alternative method to treat drug resistant enteric infections.

Bioassay-directed fractionations of the active crude extract from the pericarp of *P. granatum*, led to the isolation of 14 compounds: gallic acid, ellagic acid,  $\beta$  sitosterol, ursolic acid, oleanolic acid, 1,4-dimethyl malate, trimethyl malate, methyl gallate, methyl arachidate, methyl behenate, methyl stearate, methyl hexacosanoate, methyl linoleate, and methyl palmitate. Among these, compounds, those showing the major antibacterial activity were methyl gallate and trimethyl malate. The isolated compounds were identified by a combination of chemical and spectral methods including high-resolution MS and NMR measurements. The showed activity of methyl gallate and trimethyl malate allow to suggest they have potential as new antimicrobial drugs.

We decided to contribute to the knowledge of the biological properties of one group of secondary metabolites, we selected 14 phenols derivatives, because one of the active compounds is for this type. Among these, benzoic acid and phenyl acetic acid were the most active phenols with 100% inhibition (2 mg/mL) against all enterobacteria strains.

Our results demonstrate the antibacterial property of these plants, mainly from the pericarp of *P. granatum*, and reinforce the folkloric use of them in Mexican Traditional medicine to treat gastrointestinal disorders such as diarrhea and dysentery.

## I INTRODUCCIÓN

### I. 1 Retos de las medicinas tradicionales del mundo y de los fitofármacos.

Cuando el hombre tuvo que distinguir entre las plantas útiles de las que no lo eran, empezó el desarrollo gradual de la medicina tradicional, la cual se fue transmitiendo verbalmente y de forma escrita a través de papiros, tablas de barro cocido, pergaminos, tratados de plantas, farmacopeas y banco de datos informáticos, entre otros (Evans, 1991; Almaguer *et al.*, 2002; Cordero, 2002; Yesilada, 2005).

La medicina tradicional ha sido practicada por milenios, resultando en una herencia rica que continua influyendo en la aceptación del uso clínico y la eficacia de los medicamentos herbolarios tradicionales. En el mundo se estima que se utilizan unas 10,000 especies vegetales con fines medicinales, por lo que es imperativo reconocer y afirmar el papel esencial de la medicina tradicional con su capacidad para responder de forma competitiva en el tratamiento de enfermedades, adquiriendo más relevancia dentro del contexto de la prevención de atención sanitaria y la reforma del sector salud (Handley y Petry, 1999; Bagozzi, 2001; Cañigual, 2002; WHO, 2002a; 2004; Kim, 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a la medicina tradicional como: Prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicamentos basados en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir enfermedades (WHO, 2002a).

Alrededor del mundo existen muchas medicinas tradicionales que se pueden dividir en dos grupos: el primer grupo está constituido por las altamente evolucionadas y disciplinadas en la práctica metodológica médica, farmacéutica y terapéutica; éstas incluyen a las medicinas tradicionales china e hindú. Por otra parte, el segundo grupo está constituido por aquellas cuyas prácticas emplean preparados que en general carecen de una metodología sistematizada para demostrar su eficacia; estas incluyen las medicinas tradicionales tailandesa y mexicana, entre otras. Ambos grupos de medicinas se han transmitido a través de generaciones en forma familiar. Sin embargo, las del segundo grupo carecen del sustento científico (farmacológico, terapéutico y químico) lo que cuestiona su validez como una medicina alternativa útil en el campo médico clínico (Abramov, 1996; Watanabe y Shibuya, 1999; Handley y Petry, 1999; WHO, 2004).

En el caso particular de la práctica de la medicina tradicional mexicana, esta fue

interrumpida a partir de la conquista de los españoles, perdiéndose una gran cantidad de información necesaria para establecer o dar continuidad a su resurgimiento. En las últimas décadas su existencia ha sido un esfuerzo constante por parte de los historiadores e investigadores en el campo del estudio de las plantas medicinales, quienes han comprendido que el conocimiento de las virtudes de las plantas medicinales es uno de los vínculos más directos que existen entre la medicina empírica del pasado y la farmacología actual (SS, 1993a; Calzada, 2000; Heinrich, 2000; Mata, 2002; Huerta, 2002).

La medicina tradicional ha sido aceptada en muchas partes del mundo, tanto en países en desarrollo como industrializados, esto es por su diversidad, flexibilidad, accesibilidad, disponibilidad y amplia aceptación (WHO, 2002a).

A lo largo de la historia, México ha sido de interés a nivel mundial por sus recursos naturales. La extraordinaria riqueza florística ubica a México en el cuarto lugar mundial. El amplio territorio que incluye áreas subtropicales, zonas templadas y frías es bueno para el desarrollo de varias plantas, el número de plantas medicinales en México asciende a la cantidad de 4,500 del cual sólo el 11 % se ha estudiado químicamente, el 2.6 % de forma biodirigida y sólo el 1.9 % a nivel farmacológico y toxicológico (Mata, 2002; Huerta, 2002; Cordero, 2002; Huerta, 1997; Ocegueda, et al., 2005).

Considerando que hay un 98 % de flora sin explorar, el reino vegetal posee muchas especies de plantas que contienen sustancias de valor medicinal aún por descubrir (Balandrin *et al.*, 1985; Cordero, 2002; Cordell y Colvard, 2005). El balance en la exploración del reino vegetal, si bien es pobre, ha ofrecido resultados tan espectaculares que permanece en la actualidad como estrategia válida para la obtención de principios activos (Perry *et al.*, 1999; Handley y Petry, 1999; Heinrich, 2000). Como resultado de los modernos procedimientos de aislamiento y de experimentación farmacológica, nuevos productos derivados de vegetales encuentran su camino hacia la medicina, en estado de sustancias purificadas más que en forma de preparados tradicionales, como lo demuestra la obtención de principios biodinámicos obtenidos de plantas y de animales en la terapéutica. La contribución de las distintas medicinas tradicionales a la farmacopea universal es muy amplia; así tenemos que de *Ricinus communis*, se obtiene el aceite de ricino usado como purgante; de *Colchicum autumnale*, se obtiene la colchicina útil para la gota; de *Papaver somniferum*, se extrae la morfina usada como analgésico; de *Atropa belladonna*, derivan la atropina y la hiosciamina utilizados como sedantes; de *Datura*

*stramonium*, se obtiene la escopolamina y el estramonio usados como relajantes musculares; de *Claviceps purpurea*, se extrae la ergotamina utilizada para reducir la hemorragia posparto y el ácido lisérgico utilizado como alucinógeno y psicomimético; de *Digitalis purpurea*, deriva la digoxigenina útil para el corazón; de *Ephedra sinica*, se obtiene la efedrina útil para el asma y del *Gingseng*, los ginsenósidos usados como afrodisíacos; de *Catharanthus roseus*, se extraen la vincristina y la vinblastina útiles como antitumorales; de *Rawolfia serpentina*, deriva la reserpina útil para la hipertensión; del *Curare*, se obtiene la tubocurarina un relajante muscular; de *Cephaelis ipecacuana*, se extrae la emetina que fue útil contra la disentería amibiana; de *Cinchona calisaya*, se obtiene la quinina usada como antipalúdico y como estomáquico, de *Erythroxylum coca*, se obtiene la cocaína un anestésico y estimulante mental; de *Dioscorea composita*, se extrae la diosgenina usado como base de los anticonceptivos orales, por tan solo mencionar algunos (Evans, 1991; SS, 1993a; Handley y Petry, 1999).

En cuanto a los compuestos de origen microbiano con propiedades antibióticas tenemos que de *Cephalosporium acremonium* se obtienen las cefalosporinas; de *Streptomyces clavuligerus*, se extrae el ácido clavulánico; de *Streptomyces kanamyceticus*, se obtiene la kanamicina; de *Micromonus pora*, se obtiene la gentamicina y netilmicina; de *Streptomyces aureofaciens* y *S. rimosus*, deriva la clortetraciclina y oxitetraciclina; de *Streptomyces venezuelae* se extrae el cloranfenicol; de *Streptomyces erythreus*, se obtiene la eritromicina y de *Penicillium notatum*, deriva la penicilina. Tales descubrimientos han inspirado la continuidad de las investigaciones en todo el mundo (Goodman *et al.*, 1995; SS, 1993a; Cox y Balick, 1994; Perry *et al.*, 1999; Watanabe y Shibuya, 1999; WHO, 2002a).

Considerando que alrededor del 80% de la población mundial confía en su medicina tradicional y que los gobiernos de los países en desarrollo son incapaces de mantener una cobertura completa para sus pueblos con fármacos de patente, organismos internacionales como la OMS y la Organización Panamericana de Salud (OPS) han promovido el desarrollo racional de los tratamientos tradicionales. En el caso particular de México, el fortalecimiento de la medicina tradicional es actualmente una política del gobierno federal, como respuesta a los pronunciamientos y demandas de los pueblos indígenas, se tiene como objetivo fortalecer un sistema complementario intercultural de atención a la salud dentro de un esquema de coordinación y respeto entre la medicina alópata y la medicina tradicional, para así poder consolidar sistemas locales complementarios de atención a la salud. La propuesta se centra en

impulsar a los estados para incluir las distintas medicinas tradicionales en las estrategias nacionales sanitarias, respaldando el desarrollo de las investigaciones clínicas en seguridad, eficacia y defendiendo su uso racional (Abramov, 1996; Watanabe y Shibuya, 1999; Heinrich, 2000; Almaguer *et al.*, 2002; WHO, 2002b; 2003; 2004; Kim, 2005).

El continuo desarrollo de las investigaciones: fitoquímicas, del cultivo de células y órganos para la producción de metabolitos secundarios, los avances en la comprensión del metabolismo secundario, el incremento de sofisticadas técnicas para la separación y caracterización de los componentes de las plantas, han posibilitado el emprender estudios farmacológicos más precisos de principios puros y fracciones vegetales de muchas plantas medicinales (SS, 1993). Varios son los programas de investigación en el mundo, encaminados a la búsqueda de principios activos y derivados de origen vegetal que se desarrollan en la actualidad así tenemos los programas anti VIH, antitumorales, antidiabéticos, antiamibianos, etc. (Evans, 1991; Perry *et al.*, 1999).

Varios son los retos que las diversas medicinas tradicionales deben superar para que la utilidad que se le atribuye sea aceptada, entre ellos debe ser probada científicamente, reconocida por los gobiernos, superar las dificultades relacionadas con la protección de los conocimientos indígenas de la medicina tradicional y asegurar su uso correcto (SS, 1993; Heinrich, 2000; WHO, 2002b; 2002a; Almaguer *et al.*, 2002).

La investigación de los extractos y fracciones derivadas de las plantas medicinales es importante para determinar su eficacia y su seguridad; las pruebas seleccionadas deben incluir pruebas de toxicidad incluyendo pruebas teratogénicas y mutagénicas, estos factores se obtienen de la investigación, sin embargo, quedan algunos retos por superar especialmente la falta de regulaciones y su aceptación internacional (Cañigual, 2002; Cordell and Colvard, 2005).

La mejora de la calidad desde el origen de la producción, la intensificación de la investigación clínica y la formación de personal especializado en medicina y enfermería. La cantidad y calidad de datos sobre seguridad y eficacia de la medicina tradicional están lejos de ser suficientes para satisfacer los criterios necesarios para respaldar su uso en el ámbito mundial. Las razones de la falta de datos de estudio se deben no solo a las políticas sanitarias, sino también a la falta de una metodología aceptada para evaluar la medicina tradicional (Cañigual, 2002; WHO, 2002a; 2002b; 2004).

La integración de evidencia científica sobre la medicina tradicional ayudará a convencer a

médicos y a personal de salud que se opone al uso de la medicina tradicional como una alternativa para procurar salud. Los investigadores tienen que adiestrarse en el manejo del lenguaje, costumbres y prejuicios de los pueblos y médicos con quienes han de tratar, así como las prácticas religiosas y rituales que se asocian frecuentemente con el tratamiento curativo, por lo que se requiere de un enfoque multidisciplinario de investigación. El control de calidad es esencial para la consistencia de un tratamiento, un acercamiento científico es recomendado para asegurar la calidad de las medicinas con base de plantas medicinales (SS, 1993a; Abramov, 1996; Watanabe y Shibuya, 1999; Perry *et al.*, 1999; WHO, 2002a; Almaguer *et al.*, 2002).

La fitoterapia estudia el uso de los medicamentos herbolarios con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico (Cañigüeral, 2002; WHO, 2002a). La OMS define a los medicamentos herbolarios o fitofármacos como productos acabados y etiquetados derivados de plantas con propiedades terapéuticas, cuyos ingredientes activos están formados por partes aéreas o subterráneas de plantas u otros materiales vegetales o combinaciones de ellos, en bruto o en forma de preparaciones de plantas. No se consideran medicamentos herbolarios los que contienen material vegetal combinado con sustancias activas químicamente definidas, incluidos los constituyentes de plantas aislados y/o químicamente sintetizados (WHO, 2002a).

El retorno hacia el uso de los productos de origen natural en la terapéutica se ha venido propiciando, por los efectos adversos en fármacos de síntesis; el mejor conocimiento químico farmacológico y clínico de plantas medicinales y sus productos derivados; el desarrollo de métodos analíticos que faciliten el control de calidad; el desarrollo de nuevas formas de preparación y de administración de los medicamentos fitoterapéuticos (Cañigüeral, 2002; WHO, 2002a).

En cuanto a la seguridad podemos decir que muchos fitofármacos que provienen de la medicina tradicional han sido utilizados durante siglos, proporcionando cierta garantía de su inocuidad, principalmente en lo que respecta a su toxicidad aguda. Sin embargo, a pesar de que las plantas medicinales y sus derivados suelen presentar un índice terapéutico amplio, no están exentas de posibles efectos adversos, interacciones y contraindicaciones. De ahí que la evaluación de su seguridad deba realizarse con los criterios aplicados a los medicamentos alopáticos y deba sustentarse con la documentación científica relevante sobre su toxicidad, efectos secundarios, interacciones, contraindicaciones, mutagenicidad, etc. La eficacia de un

fitofármaco se basa en el conocimiento de los principios activos de la droga, en los resultados obtenidos en ensayos farmacológicos experimentales y en la experiencia clínica (Cañigüeral, 2002; WHO, 2003).

Conocer las estructuras químicas de los principios activos responsables de una determinada actividad en los fitomedicamentos, establece una relación directa causa-efecto que puede ser útil para explicar los mecanismos de acción y para el desarrollo de estudios farmacocinéticos. Para demostrar su efecto en sí y su mecanismo de acción se necesita de la realización de ensayos farmacológicos experimentales *in vivo* e *in vitro*, que pueden realizarse tanto a partir de los principios activos purificados como de los extractos de la planta. Sin embargo, frecuentemente, los efectos de los fitofármacos son observados inicialmente de forma empírica en pacientes humanos que han seguido algún tratamiento a base de plantas o de sus derivados ya que es difícil diseñar un modelo experimental en animales en el que se pueda demostrar este efecto terapéutico (WHO, 2002a; 2002b).

Es importante compilar esta información y es necesario efectuar una evaluación crítica. En este sentido existe información científica de plantas y sus derivados sobre la química, farmacología, toxicología y clínica, pero se encuentra muy dispersa y su relevancia en la evaluación de la calidad, seguridad y eficacia de un preparado puede ser variable. En este contexto, destacan las monografías realizadas por algunos organismos internacionales como la OMS, la European Scientific Cooperative for Phytotherapy (ESCOP), la Comisión Europea del Ministerio de Sanidad Alemán (Comisión E). Por lo que se refiere a las plantas medicinales iberoamericanas, el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Las monografías esencialmente contienen temas relacionados con seguridad, eficacia y calidad. Estas monografías son un instrumento de gran utilidad en la evaluación de fitofármacos (Cañigüeral, 2002; WHO, 2002a).

La evaluación de la información requiere, tener un criterio formado, que no se puede pedir al consumidor pero que si es exigible al profesional de salud. La correcta información del QFB, farmacólogo y del médico es crucial para que estos cumplan su labor de forma eficaz. Como principales profesionales competentes en este campo, no solo tienen la responsabilidad de garantizar la calidad de los fitofármacos, sino que también la calidad de vida del paciente. Por tanto, resulta imprescindible dar herramientas de información fiables a los profesionales de la salud, así como la oportunidad de adquirir una formación sólida en fitoterapia (Abramov, 1996;

Cañigüeral, 2002; WHO, 2002a; 2002b).

El personal de salud especialmente, QFB, farmacólogos, médicos y enfermeras deben estar más preparados en el conocimiento de los riesgos y de los beneficios de los fitofármacos. Debido a esta situación se debe disponer de fuentes fiables de información y una formación específica en este campo. En las facultades de farmacia los planes de estudio deben incluir a la farmacognosia y la fitoterapia como asignatura obligatoria. La primera tiene como objetivo formar al futuro estudiante en todos los aspectos relacionados con los productos naturales, desde su definición y obtención hasta su utilización, pasando por sus características químicas, farmacológicas y el control de calidad. La fitoterapia tiene como objetivo proporcionar los conocimientos básicos sobre la utilización terapéutica de productos de origen vegetal, el diseño racional de los preparados fitofarmacéuticos (acciones farmacológicas, efectos secundarios, interacciones, etc.), posibilitar la adquisición de criterios sólidos para la utilización correcta de los preparados fitofarmacéuticos en las diferentes patologías atendiendo a sus indicaciones, dosificación, formas de administración, contraindicaciones, etc. (Cañigüeral, 2002; WHO, 2002b; 2003).

La finalidad de tener la información necesaria para la evaluación de los fitofármacos o medicamentos herbolarios es facilitar la labor de los organismos de reglamentación, las entidades científicas y la industria en cuanto a la elaboración, la evaluación y el registro de estos. Además de los productos de origen vegetal, también se deben evaluar de forma semejante otro tipo de medicamentos tradicionales (WHO, 2002a).

La utilización de fitofármacos en varias partes del mundo, sigue una línea ascendente que va más allá de una simple moda y se debe al creciente interés en los tratamientos de problemas de salud con productos de origen natural, también a la creciente evidencia sobre su seguridad y eficacia. Se estima que en el mercado mundial las formulaciones a base de plantas medicinales son muy usadas, en Europa se presentan las cifras más altas; seguido de Asia, Norteamérica y Japón. El liderazgo de Europa en el mercado de los fitofármacos se explica por el hecho de que históricamente existe entre la población europea una larga tradición científica en el campo de la fitoquímica y la farmacognosia, además de la gran aceptación de las formulaciones a base de plantas y/o sus derivados (Cañigüeral, 2002; WHO, 2002a; 2002b).

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Generalidades de la diarrea infecciosa.

El término diarrea deriva del griego *diarrhoia* el cual significa “fluir a través de”, Hipócrates la definió como “el aumento en la frecuencia y contenido de agua en las descargas fecales” (Coello-Ramírez *et al.*, 2001). En la actualidad, la diarrea se define como la disminución de la consistencia usual de las heces, con aumento de su frecuencia habitual (Mota, 2002).

La diarrea puede deberse tanto a agentes infecciosos (bacterias, virus y parásitos) como no infecciosos (alimentación, sustancias tóxicas, problemas psicosomáticos, inmunológicos y hormonales) (SS, 1993; Arredondo y Hernández, 1998; Calzada, 2000).

Como el presente trabajo se enfoca a la evaluación *in vitro* de productos derivados de plantas medicinales contra bacterias enteropatógenas causantes de diarrea y disentería a continuación se mencionan aspectos de algunos de estos microorganismos.

En la diarrea causada por bacterias, estas invaden la mucosa intestinal matando a las células epiteliales provocando una respuesta inflamatoria local y ulceraciones. Además las toxinas producidas por las bacterias alteran el balance electrolítico en el epitelio del intestino. Es de mencionarse que cuando la diarrea dura de tres a cuatro días es indicativa de una infección bacteriana y puede presentarse en cualquier etapa de la vida siendo los niños y los ancianos los más propensos (Suárez-Hoil *et al.*, 1993; Morales, *et al.*, 1993; SS, 1993; Aguilar, 1998; Arredondo y Hernández, 1998; Armstrong y Cohen, 1999; Calzada, 2000; Schulz *et al.*, 2001).

En México las dos bacterias que muestran además de una elevada incidencia, una mayor relación entre infección y enfermedad son *Shigella dysenteriae* y *E. coli* enterotoxigénica (ECET). La infección por *S. dysenteriae* presenta su mayor incidencia a partir del primer año de vida. Las cepas de ECET se detectan en forma regular a través de los primeros 3 años de vida. La puerta de entrada de estas infecciones es por la boca y el hábitat es el tracto intestinal, excretándose el microorganismo con la materia fecal, las dosis mínimas infecciosas que se han establecido son: de 100 a 1,000 microorganismos de *Shigella* y 1,000,000,000 de ECET (Olarde, 1992; Suárez-Hoil *et al.*, 1993).

La relación huésped-bacteria no solo es la resultante de las características patogénicas del parásito, o de los huéspedes con inmunodeficiencia, sino a un nivel celular ya que en muchos de los mecanismos que participan los fenómenos infecciosos se requiere tanto de un factor microbiano de patogenicidad (toxina, adhesina, etc.) como un receptor de la superficie de la

célula huésped. Algunos datos de la relación entre los cuadros clínicos y los agentes causales más frecuentemente relacionados con ellos, se muestran en la tabla 1 (Olarde, 1992).

**Tabla 1.** Correlación entre el cuadro clínico y el agente etiológico.

Cuadro clínico	Agente etiológico probable
Diarrea	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ECET), <i>E. coli</i> enteroinvasiva (ECEI) y <i>E.coli</i> productora de verotoxina (ECVT) y algunas especies de <i>Salmonella</i>
Disentería	Algunas especies de <i>Shigella</i> , ECEI, ECVT y algunas especies de <i>Salmonella</i>

### II.1.1 Enterobacterias.

Las enterobacterias son organismos que se encuentran en la tierra, el agua y la vegetación; son parte de la flora normal del tracto gastrointestinal de la mayoría de animales, incluyendo a los humanos, algunos miembros de la familia que están siempre asociados con diarrea y disentería son *Shigella*, *Salmonella* y *Yersinia*, mientras que otros como *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Proteus* son flora normal y en ocasiones pueden causar enfermedades alcanzando desde síntomas leves a infecciones severas (Torregrosa *et al.*, 1996; Armstrong y Cohen, 1999).

Los microorganismos de la familia enterobacteriaceae son gram-negativos, bacilos no formadores de esporas, de tamaño entre 2-3  $\mu\text{m}$  x 0.4-0.6  $\mu\text{m}$ , pueden tener motilidad por flagelos peritricos, pueden estar encapsulados. Crecen rápidamente en el laboratorio bajo condiciones aerobias y anaerobias. Fermentan la glucosa y pueden formar ácido y/o gas. Son oxidasa negativos, reducen nitratos a nitritos y muy pocas excepciones son catalasa positiva (Armstrong y Cohen, 1999).

Los plásmidos, bacteriófagos y elementos de transporte son importante fuente de variación genética ya que suplen los genes que no son esenciales para el crecimiento de la bacteria, ofreciendo una selectiva ventaja bajo condiciones específicas. Los factores de virulencia y los elementos de la resistencia a antibióticos son frecuentemente asociados a estos elementos móviles del DNA (Armstrong y Cohen, 1999).

### II.1.2 Morfología.

Las bacterias están rodeadas por paredes celulares rígidas que les confieren formas características y les permiten vivir en entornos hipotónicos y son las responsables de la virulencia

bacteriana.

La pared celular de las enterobacterias están constituidas de una membrana citoplasmática interior, una capa de péptidoglicanos y una membrana exterior que consiste de dos capas: la capa exterior interna a base de proteínas fosfolipídicas y la capa externa a base de lipopolisacáridos (LPS). En los casos particulares de *Klebsiella* sp y algunas cepas de *E. coli*, poseen una capa adicional llamada cápsula.

La membrana citoplasmática está compuesta primariamente de proteínas y fosfolípidos (3:1), tiene muchas funciones incluyendo transporte, biosíntesis y energía de transducción. Contiene numerosos metabolitos en los sistemas de transporte y también es un sitio donde la actividad enzimática es intensa, sus sistemas activos de flujo permiten expulsar las sustancias no deseadas del citoplasma al ambiente.

Los peptidoglicanos son una red de cadenas lineales de aminoazúcares alternados (N-acetil-glucosamina y residuos de ácido N-acetil muramínico) que se unen por covalencia a tetrapéptidos(L-Ala-D-Glu-N-L-Lys-D-Ala) por medio de la enzima lisozima. Esta capa mantiene la forma de la bacteria y tiene de 5 a 10 nm de espesor.

Las proteínas fosfolipídicas son pequeñas moléculas que parecen triglicéridos y que están constituidos principalmente por ácidos grasos y glicerol. Cada cadena fosfolipídica tiene una parte final hidrofóbica, compuesta de dos cadenas de ácidos grasos y un frente polar hidrofílico donde esta el fosfato. La diferencia entre la longitud y la saturación de las cadenas de los ácidos grasos son importantes porque ellos determinan la habilidad de las moléculas fosfolipídicas para empaquetar una contra otra y por esta razón ellos afectan la fluidez de la membrana.

Los LPS o endotoxinas son tóxicas secretadoras, generalmente tienen tres regiones: la cadena polisacárida A (glucosamina,  $\beta$  hidroximiristal y ácidos grasos) única para cada tipo de bacteria, requerida para la inserción de la bicapa externa; el centro de la cadena de polisacáridos (ácido 2-ceto-3-deoxioctanoico, heptosa, etanolamina, N-acetil glucosamina, glucosa y galactosa); y los antígenos O (cadenas de polisacáridos que repiten unidades de monosacáridos) que le confiere especificidad serológica, constituye el medio por el que el sistema de defensa inmunológico del huésped reconoce a la bacteria invasora como extraña. Las propiedades endotóxicas residen en los componentes del lípido A. La glucosaminil- $\beta$ -(1-6) glucosamina es responsable de las propiedades biológicas de las endotoxinas y de la citotoxicidad. Los LPS son factores principales en la patogénesis de las infecciones por enterobacterias, son pirogénicos,

pueden activar macrófagos y complemento, es mitogénico para linfocitos B, inducen la producción de interferón, causan necrosis de tejido y tiene propiedades adyuvantes.

La cápsula es una capa de un gel viscoso que mide aproximadamente 10  $\mu\text{m}$  de espesor, está compuesta por polisacáridos de alto peso molecular que están retenidos en la superficie del gel. Juega un papel importante en la protección de la bacteria en un medio hostil, esta provee a la bacteria con un mecanismo para evitar la defensa no específica del huésped, además la cápsula puede actuar como una barrera física a la fagocitosis previniendo el contacto entre la bacteria y la célula fagocítica. La cápsula está formada de polisacáridos de naturaleza ácida frecuentemente es el ácido colánico también llamado antígeno "M" o antígeno mucoso, cuya función es de protección contra la disecación, es no específico y da reacción serológica cruzada con otros microorganismos. Otros polisacáridos de superficie incluyen al antígeno "K" y al antígeno "Vi". El antígeno "K" es pobre inmunógeno y activador de complemento, ayuda a las bacterias a evadir la fagocitosis y resalta la virulencia de la bacteria invasiva. El antígeno Vi provee soporte para diagnóstico de tifoidea en pacientes con respuesta negativa. Dos importantes ejemplos de antígenos son el antígeno "K1" de *E. coli* y el antígeno "Vi" de *S. thypi*. (Voet y Voet, 1992; Alberts *et al*, 1994; Armstrong y Cohen, 1999).

El flagelo de las enterobacterias es de naturaleza proteica, son de 3 a 12  $\mu\text{m}$  de largos, consta de tres segmentos principales: el filamento flagelar compuesto por flagelinas, el gancho flagelar compuesto por el filamento flagelar y el cuerpo basal, este consta de una varilla que conecta varias estructuras en forma de anillo que ancla el gancho flagelar a la bacteria. El flagelo es un órgano de locomoción, provee de movilidad a la bacteria por rotación. Los flagelos son los efectores de la quimiotaxis, detectan pequeñas variaciones en concentraciones o sustancias dañinas en el ambiente y transportan el calor-lábil del antígeno "H". Los flagelos son característicos de cada especie, se usan para identificar y clasificar a la bacteria. Cuando la bacteria pierde su flagelo, la bacteria regenera nuevos flagelos para recobrar su movilidad (Voet y Voet, 1992; Armstrong y Cohen, 1999).

Las fimbrias o pili son estructuras rígidas con diámetro regular, delgadas y largas. El pili es más rígido que el flagelo. En las especies de *Shigella* y *Escherichia coli* el pili está distribuido ampliamente en la superficie de la bacteria (200 pilis por bacteria). En las cepas de *E. coli* el pili puede ser de dos tipos, el más común que es corto y abundante y el segundo llamado pili del sexo o pili largo que se pueden encontrar de 1 a 6 por bacteria. El pili en muchas bacterias entéricas

son importantes en el proceso de la adhesión del huésped y la bacteria, jugando un papel importante en la colonización de la superficie epitelial (Voet y Voet, 1992; Armstrong y Cohen, 1999).

Las afimbrias son flexibles con diámetro irregular, delgadas y largas, en el proceso de la adhesión del huésped y la bacteria, también juegan un papel importante en la colonización de la superficie epitelial (Voet y Voet, 1992; Armstrong y Cohen, 1999).

### **II.1.3 Patogenicidad.**

Las infecciones causadas por miembros de enterobacterias son determinadas por varios factores de virulencia y el estado de las defensas del huésped (Tabla 2). Los procesos de infección implicados en la patogénesis son: la adhesión y la invasión (Voet y Voet, 1992; Armstrong y Cohen, 1999).

En la adhesión la bacteria se une a las células huésped de forma inmediata por medio de las adhesinas: fimbria y afimbrilas. La fimbria es un factor que permite adherirse a la superficie de la mucosa del tracto intestinal, respiratorio o genitourinario y de los glóbulos rojos. Las afimbrias intervienen en la unión entre la bacteria y la célula huésped de forma diferente a la fimbria, ya que no forman estructuras supramoleculares. Estas propiedades juegan un papel importante en la colonización de las superficies epiteliales y son, por lo tanto, referidas como factores de colonización. La clasificación de estos factores de colonización está basada en un criterio morfológico (Voet y Voet, 1992; Armstrong y Cohen, 1999).

La invasión sucede cuando las bacterias penetran al enterocito dañando la mucosa intestinal. Las enterobacterias que invaden la submucosa son *Salmonella*, *Shigella* y ECEI, éstas principalmente invaden la mucosa colónica, produciendo una respuesta local, sistémica, fiebre y disentería. La infección por *Salmonella*, *Shigella* y ECEI origina diarrea debido a procesos intestinales secretorios mediados por el sistema monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). Se ha propuesto que los leucocitos que se encuentran en el área dañada, liberan prostaglandinas que estimulan a la adenilato ciclasa, provocando secreción de agua y electrolitos (Torregrosa, 1996). En la invasión hay liberación de toxinas, las cuales son de naturaleza proteica, tienen un efecto deletéreo sobre las células de los mamíferos y pueden ser termolábiles (TL) y/o termoestables (TS). Las toxinas se pueden clasificar como citotoxinas y enterotoxinas.

Las toxinas TL producen efectos graves y hasta la muerte del enterocito y las toxinas TS causan

un efecto no letal, alterando el metabolismo celular, originando cambios morfológicos.

**Tabla 2** .-Agentes etiológicos, mecanismos patogénicos, modo de acción y manifestación clínica de la diarrea y de la disentería.

Agente etiológico	Patogénesis	Modo de acción	Manifestación clínica
<i>E. coli</i> enteropatógena (ECEP), <i>E. coli</i> enteroagregativa (ECEagg)	Adherencia en la mucosa localizada o difusa	Ataque a la mucosa intestinal, colonización	Diarrea secretora
<i>Salmonellasp.</i> , ECET, <i>S. sonnei</i>	Invasión a través de enterotoxinas	Secreción de fluido con daño en la mucosa	Diarrea aguda con o sin sangre
<i>Shigella dysenteriae</i> serotipo 1, <i>E. coli</i> 0157:H7, <i>Salmonellasp</i>	Invasión a través de citotoxinas	Destrucción de la mucosa intestinal con secreción de moco y sangre	Colitis inflamatoria y Disentería
<i>S. dysenteriae</i> serotipo 1, <i>S. flexneri</i> , ECEI.	Invasión en la mucosa a través de toxinas	Penetración dentro de la mucosa y destrucción de células epiteliales	Disentería

Entre los microorganismos asociados con casos de diarrea, con o sin sangre, o con colitis hemorrágica productoras de citotoxinas se encuentran: *S.dysenteriae* tipo 1, ECEP ATCC 25922, ECEH 0157:H7, entre otras. La toxina Shiga de *S. dysenteriae* tipo 1, es una potente citotoxina que causa disfunción capilar y hemorragia focal, esta toxina está asociada con el síndrome hemolítico-urémico. Las toxinas expresadas por ECEH están estrechamente relacionadas a la toxina Shiga de *S. dysenteriae* tipo 1.

Las enterotoxinas TL y/o TS son sintetizadas por ECEH, *Salmonella typhi* y *S. typhimurium* entre otras. La enterotoxina TL activa a la adenilato ciclasa provocando hipersecreción de fluidos y electrolitos hacia el intestino delgado e inhibición de la reabsorción. La enterotoxina TS activa guanilato ciclasa en el epitelio intestinal, produciendo cambios en el transporte de iones, dando

como resultado un incremento en el fluido y electrolitos en el lumen intestinal. Estas toxinas son producidas por ECET.

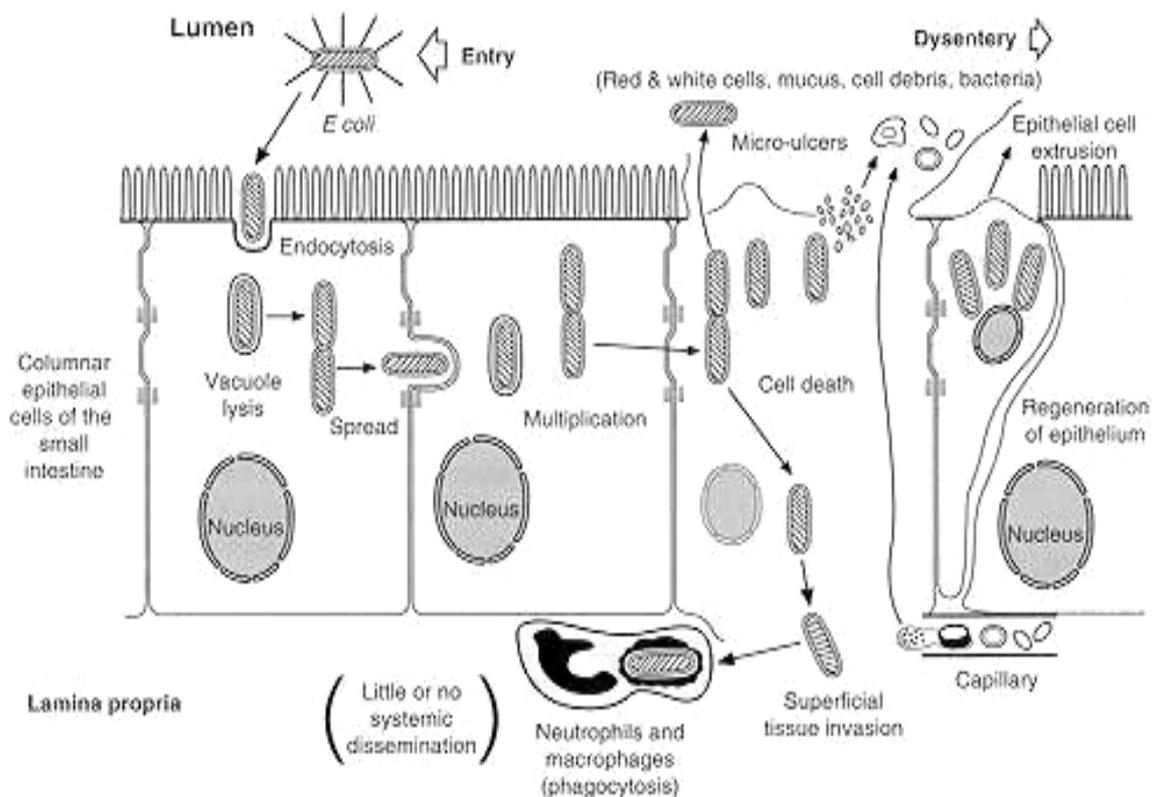
#### **II.1.4 *Escherichia*.**

Del género *Escherichia* la especie más importante es *E. coli* que forma la mayor proporción de bacterias aerobias gram-negativas del tracto gastrointestinal. No forman esporas y a menudo son móviles por medio de flagelos peritricos. Pueden crecer tanto en forma aeróbica como en forma anaeróbica. Las colonias en medio Mc Conkey son de apariencia lisa, brillantes, translúcidas y de color rosa. En gelosa nutritiva las colonias pueden ser lisas, convexas, húmedas, grisáceas, de bordes enteros y fácilmente dispersables en solución salina. La mayoría de las cepas de *E. coli* metabolizan carbohidratos produciendo ácidos láctico, acético y fórmico, este último es transformado en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>; pocas cepas no producen gas. Aunque la mayoría de las cepas de *E. coli* fermentan la lactosa rápidamente, hay algunas cepas con un proceso lento de fermentación o que no fermentan lactosa. Además *E. coli* se caracteriza por la habilidad de reducir nitratos a nitritos. La mayoría de las cepas producen indol y dan una reacción positiva con rojo de metileno. Las cepas de *E. coli* no hidrolizan urea ni producen ácido sulfhídrico, no pueden usar citrato como única fuente de carbono (Koneman *et al.*, 1990).

*E. coli* es un habitante normal del tracto gastrointestinal que puede causar infecciones bajo ciertas condiciones. El desarrollo y la severidad de las infecciones dependen fuertemente de la virulencia de la bacteria y del estado del mecanismo de defensa del huésped. La transmisión es por vía fecal-oral. El mecanismo de patogenicidad de las bacterias enteroinvasivas comienza cuando *Escherichia* prolifera en la luz intestinal y se adhiere a las microvellosidades mediante receptores específicos pueden ser ingeridas por endocitosis en las células del colón, después de que atraviesa la membrana, la bacteria se multiplica y atraviesa la superficie basolateral para infectar a otros enterocitos colónicos que en casos extremos son lisados observándose como microúlceras y por otra atraviesan la lámina propia para ir al torrente circulatorio donde pueden ser fagocitados por neutrófilos y macrófagos, es ahí donde se estimula una respuesta inflamatoria pasando a los capilares y de ahí a la circulación general. Cualquiera de los factores de invasión que produzcan una reacción de inflamación del huésped con un incremento de linfocitos resulta en disentería (Figura 1). La fimbria permite a la bacteria colonizar la mucosa del íleon. Sus propiedades de virulencia están codificadas en los plásmidos; interaccionan de forma

característica con la mucosa intestinal y producen enterotoxinas o citotoxinas induciendo diarrea aguda. La infección es más común en niños y es susceptible para los viajeros de los países desarrollados. *E. coli* a sido clasificada en categorías, las cepas tienden a caer dentro de los serotipos “O:H”.

Las cinco especies de *E. coli* que causan diarrea son: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* patológica (ECEP) y *E. coli* enteroagregativa (ECEagg).



**Figura 1.-** Mecanismo de patogenicidad de *Escherichia*.

La *E. coli* enterotoxigénica (ECET) induce diarrea por colonización del intestino delgado y producción de una o más enterotoxinas. Tiene un mecanismo similar al del cólera, pero generalmente produce esta enfermedad menos grave, es la causa más común de la “diarrea del viajero”. La infección por ECET, después de un periodo de incubación de 1 a 2 días se caracteriza por diarrea con sangre, náuseas, fiebre y vómito; los síntomas son usualmente débiles

y auto-limitados con una duración de 3-4 días.

La *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) causa disentería, es capaz de invadir y proliferar adentro de las células epiteliales del intestino grueso, causando eventualmente la muerte de la célula. La capacidad invasiva es dependiente de la presencia de codificar plásmidos para la producción de varias membranas proteínicas externas implicadas en la invasión. Clínicamente la enfermedad se caracteriza por diarrea acuosa con moco y leucocitos, escasa sangre en heces, dolor abdominal y fiebre.

La *E. coli* enterohemorrágica (ECEH o *E. coli* O157:H7) produce una toxina llamada verotoxina y está asociada con dos síndromes: colitis hemorrágica con dolor abdominal, diarrea con sangre y el síndrome hemolítico-urémico caracterizado por anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal aguda. Los síntomas varían en severidad de síntomas leves como diarrea sin sangre a colitis hemorrágica severa, algunas veces terminando en muerte especialmente en niños y adultos mayores.

La *E. coli* enteropatogénica (ECEP) es una de las principales causas de diarrea infantil y también está asociada con diarrea crónica en niños. Las cepas de ECEP son responsables de diferentes signos clínicos de infección, dependiendo de la localización, de la difusión y la adherencia a células. Los signos clínicos van desde escasa diarrea a una diarrea más severa. Las cepas de ECEP se adhieren a la mucosa del intestino delgado y produce una destrucción característica de microvellosidades. La adhesión es promovida por la fimbria llevando a la adhesina sensitiva a manosa hacia el epitelio. Las células epiteliales en la parte superior del intestino delgado reaccionan a la proliferación característica de ECEP con la destrucción del microvello. La adhesión de los plásmidos es el factor más importante en la patogénesis de la enfermedad.

La *E. coli* enteroagregativa (ECEagg) se caracteriza por un patrón agregativo de adherencia y está en asociación con diarrea persistente. Las cepas ECEagg llevan un plásmido de 60 MDa que contiene un gen que confiere adherencia agregativa y también un gen que codifica a la enterotoxina 1 ECEagg-termoestable (Collins *et al.*, 1995; Torregrosa *et al.*, 1996; Bennish, 1997).

### II.1.5 *Shigella*.

Las enterobacterias del género *Shigella* son anerobias facultativos gram-negativas, sin flagelos, la falta de motilidad es un rasgo microbiológico distintivo del género, no fermentan lactosa, no usan citrato ni malonato como única fuente de carbono; no crecen en cianuro de potasio. Las colonias en medio *Salmonella-Shigella* (S-S) son incoloras, en medio entérico Hektoen (HE) las colonias son de color verde. Las colonias de *Shigella* crecen en agar de azúcar-hierro triple (TSI) o en agar de hierro de Kligler (KIA) dando un pico alcalino rojo y un fondo rojo para confirmar que no fermentan lactosa, pero metabolizan la glucosa de manera anaerobia y no producen ácido sulfhídrico. El diagnóstico puede confirmarse al demostrar aglutinación con antiseros de grupo específico A-D. La *Shigella* no es resistente y muere fácilmente cuando se expone al calor o a la desecación si no se inocula en medios de aislamiento como Mc Conkey y S-S (Koneman *et al.*, 1990).

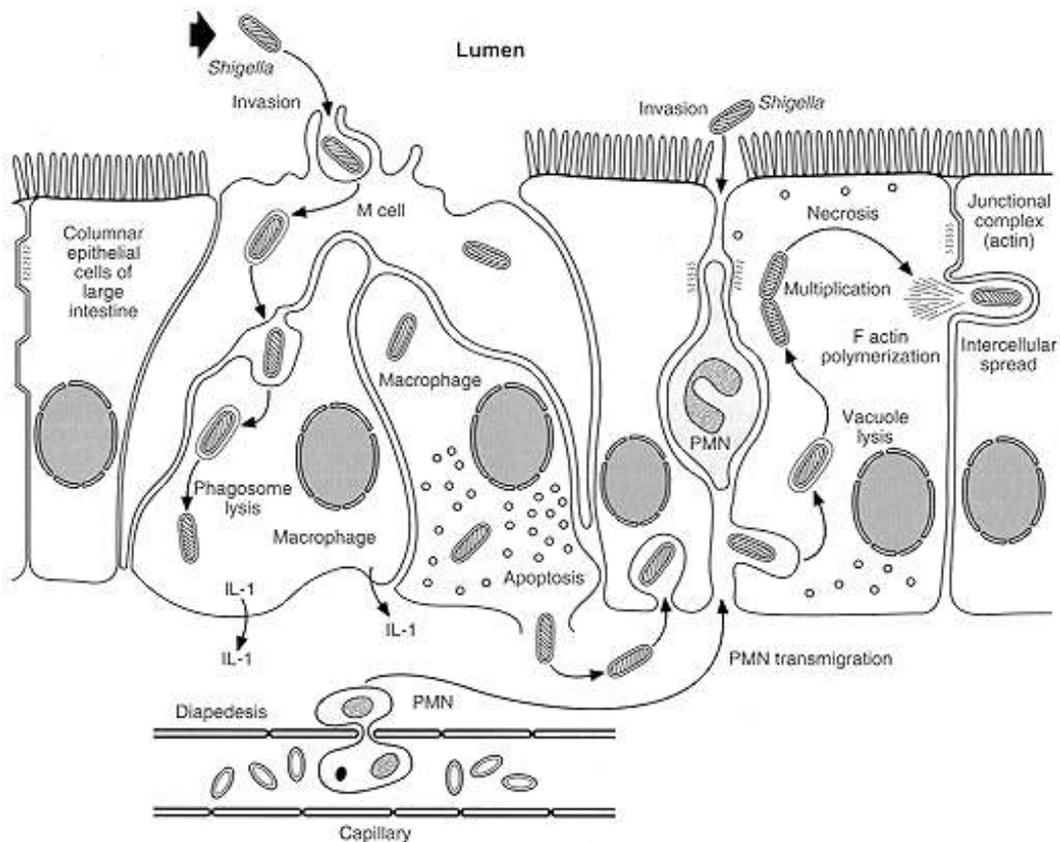
La disentería causada por *Shigella* ocurre en todo el mundo, en países industrializados las especies más comunes son *S. dysenteriae* y *S. flexneri* siendo estas las más virulentas. En los países en desarrollo *S. sonnei* es la más frecuente.

La infección se inicia por la ingestión de la bacteria usualmente por vía fecal-oral y frecuentemente es en el colon, el inicio de la shigelosis ocurre a menudo con síntomas generalizados como fiebre, fatiga, dolor abdominal, tenesmo, anorexia y ataque al estado general, los cuales preceden a la diarrea acuosa, en algunos individuos, dependiendo de la especie infectante, la diarrea acuosa se torna sanguinolenta y evoluciona a disentería. Es posible que la shigelosis produzca complicaciones intestinales graves en particular la obstrucción intestinal y el megacolon tóxico se pueden desarrollar cuando hay perforaciones del intestino.

La diarrea causada por enterotoxinas o citotoxinas ocurre cuando *Shigella* pasa a través del intestino delgado. La invasión de la bacteria al epitelio colónico causa colitis inflamatoria. La colitis en la mucosa rectosigmoidea con mala absorción produce disentería bacilar. La disentería se caracteriza por pérdida de suero proteico de 200 a 300 ml diario en heces resultando en malnutrición. Posibles complicaciones de la shigelosis incluyen bacteremia, convulsiones y otras complicaciones neurológicas, artritis y síndrome hemolítico-urémico.

El mecanismo de patogenicidad comienza cuando *Shigella* entra y coloniza el colon, lo que genera una respuesta inflamatoria, con infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN). La patogenicidad por *Shigella* es un proceso de multietapas, el cual depende de la capacidad de la

bacteria de cruzar la mucosa, vía asociación con las células M y el tejido linfoide. *Shigella* entra en las células M induciendo su propia endocitosis. La *Shigella*. escapa de su vacuola y usa el citoesqueleto de la célula para esparcirse de célula a célula. Entonces invade a células epiteliales y a macrófagos. Los macrófagos son degradados y la bacteria causa liberación de IL-1 que produce un flujo de leucocitos polimorfonucleares. En los macrófagos infectados hay apoptosis y la bacteria se libera en la superficie basolateral adyacente al enterocito colónico. Los leucocitos migran a través del epitelio rompiendo las uniones permitiendo a la bacteria migrar dentro del espacio subepitelial. La bacteria infecta el enterocito por inducción endocítica y las vacuolas endocíticas son degradadas, la bacteria ataca a la actina del complejo unido al enterocito, se multiplica y se esparce al enterocito contiguo por inducción de la polimerización de la actina, por último el enterocito muere, resultando en necrosis del epitelio con una respuesta inflamatoria producida por las lesiones causadas por la *Shigella* (Figura 2).



**Figura 2.-** Mecanismo de patogenicidad de *Shigella*.

Cuatro especies de importancia médica son tradicionalmente descritas dentro del género *Shigella*: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei*. Los miembros de las especies son difíciles de diferenciar uno de otro por pruebas bioquímicas. Se les identifica serológicamente con base a los antígenos del grupo A al D. Los serogrupos A, B y C son muy similares fisiológicamente, mientras que el D puede ser diferenciado de los otros por reacciones bioquímicas. *S. dysenteriae* forma parte del serogrupo A, *S. flexneri* del serogrupo B, *S. boydii* del serogrupo C y *S. sonnei* del serogrupo D.

*S. dysenteriae* tipo 1 produce la toxina Shiga que es el prototipo de una de las familias de proteínas heterodiméricas formadas por una subunidad A enzimáticamente activa y un complejo de cinco subunidades B que median la unión con receptores de la toxina. Contiene 13 serotipos y ocasionalmente produce gas de glucosa. Se presenta en la mayoría de los pacientes menores de 4 años con disentería y es responsable de las enfermedades invasivas severas, la infección puede conducir al desarrollo del síndrome urémico hemolítico.

*S. flexneri* contiene 15 serotipos y es común en la disentería de pacientes de hospitales mentales, geriátricos, guarderías y escuelas en climas templados. La toxina Shiga de *Shigella flexneri* causa diarrea que a menudo precede a la disentería bacilar.

*S. boydii* se divide en 18 serotipos, son ampliamente distribuidas. Esta especie no es muy común pero cuando esta presente causa disentería de severidad intermedia, la presentación inicial puede ser como diarrea líquida con fiebre.

*S. sonnei* consta de un serotipo dividido en dos clases I y II. Puede ser separada de las otras *Shigellas* por una reacción positiva a ornitina descarboxilasa y a  $\beta$ -galactosidasa, esta especie puede mostrar fermentación de lactosa después de la incubación por más de 48 horas. Pocas veces causa disentería, en escuelas y guarderías es la causa de diarrea aguda, afectando a bebés y a niños (Collins *et al.*, 1995, Torregrosa *et al.*, 1996, Bennish, 1997).

### **II.1.6 *Salmonella*.**

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos rectos, gram -negativos, no esporulados, son anaerobios facultativos. La mayoría de las serovariedades son móviles por flagelos peritricos, las colonias miden de 2 a 4 mm de diámetro, en medio xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) son de color negro con un fino halo rojo que las rodea ya que descarboxilan a la lisina del medio. En medio S-S las colonias son incoloras con el centro negro debido a la producción de ácido

sulfhídrico. Reducen los nitratos, producen gas de glucosa, son indol negativos, utilizan el citrato como fuente de carbono, son positivos a lisina y ornitina, son ureasa negativo y no oxidan a la fenilalanina ni al triptófano y no fermentan sacarosa (Koneman *et al.*, 1990).

La *Salmonella* infecta a humanos y a animales, los animales son el primer reservorio y la bacteria está usualmente en la comida contaminada; aunque también se puede diseminar de persona a persona por la vía fecal-oral. Las infecciones ocurren en niños y adultos.

*Salmonella* origina desde un estado de portador asintomático, salmonelosis caracterizada por diarrea, dolor abdominal y fiebres, y la infección diseminada que incluye a la fiebre tifoidea. Muchos de estos síndromes no se presentan aislados, sino combinados o uno seguido del otro, dependiendo de la magnitud de la infección y sobre todo del adecuado estado inmunitario de los individuos. El periodo de incubación depende de la dosis de la bacteria, los síntomas usualmente aparecen después de 6 a 8 horas de la ingestión de comida contaminada o agua y usualmente produce náusea, vómito, diarrea, dolor abdominal, dolor de cabeza, fiebre de entre 38 °C-39 °C y escalofrío son comunes, la duración de la fiebre es de 2 a 7 días. Las heces contienen leucocitos polimorfonucleares, sangre y moco.

*Salmonella* tiene la habilidad para invadir las células, para replicarse intracelularmente y la posibilidad para producir toxinas. Dependiendo del serotipo algunas pueden infectar el hígado, el bazo, los huesos, las meninges y otros órganos. La respuesta inflamatoria aguda causa diarrea, ulceración y destrucción de la mucosa produciendo la enfermedad sistémica.

Después de la ingestión de *Salmonella* la bacteria enteroinvasiva prolifera en la luz intestinal y se adhiere a las microvellosidades mediante receptores específicos y penetra en las células del colón, donde se multiplica e infecta a otros enterocitos ya dentro de las células intestinales, las bacterias pasan a través de la barrera gástrica e invade la mucosa del intestino. Estas producen toxinas que activan a la adenilil ciclasa incrementando la secreción del AMP cíclico y en consecuencia hay un aumento en la secreción de agua y electrolitos que se manifiesta en diarrea. Así también la invasión de las células epiteliales estimulan la liberación de citocinas proinflamatorias las cuales inhiben la síntesis de proteínas y estimulan la secreción de agua y electrolitos induciendo inflamación y diarrea. En casos graves la *Salmonella* atraviesa la lámina propia para diseminarse sistémicamente (Figura 3).

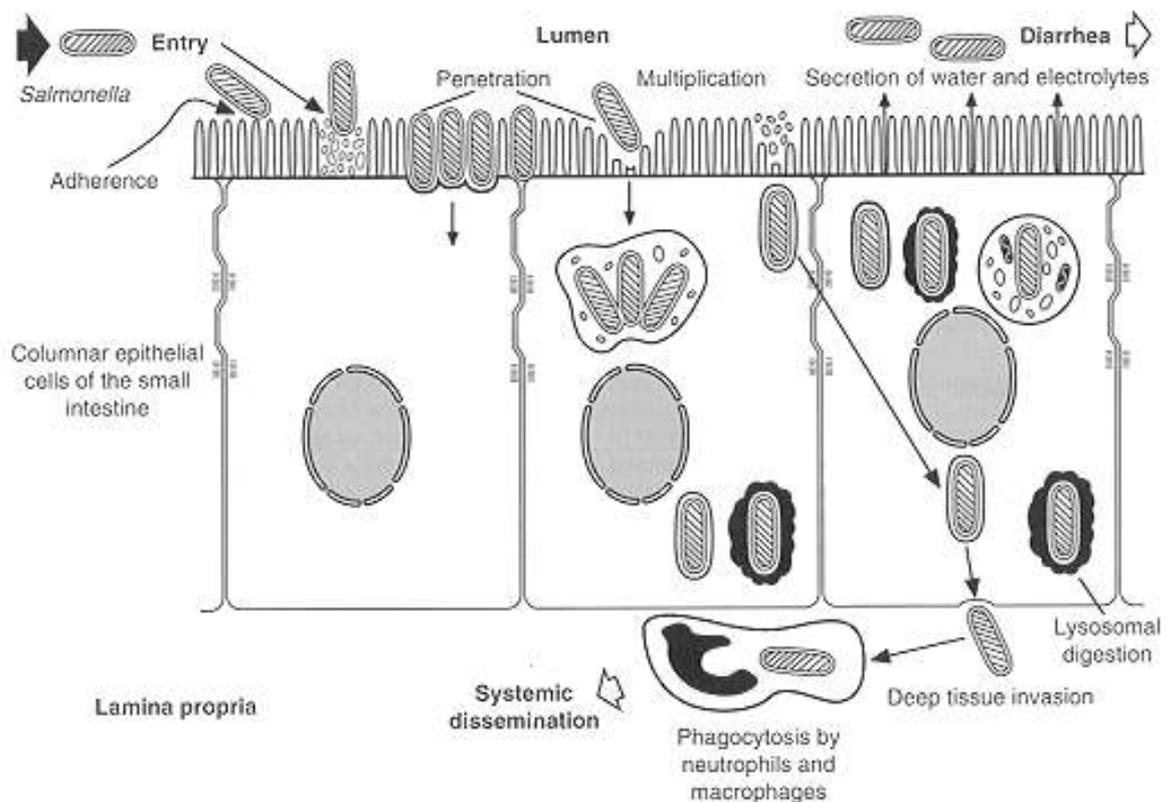
El género *Salmonella* se caracteriza por antígenos H, O y Vi, hay más de 1800 serotipos. El antígeno H (flagelar) ocurre en dos fases, la fase 1 y la fase 2, el organismo tiende a cambiar

de una fase a otra. El antígeno O (somático) ocurre en la superficie de la membrana externa y son determinadas por la secuencia de azúcares específicos en la superficie de la célula. El antígeno Vi es un antígeno superficial que cubre al antígeno O.

El género puede ser dividido en diferentes grupos como: *S. enterica*, *S. typhimurium*, *S. typhi*, *S. paratyphi* A, B y C.

*S. enterica* causa infección intestinal o gastroenteritis caracterizada por dolor abdominal, diarrea aguda ocasionalmente con moco y sangre.

*S. typhimurium* tiene un alto espectro de huéspedes, incluyendo animales y personas produciendo gastroenteritis en humanos, provoca fiebre tifoidea letal en ratones. Contiene megaplásmidos de 120 kDa que codifican factores de virulencia en animales y resistencia antimicrobiana.



**Figura 3.-** Mecanismo de patogenicidad de *Salmonella*.

*S. typhi* produce fiebre tifoidea, la identificación presuntiva puede ser hecha bioquímicamente porque estas cepas son en su mayoría citrato negativas, producen lentamente

ácido sulfhídrico, son ornitina descarboxilasa negativa, no producen gas de glucosa y no fermentan arabinosa ni ramnosa en contraste con la mayoría de las otras cepas de *Salmonella*. En medio sulfito de bismuto crecen colonias negras con un brillo metálico en la superficie circundante, característica de esta especie. Es completamente avirulenta en ratones.

*S. paratyphi* A, B (*S. schottmuelleri*) y C (*S. hirschfeldii*) usualmente asociadas con fiebre entérica, causa un cuadro clínico menos grave de tifoidea. En medio sulfito de bismuto forma colonias verdes (Koneman *et al.*, 1990; Collins *et al.*, 1995; Torregrosa *et al.*, 1996; Bennish, 1997; Hanes *et al.*, 2001).

### II.1.7 Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la diarrea bacteriana.

Para el tratamiento de la diarrea bacteriana se recomienda la terapia de rehidratación oral acompañada de algún antibiótico (Tabla 3). Los fármacos en su mayoría son eficaces, pero no siempre son bien tolerados y en ocasiones es necesario preescribir terapias de combinación para obtener el efecto deseado (SS, 1993; Bennish, 1997; Arredondo y Hernández, 1998; Aguilar, 1998; Mota, 2002).

**Tabla 3.** Algunos fármacos utilizados en el tratamiento de la diarrea bacteriana.

Causa	Fármacos
<i>Escherichia</i>	Cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina, gentamicina, neomicina, ácido nalidíxico, estreptomina, kanamicina, sulfato de amikacina, netilmicina, cefadroxilo, ceftazidima, cefalexina, cefadrina.
<i>Shigella</i>	Trimetoprima, sulfametoxazol, sulfisoxazol, gentamicina, rifampicina, ampicilina, neomicina, kanamicina, cefalotina, lomefloxacina, sulfato de amikacina, netilmicina, cefadroxilo, ceftazidima, cefadrina.
<i>Salmonella</i>	Cloranfenicol, ampicilina, cotrimoxazol, rifampicina, trimetoprima, sulfisoxazol, sulfametoxazol, gentamicina, neomicina, ácido nalidíxico, kanamicina, nitrofurantoína, cefalotina, amoxicilina, lomefloxacina, sulfato de amikacina, netilmicina, cefadroxilo, ceftazidima, cefadrina.

Adicionalmente, la mayoría de los fármacos inducen diversos efectos colaterales indeseables como alergias, aplasias de médula ósea, trastornos gastrointestinales (dolor de

estómago, estomatitis, constipación), anemia, conjuntivitis, reacciones dermatológicas, glositis, fiebre, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, neuritis, ototoxicidad, fototoxicidad, pueden provocar alteraciones del equilibrio, sordera y/o lesiones renales, bloqueo neuromuscular, parálisis respiratoria y reacciones de hipersensibilidad, entre otros (PLM, 2005; SS, 1993; Harrison, 1995; Bennis, 1997; Aguilar, 1998). Por otro lado la resistencia a los antibióticos actualmente en uso es cada vez más importante. Este problema se debe a que los medicamentos pueden ser adquiridos en farmacias locales, sin receta médica, generando su uso indiscriminado, favoreciendo la resistencia a los antibióticos de algunos agentes causantes de diarrea, tal es el caso de *Shigella* resistente a trimetoprima, ampicilina, estreptomina, tetraciclina, sulfonamidas, cloranfenicol y cotrimoxazol; *E. coli* resistente a trimetoprima y *S. typhi* resistente a cloranfenicol, ampicilina, fluoroquinolona, estreptomina, tetraciclina, trimetoprima y sulfonamida (Bennish, 1997; Aguilar, 1998; Carnevale *et al.*, 2000; Replogle *et al.*, 2000).

Los mecanismos de acción de los antibióticos se basan en su estructura química y pueden dividirse en:

1) Los agentes que inhiben la síntesis o activan la degradación a la pared celular para causar pérdida de viabilidad y lisis bacteriana, estos incluyen a las penicilinas y las cefalosporinas.

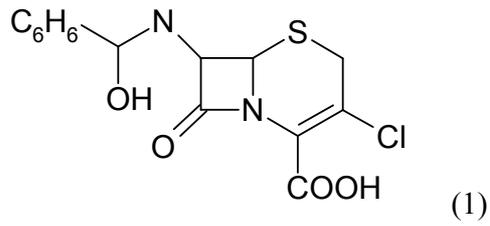
2) Los agentes que afectan la función de los ribosomas bacterianos para causar una inhibición reversible de la síntesis de proteínas, estos fármacos incluyen al cloranfenicol, las tetraciclinas, la eritromicina y la clindamicina.

3) Los agentes que se unen a la subunidad ribosomal 30S y alteran la síntesis de proteínas, lo cual eventualmente guía a la muerte bacteriana, estos incluyen los aminoglicósidos.

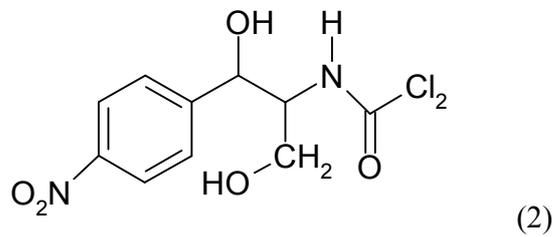
4) Los agentes que afectan el metabolismo de ácidos nucleicos, tales como la rifampicina, la cual inhibe a la RNA polimerasa dependiente de DNA y las quinolonas, las cuales inhiben a la síntesis y super hélice del DNA.

5) Los antimetabolitos que incluyen a la trimetoprima y las sulfonamidas, las cuales bloquean pasos específicos del metabolismo que son esenciales para las bacterias.

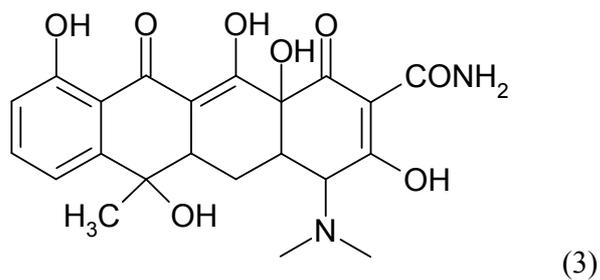
Así tenemos que las cefalosporinas como el cefaclor (1) y las cefamicinas inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, inhibiendo a la proteína transpeptidasa que causa lisis rápida y depende de la actividad enzimática autolítica de la pared celular.



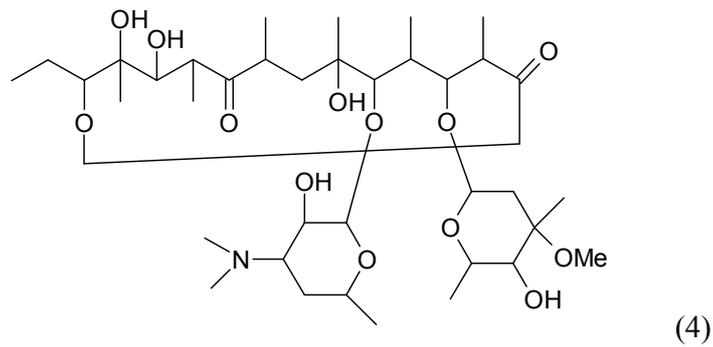
El cloranfenicol (2) inhibe la síntesis de proteínas bacterianas.



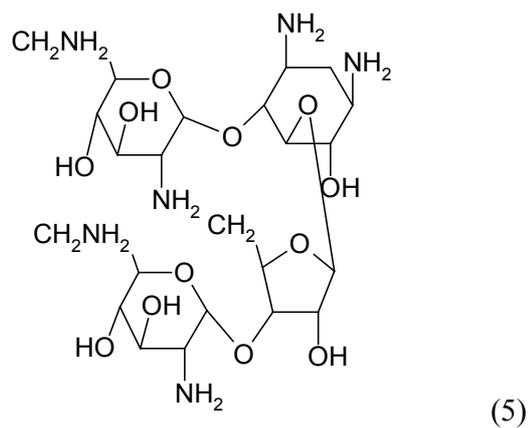
Las tetraciclinas (3) inhiben la síntesis de proteínas bacterianas, su sitio de acción es en los ribosomas. Primero por difusión pasiva a través de los canales hidrofílicos formados por purinas en la membrana exterior y segundo por transporte activo dependiente de energía a través del interior de la membrana citoplasmática.



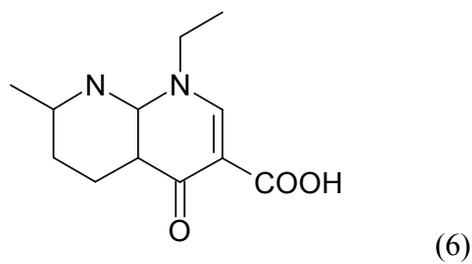
La eritromicina (4) inhibe la síntesis de proteínas por unión reversible a las subunidades del ribosoma 50 S.



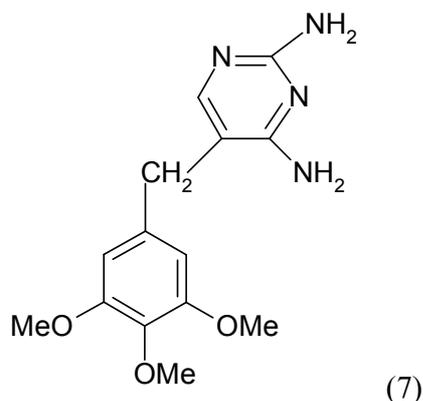
Los aminoglicósidos como la neomicina (5), inhiben la síntesis de proteínas y disminuyen la fidelidad de traslación del RNA mensajero en los ribosomas.



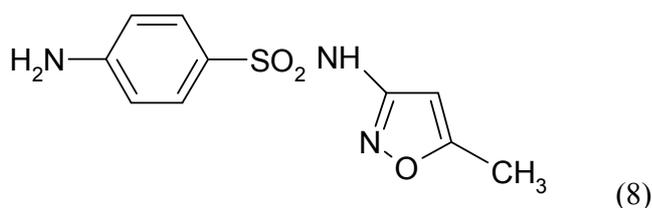
Las quinolonas como el ácido nalidíxico (6), separan las dos hebras de la doble hélice del DNA para no permitir la replicación o transcripción del DNA.



La trimetoprima (7) inhibe la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato, es un selectivo inhibidor de la reductasa dihidrofolato. La combinación de trimetoprima y sulfametoxazol resulta en la afectación de dos pasos de la ruta enzimática de la síntesis del ácido tetrahidrofólico.



Las sulfonamidas como el sulfametoxazol (8), son análogos estructurales y antagonistas competitivos del ácido *para*-aminobenzoico (PABA) que inhiben la síntesis del ácido fólico, necesario para la replicación del DNA (Goodman *et al.*, 1995).



## II.2 Estudio fitoquímico de plantas medicinales.

A través de los años el estudio de las plantas medicinales ha evolucionado de tal forma que en la actualidad son varios los programas existentes de plantas medicinales que están dirigidos a la búsqueda de compuestos biodinámicos con potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos. así tenemos los programas anti VIH, anticancerígenos, antidiabéticos, etc. El proceso que guía de la planta a un constituyente farmacológicamente activo, es muy largo, pesado y requiere de un aprovechamiento multidisciplinario. El descubrimiento de extractos prometedores y el subsiguiente aislamiento de constituyentes tienen sus requerimientos. Pocos

programas de rastreo farmacéuticos tienen ejemplos con suficientes especies de una región para generar una buena base de datos.

En los inicios de la investigación de las plantas medicinales la meta de la mayoría de los fitoquímicos era simplemente aislar, caracterizar y publicar una nueva estructura de origen natural, con o sin actividad farmacológica. Otros investigadores solo se conformaban con el compuesto que cristalizaba fácilmente o el compuesto mayoritario de la planta, debido a que los compuestos activos son más difíciles de aislar por encontrarse en ocasiones en cantidades pequeñas (McLaughlin, 1991; Cox y Balick, 1994; Hostettmann, 1995; Cowan, 1999; Cutler y Cutler, 2000; Heinrich, 2000; Cordero, 2002). El estudio de plantas utilizaba en general el criterio de selección casual o al azar, esta estrategia no dio éxito para encontrar nuevos compuestos bioactivos. Dada la baja velocidad para descubrir nuevos productos naturales que tengan un potencial terapéutico con este criterio, se ha cambiado a otros métodos de selección. Estos otros criterios de selección son apoyados por taxónomos, ecologistas, etnomédicos, etnobotánicos o por la observación de como ciertos animales como los chimpances utilizan las plantas (zoofarmacología).

El criterio ecológico toma en cuenta la función de los metabolitos en las plantas que son importantes para la sobrevivencia, defensa y como medio de comunicación de la planta, también pueden obtener sus propias formas de agresión química de proliferación celular de patógenos, estos compuestos químicos podrían tener actividad específica contra sitios blancos en bacterias, hongos, virus. La investigación e identificación de las señales de moléculas endógenas que producen la infección en el sitio cuando traslocan a otras partes de la planta, es de gran interés para muchos científicos de plantas porque tales moléculas tienen posibles usos como agentes de control de enfermedades (McLaughlin, 1991; Cox y Balick, 1994; Cowan, 1999; Cutler y Cutler, 2000; Fyhrquist *et al.*, 2002).

El criterio etnomédico toma en cuenta el uso ancestral que se tiene de las plantas en las diversas medicinas tradicionales, tal información deriva de los estudios de campo realizados por botánicos y médicos especializados. Es de destacar que de las plantas estudiadas en los últimos 15 años, que fueron seleccionadas con este criterio, el 74 % de los compuestos derivados de estas plantas tienen alguna actividad farmacológica y esto es debido a que en su investigación se consideró sus antecedentes etnomédicos. Esta estrategia se basa en recolectar plantas teniendo conocimientos etnobotánicos y ayudados por médicos tradicionales que guían a la recolección de

plantas medicinales, esta estrategia ha sido objeto de varios ensayos para demostrar que la recolecta etnobotánica guiada proporciona un margen más alto de resultados óptimos que otras estrategias. La etnomedicina y la farmacología tradicional hoy en día ha conducido a la medicina moderna a obtener nuevos fitomedicamentos o fármacos medicinales con potencial de forma más exitosa (McLaughlin, 1991; Cox y Balick, 1994; Hostettmann *et al.*, 1995; Cowan, 1999; Cutler y Cutler, 2000; Heinrich, 2000; Cordero, 2002).

A pesar de que se ha demostrado que las plantas son fuente de compuestos terapéuticos útiles, la inmensa mayoría alrededor de un cuarto de millón, no han sido evaluadas en rastreos farmacológicos y estudios fitoquímicos biodirigidos. Considerando también que la distribución geográfica y taxonómica de aproximadamente 250,000 especies de plantas no es casual, la química de varias familias de plantas es significativamente diferente y nuestro presente estado de conocimiento de la biodiversidad química en las plantas es deficiente (McLaughlin, 1991; Cox y Balick, 1994; Hostettmann, 1995; Cowan, 1999; Cutler y Cutler, 2000; Heinrich, 2000; Cordero, 2002; Fyhrquist *et al.*, 2002).

El éxito de los programas para el descubrimiento de productos naturales de interés terapéutico requiere de varios componentes: conocimiento para la selección y recolección de plantas; una selectiva y efectiva selección de bioensayo para detectar cual extracto de planta contiene constituyentes bioactivos; una efectiva reproducción/propagación de las plantas y un eficiente proceso fitoquímico para aislar e identificar los productos bioactivos. Los programas actuales aspiran a descubrir nuevos compuestos bioactivos de fuentes naturales apoyados en la selección de especies mediante el criterio etnomédico y posterior evaluación farmacológica y de esta manera mejorar la velocidad del descubrimiento. Es por esto que para adquirir un conocimiento y significado en los trabajos actuales en la química de los productos naturales se han incorporado los bioensayos de manera rutinaria (McLaughlin, 1991; Cowan, 1999; Cutler y Cutler, 2000; Heinrich, 2000; Cordero, 2002; Fyhrquist *et al.*, 2002).

Lo anterior tiene más relevancia si se considera que más del 80 % de la población en los países en desarrollo dependen de plantas para sus necesidades de salud. La disminución de especies de plantas en el mundo debería ser preocupante para que los investigadores evalúen y conserven las plantas antes de que se extingan. En los países en desarrollo son pocas las personas calificadas para realizar este tipo de estudios, sin embargo se está empezando a enseñar y a capacitar al estudiante en este rubro (Heinrich, 2000; Cordell and Colvard, 2005).

En el caso de los rastreos de extractos de plantas con actividad antimicrobiana, son varios los ejemplos que demuestran que los vegetales son fuentes potenciales de nuevos compuestos antiinfecciosos, así tenemos que la artemisina, la glaucarubina, la benzoína y la emetina por mencionar algunos, fueron aislados de plantas usadas en las diversas medicinas tradicionales. Además del resurgimiento de enfermedades infecciosas y de la resistencia de muchos patógenos actualmente que son consideradas preocupaciones inmediatas y serias (McLaughlin, 1991; Hostettmann, 1995; Cowan, 1999; Cutler y Cutler, 2000; Heinrich, 2000; Weniger *et al.*, 2001; Fyhrquist *et al.*, 2002).

En este sentido la presente disertación aportará información química y farmacológica para el conocimiento de 26 plantas medicinales utilizadas en México, esta información será útil en el desarrollo de nuevos fitofármacos para el tratamiento de la diarrea y la disentería.

### **II.3 Generalidades de *Punica granatum* Linné.**

*Punica granatum* L. es un árbol cosmopolita, que pertenece a la familia Punicaceae, mide de 3 a 4 metros de alto, de madera dura y corteza escamosa, el tronco lo tiene retorcido, tiene muchas ramas delgadas con ramificaciones que generalmente terminan en espina, copa extendida y con mucho ramaje. Las hojas son simples, opuestas, teniendo un ápice obtuso, una base aguda, brillante y sin pelos, miden de 1 a 8 cm de largo por 0.5 a 2.5 cm de grosor. Las flores son vistosas, robustas, arrugadas, color escarlata, miden cerca de 3 cm de diámetro, nacen de 1 a 5 flores en la punta de la rama, florece en mayo-agosto. El fruto (Figura 4) es una baya con forma de globo, coronado por el cáliz, mide de 6 a 14 cm de diámetro, la cáscara o pericarpio del fruto es brillante y correosa. En su interior hay divisiones de entre 5 a 8 compartimientos que contienen pequeños sacos de jugo rojo o rosa de sabor ácido-dulce. En el interior de cada saco se encuentra una semilla triangular blanquecina de 6 mm de largo. La granada se propaga por semilla o por estaca en regiones semiáridas a subtropicales (Wickes y Uri, 1898; Martínez, 1979; Morton, 1981; Espinosa, 1994; House *et al.*, 1995; Rojas, 1999; Ross, 1999; Anónimo, 2000).

*P. granatum* es una planta originaria de Irán y Afganistán, es de distribución mundial, en México se le encuentra a todo lo largo de la República Mexicana. En las medicinas alternativas de diversas partes del mundo se le conoce con nombres variados (Tabla 4). En el caso de México sus nombres comunes son granado, granada y Zay yay (zapoteco) (Jafri *et al.*, 2000, Aguilar *et al.*, 1994; Ross, 1999; Martínez, 1979; Espinosa, 1994; House *et al.*, 1995; Morton, 1981).

En las prácticas médicas tradicionales del mundo varias son las partes de la planta que son usadas con fines curativos (Tabla 4). En el caso particular del pericarpio del fruto se emplea en diferentes preparados para tratar úlceras pépticas, lepra, inflamación, como abortivo, anticonceptivo, trastornos del tracto respiratorio, urinario y gastrointestinal. En el último caso se usa para tratar la diarrea, la disentería y como vermífugo.



**Figura 4.** Fruto de *Punica granatum* L.

Las flores y la cáscara del fruto se usan como astringentes y para descargas crónicas de moco, hemorragias pasivas, enfermedades de la boca, sudor de noche, diarrea y diabetes. Se le reporta el uso de las flores el uso en la diarrea crónica y disentería. A la corteza y a la cáscara del fruto la usan para la disentería, diarrea, almorranas, bronquitis, antihelmíntico y para problemas de la bilis (Das *et al.*, 1999). En el vademecum español se prescribe tomar una cucharada de cáscara desmenuzada del fruto, hervida durante 5 minutos en  $\frac{1}{4}$  de litro de agua y en México el tratamiento para la diarrea se basa en la decocción de la cáscara o pericarpio del fruto, la cual se toma tres veces al día durante tres días (Morton, 1981; House *et al.*, 1995; Guía, 1996; Vademecum, 1998; Ross, 1999; Jafriet *al.* , 2000).

**Tabla 4.** Nombres comunes, distribución, parte usada y usos de *P. granatum*.

Nombre común	Distribución	Parte usada	Usos
Apinkoya, Magraner, Manglano, Mingrana, Milingrandeira y Romazeira	España y Latino-América	Raíz y tronco Cáscara del fruto Fruto	Parasitosis intestinal. Diarrea, disentería e infecciones. Gripe, resfriados.
Dadima, Darim, Mathalanarakom, Pomegranate y Posnar	India	Raíz Fruto	Abortivo y antihelmíntico. Lepra, leucorrea, menorragia, úlceras pépticas, disentería y diarrea.
Granada, granado y Pomegranate	Argentina, Cuba, Guatemala, Perú, Honduras, México, Venezuela e Islas Canarias	Corteza del tronco Fruto  Jugo Raíz Flores	Úlceras, emenagogo, pulmón, disentería y diarrea. Antihelmíntico, detener el sangrado excesivo de la menstruación, enteritis, diarrea, infecciones del tracto respiratorio y urinario. Diarrea, disentería y antihelmíntico. Tenias y antihelmíntico. Inflamación garganta y enteritis.
Melograno, Qsur roman y Ranato	Italia	Cáscara del fruto	Inflamación
Mkoma manga	Este de África	Corteza de raíz	Antihelmíntico
Nar	Turquía	Corteza del tronco	Diarrea
Pomegranate, Roma y Romeira	Turquía, Egipto, Inglaterra, Nepal, EUA Grecia.	Cáscara del fruto Corteza de raíz y tallo	Anticonceptivo y traqueobronquitis. Ducha vaginal, diarrea, antihelmíntico y fiebre.
Roman	Egipto y Etiopía	Fruto Hojas Corteza de raíz	Lesiones piel. Antihelmíntico. Emenagogo
Shaḥ al-rumman	Arabia	Cáscara del fruto	Anticonceptivo
Thab thim	Tailandia	Raíz Cáscara de fruto	Antihelmíntico. Diarrea y disentería.

### II.3.1 Constituyentes químicos.

La cáscara del fruto tiene mucílagos; lignanos; caroteno; crisantemina; niacina; pectina; ácidos orgánicos (ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido málico, ácido oxálico, ácido pantoténico, ácido clorogénico, ácido neoclorogénico y ácido cumarínico); ácidos inorgánicos (ácido bórico); taninos (cianina, ácido elágico, malvidina, pelargonidina, punicalina y punicalagina); flavonoides (luteolina, quercetina y camperol) y azúcares (fructosa, glucosa y maltosa) (Wickes y Uri, 1898; Ross, 1999; van Elswijk *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2002).

De la corteza de la raíz se han aislado alcaloides (peletierina, metil-peletierina, isopeletierina y pseudopeletierina), taninos (ácido granatotánico y ácido galotánico), un terpeno (ácido ursólico) y un polialcohol (manitol) (Wickes y Uri, 1898; Rojas, 1999).

La corteza del tronco contiene taninos (ácido galotánico, ácido punicotánico, ácido elágico, ácido gálico, casuarina, casuarinina, pedunculagina, puniacorteina A-D, galoil punicalagina, punicalagina y punicalina); ácidos orgánicos (ácido betulínico y ácido punícico); un esteroide (sitosterol); un flavonoide (higrina); un triterpeno (friedelina), un polialcohol (manitol) y alcaloides (peletierina y derivados) (Wickes y Uri, 1898; Ross, 1999; El-Toumy y Rauwald, 2002; 2003).

Las hojas tienen alcaloides (piridina y estriquina); taninos (corilagina, galoilpunicalina, ácido elágico, granatina A y B); un terpeno (ácido ursólico); flavonoides (cianidina, delfinidina, glucósido de apigenina y glicósidos de luteolina) y un azúcar (manitol) (Rojas, 1999; Ross, 1999).

Las semillas contienen alcaloides (crisantemina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, icarisido D); lípidos (octadecatrienoil glicerol, isopentil-3-O-octadeca-2-enoil glicerol); ácidos grasos (ácido octadecenoico, ácido octadecanoico, ácido eicosanoico, ácido araquídico, ácido heneicosanoico, ácido nonanoico, ácido tricosanoico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido laúrico, ácido punícico, ácido linoléico y ácido palmítico); triterpenos (cumestrol, estradiol, estrona, estriol, daucosterol y estrona); flavonoides (cianina, cianidina, fenetil rutinósido, genisteina, delfina, delfinidina y pelargonidina, pelargonina), azúcares (manitol, fosfatidilinositol); dos glicósidos del ácido cinámico (coniferil 9-O[ $\beta$ -D-apiofuranosil(1 $\rightarrow$ 6)]-O- $\beta$ -D-glucopiranosido y sinapil 9-O[ $\beta$ -D-apiofuranosil(1 $\rightarrow$ 6)]-O- $\beta$ -D-glucopiranosido), dos taninos (ácido 3,3', 4'-tri-O-metil elágico y ácido 3,3', 4'-tri-O-metil elágico) (Rojas, 1999; Ross, 1999; Schubert *et al.*, 1999; Fatope *et al.*, 2000; Mori -Okamoto *et al.*, 2004; Kohno *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004).

Las flores contienen terpenos (ácido asiático, ácido estíptico y ácido maslínico) y flavonoides (glicósidos de delfinidina, glicósidos de pelargonidina y cianidina) (Ross, 1999).

En el jugo se ha reportado que contiene taninos (ácido elágico, derivados del glucurónido de metil éster del ácido elágico y punicalagina) (Cerdeira *et al.*, 2003, 2004; Seeram *et al.*, 2004)

### II.3.2 Propiedades farmacológicas.

A *P. granatum* se le ha demostrado las siguientes propiedades farmacológicas: antihelmínticas, tenífugas, antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antimicrobianas, astringentes, antidiarreicas, antidisentéricas, depurativas, inmunomoduladoras, ateroscleróticas, antiparasitarias, enfermedades periodontales, ahemostáticas, antitusivas, antipiréticas, anticancerígenas, antidiabéticas y antifertilidad (Rojas, 1999; Amorim *et al.*, 2003; Braga *et al.*, 2005; Jafri *et al.*, 2000; Van Elswijk *et al.*, 2004; Longtin, 2003; Machado *et al.*, 2002; Nair y Chanda, 2005)

A la planta entera de *P. granatum* se le demostró una alta efectividad contra *Escherichia coli* O157:H7 con CMI y CMB de 0.19 y 0.39 mg/ml, respectivamente (Voravuthikunchai *et al.*, 2004). El extracto inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *S. aureus* de este último también inhibe la actividad de su enterotoxina. El extracto fue efectivo en el 75 % de pacientes con estomatitis asociada con *Candida albicans* (Machado *et al.*, 2003; Braga *et al.*, 2005; Vasconcelos *et al.*, 2003; Nair y Chanda, 2005). Los extractos acetónico y clorofórmico mostraron actividad larvicida contra *Chrysomya aliceps* CL<sub>50</sub> de 25 ppm y 280 ppm, respectivamente (Morsy *et al.*, 1998). El extracto metanólico inhibe a la  $\alpha$ -amilasa y en ratas hembras los extractos metanólico y acuoso inhiben la fertilidad en un 70 y 90 % (Prashath *et al.*, 2001; Prakash *et al.*, 1985). El extracto acuoso en ratas Wistar mejora la biodisponibilidad del pertecnetato de sodio, isotópicamente marcado, en el bazo, corazón, estómago, hígado, intestino, páncreas, pulmón, fémur, riñones, cerebro, músculo y testículos (Prakash *et al.*, 1985; Amorim *et al.*, 2003).

La cáscara del fruto sirve contra fiebres intermitentes, para expulsar solitarias; tiene actividad *in vitro* contra *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *B. anthracis*, *Salmonella paratyphi*, *Vibrio cholerae*, *S. aureus*, *Candida krusei* y *C. tropicalis*, para las tres últimas con CMI de 63, 16 y 16  $\mu$ g/ml, respectivamente; a una dosis de 100 mg/kg en conejos estimula su sistema inmune y tiene actividad astringente (Wickes y Uri, 1898; Prashanth *et al.*, 2001 a; Ross *et al.*, 2001; Gracious *et al.*, 2001; Holetz *et al.*, 2002; Jafri *et al.*, 2000). El extracto tiene actividad contra el virus herpes genital (HSV-2), también inhibe a *S. aureus*, *E. coli* y *Aspergillus niger* cepas resistentes a penicilina G, tiene efecto inhibidor en células de proliferación de leucemia promielocítica de humano HL-60; en ratas disminuye el 76 % de las lesiones gástricas inducidas con etanol; reduce los signos de la periodontitis crónica disminuyendo la placa dentobacteriana;

es tóxico en ambos sexos del ratón OF-1 con dosis letales de 731 mg/kg; es inmunomodulador en conejos a dosis de 100 mg/kg (Zhang *et al.*, 1995; Anesini y Perez, 1993; Machado *et al.*, 2002; Kawaii y Lansky, 2004; Gharzouli *et al.*, 1999; Sastravaha *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2003). El extracto metanólico inhibe a *Proteus vulgaris* con CMI de 1.5 mg/ml; a *Vampirolepsis nana* la inhibe en un 55 % a concentraciones de 0.8 g/ml; disminuye úlceras gástricas en un 74 %; se demostró en ratas un efecto cicatrizante a dosis de 500 mg/kg y un efecto protector a dosis de 50 mg/kg; mostró actividad antioxidante del 83 y el 81 % a 50 ppm usando el linoleato de  $\beta$ -caroteno y el 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH), respectivamente; además mostró el 56, 58 y 94 % de inhibición usando el ácido tiobarbitúrico y por último se le demostró la actividad captadora del radical hidroxilo y la oxidación de la lipoproteína de baja densidad a 100 ppm (Prashanth *et al.*, 2001 b; Wickes y Uri, 1898; Ajaikumar *et al.*, 2005; Murthy *et al.*, 2004; Chindambara *et al.*, 2002; Singh, *et al.*, 2002). Al extracto acuoso se le demostró actividad antihelmíntica con una  $CI_{50}$  de 352  $\mu$ g/ml y también mostró actividad contra *S. typhi* y *V. cholerae* 01; inhiben un 79 y 80 % la actividad de la 17,  $\beta$ -hidroxi-esteroide deshidrogenasa tipo 1 y de la aromatasas, respectivamente, a concentraciones de 100 a 1,000  $\mu$ g/ml y tiene actividad estrogénica (Perez y Anesini, 1994; Guevara *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2002; van Elswijk *et al.*, 2004). Al extracto acetónico del fruto inhibe en un 70 % los tumores de piel en ratón CD-1 (Afaq *et al.*, 2005). El extracto etanólico mostró moderada actividad contra *Ascaris lumbricoides*; no es tóxico a los embriones de pollo y a ratas Wistar a dosis de 0.1 mg/embrión y 1.2 mg/kg, respectivamente; es tóxico a ratones de ambos sexos OF-1 con una  $DL_{50}$  de 731 mg/kg (Vidal *et al.*, 2003; Raj, 1975).

El extracto de las semillas en ratas diabéticas reducen en un 52 % los niveles de glucosa a dosis de 300 mg/kg; inhibe en un 44 % los adenocarcinomas colónicos a dosis de 0.01 % durante 32 semanas (Das *et al.*, 2001; Mori-Okamoto *et al.*, 2004; Jafri *et al.*, 2000; Gracious *et al.*, 2001). El aceite de las semillas en ratas macho F344, administrado al 1 % en aceite, inhibe hasta en un 56 % los tumores de colón inducidos por azoximetano a dosis de 100  $\mu$ g/ml y en un 75, 54 y 90 % la apoptosis de la línea celular de pecho humano de cáncer por MCF-7, estrógenos-independiente (MDA-MB-435) y estrógenos dependientes (MCF-7) a dosis de 10, 50 y 100  $\mu$ g/ml, respectivamente; en ratones CD1 hembras con tumores en la piel al administrar el 5 % de extracto redujo en un 17 % la actividad de la ornitina descarboxilasa que estimula a 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) (Kohno, 2004; Kim *et al.*, 2002; Hora *et al.*, 2003). El extracto inhibe a la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa hasta en un 44 y 81 %, respectivamente (Schubert *et*

*al.*, 1999). El extracto acetónico tiene actividad captadora de los radicales OH y O<sub>2</sub> en cerebros de ratas (Noda *et al.*, 2002). El extracto metanólico inhibe en un 23 % la oxidación del linoleato de β-caroteno y DPPH a dosis de 100 ppm (Singh *et al.*, 2002).

La corteza de la raíz posee propiedades astringentes, antihelmínticas y sirve para expulsar solitarias; inhibe la actividad de las enzimas acetil colinesterasa, fosfatasa alcalina, ATPasa y la deshidrogenasa láctica en el tejido nervioso de *Lymnaea acuminata* (Wickes y Uri, 1898; Jafri *et al.*, 2000; Gracious *et al.*, 2001; Tripathi *et al.*, 2004). La raíz a 100 µg/ml inhibe a *Entamoeba histolytica* y a *E. invadens*; tiene actividad antihelmíntica en ratones a dosis de 100 mg/kg dos veces al día por tres días elimina el 40 % de *Hymenolepis nana* (Segura *et al.*, 1990; Singhal, 1983). La corteza del tronco es letal a *Lymnaea acuminata* con una CL<sub>50</sub> de 22 mg/l (Jafri *et al.*, 2000; Tripathi *et al.*, 2000).

A la corteza de las ramas se le confiere actividad astringente, antihelmíntica y antibacteriana (Jafri *et al.*, 2000; Gracious *et al.*, 2001; Jiménez *et al.*, 1979).

Las flores reducen los niveles de glucosa en sangre de rata con una CI<sub>50</sub> de 1.8 mg/ml a dosis de 400 mg/kg (Jafri *et al.*, 2000; Gracious *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005).

El jugo de *Punica* administrado durante un año disminuye el espesor de la carótida en un 30 % y la presión sistólica en un 21 % en pacientes con aterosclerosis; es antioxidante en humanos y ratones; inhibe un 55 % la actividad estrogénica del 17 β-estradiol y el 47 % de la formación de lesiones cancerosas inducidas por el 7,12-dimetilbenzotreno (Aviram *et al.*, 2002; 2004; Cerda *et al.*, 2004; Seeram *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2002); inhibe la proliferación de células leucemia promielocítica de humano (HL-60) y la infección primaria del virus VIH-1 usando receptores de células CD4 y CXCR4 (Mori-Okamoto *et al.*, 2004; Kawaii y Lansky, 2004; Neurath, *et al.*, 2004). El vino de *Punica* es antioxidante en las células endoteliales vasculares (Schubert *et al.*, 2002).

Precauciones y contra indicaciones: Dosis grandes pueden causar nausea, mareos y vómito (Rojas, 1999; Arreche *et al.*, 1998).

### III. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la riqueza y la variedad de la flora medicinal mexicana, es bajo el porcentaje de las especies estudiadas desde un punto de vista fitoquímico y aún menor es la porción que ha sido objeto de evaluación biológica (Mata, 2002). En México las especies usadas para tratar trastornos gastrointestinales han ocupado el primer lugar de uso en los últimos años (Heinrich, 2000; Lozoya *et al.*, 1987). La preocupación por el conocimiento, uso y conservación de los recursos herbolarios es importante ya que un porcentaje elevado de la población recurre a la medicina tradicional para resolver sus problemas prioritarios de salud (Calzada, 2000; Mata, 2002). Por lo que es necesario realizar el estudio químico y farmacológico de nuestra herbolaria y de esta forma proporcionar la evidencia científica que permita su control de calidad y posterior desarrollo como fitofármacos y/o fuente de fármacos alternativos en nuestro sistema de salud. Adicionalmente las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud en México (SS, 2003).

En este trabajo se determinará el efecto antibacteriano de los extractos metanólicos y acuosos derivados de 26 especies de plantas y se seleccionará a una de las especies más activa, para demostrar científicamente las propiedades antibacterianas de la especie vegetal que se ha utilizado por décadas para tratar la diarrea y la disentería; además de que la planta puede ser una fuente potencial de fármacos y de estructuras prototipo. Con este proyecto se contribuirá al conocimiento de la flora medicinal de México, previniendo la pérdida del conocimiento tradicional de plantas medicinales, además aportará información nueva a científicos, doctores y estudiantes; promoviendo de esta forma el desarrollo tecnológico nacional e internacional y la formación de recursos humanos.

### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Después del cernimiento de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos y acuosos derivados de 26 especies vegetales se encontró que el extracto metanólico de *Punica granatum* fue uno de los de mejor actividad contra todas las cepas bacterianas empleadas. Considerando que a la fecha el extracto de la planta no ha sido objeto de estudios químicos y farmacológicos enfocados a demostrar sus propiedades antibacterianas contra cepas causantes de diarrea y disentería, se realizó el fraccionamiento y aislamiento de los constituyentes con propiedades antibióticas de *P. granatum* en el crecimiento bacteriano *in vitro*.

## V. OBJETIVO GENERAL

Determinar el potencial antibacteriano de 26 plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para tratar la diarrea y la disentería, posteriormente por discriminación del efecto farmacológico seleccionar a una de las especies más activas para realizar su estudio fitoquímico biodirigido y obtener los compuestos responsables de la actividad antibacteriana.

### V.1 Objetivos particulares.

Con la finalidad de dar cumplimiento al objetivo general se plantean los siguientes objetivos particulares.

V.1.1 Preparar los extractos metanólicos y acuosos de 26 especies vegetales selectas de la medicina tradicional de México.

V.1.2 Implementar la prueba para determinar la actividad antibacteriana de los extractos (metanólicos y acuosos), fracciones y/o compuestos puros.

V.1.3 Determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano *in vitro* de los extractos metanólicos y acuosos preparados a partir de las especies seleccionadas a una concentración de 8 mg/ml.

V.1.4 Seleccionar alguna de las especies con mejor actividad antibacteriana.

V.1.5 Realizar la investigación fitoquímica biodirigida de esta especie utilizando de nueva cuenta la prueba de monitoreo mencionada en el inciso V.1.2.

V.1.6 Establecer la estructura molecular de los compuestos con propiedades antibacterianas mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas, así como el empleo de métodos químicos.

V.1.7 Diseñar y realizar un estudio de relación estructura química actividad antibacteriana de ácidos fenólicos selectos de origen natural.

## VI. HIPÓTESIS

Si la información etnomédica existente en los bancos de datos referente a las plantas usadas en las prácticas médicas alternativas de México para el tratamiento de la diarrea y la disentería es verdadera, entonces el pericarpio del fruto de *Punica granatum* posee compuestos con actividad antibacteriana demostrables *in vitro* contra enterobacterias causantes de diarrea: ECEH 0157:H7, *Shigella sonnei* (2 cepas), *S. flexneri* (2 cepas), *Salmonella* sp (2 cepas) y *E. coli* ATCC 25922, los cuales se pueden aislar mediante un método fitoquímico biodirigido.

## VII. MATERIALES Y MÉTODO

### VII.1 Evaluación biológica.

#### VII.1.1 Enterobacterias.

Las cepas empleadas fueron: *Escherichia coli* enterohemorrágica 0157:H7, *Shigella sonnei* (dos cepas), *Shigella flexneri* (dos cepas), *Salmonella* sp (dos cepas) y como cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922. Todas las cepas se mantuvieron en refrigeración en medio agar Muller-Hinton (M-H) hasta su utilización. Las cepas patógenas fueron aislados clínicos de pacientes pediátricos con diarrea y fueron proporcionadas por la Unidad de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) (Torres *et al.*, 1995).

#### VII.1.2 Determinación de la actividad antibacteriana.

El ensayo utilizado para la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los diferentes extractos, fracciones y compuestos puros fue una adaptación del bioensayo descrito por Gavan y Barry (Lennette *et al.*, 1980).

Preparación del inóculo: para la prueba cada una de las ocho cepas de enterobacterias se sembraron en tubos de vidrio que contenían 5 ml de medio M-H caldo a 37 °C durante 4 horas con agitación constante, al término de este tiempo los cultivos se ajustaron con medio M-H caldo a una transmitancia de 0.5 Mc Farland que equivale a un inóculo de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml. Alícuotas de 50 µl de cada suspensión se transfirieron a los pozos de un replicador de Steers (con círculos de 3 mm de diámetro) calibrado para sembrar  $10^4$  UFC.

Preparación de las muestras: Las muestras a evaluar se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) al 1 % en medio M-H, de las muestras resultantes se transfirieron 200, 400, 800, 1600 µl a cuatro matraces Erlenmeyer de manera independiente y se llevaron a un aforo de 20 ml con medio agar M-H para obtener una concentración final de 1, 2, 4 y 8 mg/ml, respectivamente. En el caso de las fracciones y compuestos puros se realizaron las diluciones para poder evaluar las muestras a concentraciones menores (400, 300, 200 y 100 µg/ml). Posteriormente las muestras se adicionaron en cajas petri. Cada concentración se ensayó por duplicado y se repitió un mínimo de tres veces.

Las cajas petri conteniendo las muestras ya solidificadas, se sembraron con el inóculo contenido en el replicador de Steers que contiene las ocho cepas de enterobacterias. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Cada prueba incluyó cloranfenicol (Sigma) y trimetoprima (Sigma), como

controles positivos, un control (medio agar M-H, DMSO y enterobacterias) y un blanco (medio agar M-H y enterobacterias). Finalmente se determinó el halo de crecimiento en milímetros mediante medición directa con una regla y se calcularon los porcentajes de inhibición comparando con el control que se consideró como el 100 % de crecimiento. La concentración más alta en la cual no se detectó el crecimiento bacteriano se tomó como concentración mínima inhibitoria (CMI). El establecimiento de las concentraciones empleadas para evaluar a las muestras se realizó mediante análisis preliminares a distintas concentraciones obteniéndose así las concentraciones idóneas antes mencionadas.

## **VII.2 Selección y preparación del material vegetal.**

En la primera fase de la investigación se efectuó una preselección de 26 especies medicinales mexicanas, utilizando el criterio etnobotánico que toma en cuenta la información existentes sobre especies vegetales usadas para tratar la diarrea y la disentería en estudios de campo realizados por etnobotánicos, entrevistas con los médicos tradicionales y una exhaustiva revisión bibliográfica en los bancos de datos informáticos y de bibliotecas principalmente.

La recolección de las plantas se realizó en diferentes partes de la República Mexicana. La parte del material vegetal recolectada corresponde a la utilizada en las prácticas médicas populares, de las especies *Geranium mexicanum* se recolectaron las partes aéreas y la raíz; para el caso de *Ch. ambrosoides* se recolectaron las variedades de color verde y roja. Cantidades suficientes del material seco se recolectaron para obtener un mínimo de 20 g. Los 28 ejemplares de referencia se depositaron en el Herbario (IMSSM) del IMSS (Tabla 5).

## **VII.3 Extracción.**

### **VII.3.1 Preparación de los extractos vegetales metanólicos y acuosos en pequeña escala.**

Para la selección de la especie con potencial antibacteriano, se prepararon los extractos metanólicos y acuosos a partir de 20 g de material vegetal seco y molido de cada una de las 26 especies seleccionadas. En el primer caso la extracción se realizó por maceración con 300 ml de metanol por dos ocasiones a intervalos de una semana, a los extractos resultantes se les eliminó el disolvente por destilación a presión reducida hasta obtener extractos metanólicos a peso constante. En el segundo caso, la extracción se hizo por decocción del material vegetal con 300 ml de agua por 30 minutos, la eliminación del agua se hizo por liofilización o a presión reducida

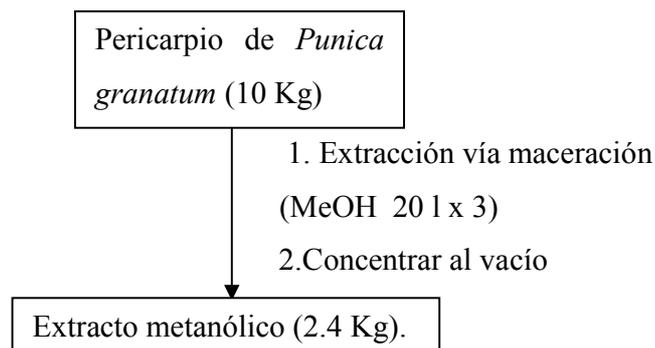
hasta obtener los extractos acuosos. En ambos casos los 56 extractos resultantes se colocaron en frascos viales y en refrigeración a -4 °C hasta su evaluación.

### VII.3.2 Preparación del extracto metanólico del pericarpio de *Punica granatum* L en gran escala.

Con base en los resultados obtenidos en la evaluación antibacteriana, del grupo de plantas activas se seleccionó a la especie *Punica granatum* como la mejor para realizar su fraccionamiento biodirigido.

El material vegetal (cáscara del fruto o pericarpio) utilizado en este estudio fue adquirido en el mercado de la delegación de Tláhuac por el Dr. Fernando Calzada Bermejo. La identificación botánica la realizó la M. en C. Abigail Aguilar Contreras y un ejemplar de referencia se depositó en el herbario IMSSM.

El material vegetal se desecó a temperatura ambiente y posteriormente se molió en un molino Tor-Rey, después se procedió a la extracción de 10 Kg de material vegetal. El extracto metanólico se obtuvo por maceración a intervalos de una semana por tres veces con 20 l de metanol en cada ocasión. El extracto resultante se concentró al vacío, después de este proceso se obtuvieron 2.4 Kg de un residuo de color café rojizo (Esquema 1), al cual se le determinó su actividad antibacteriana (ver tablas 7, 8 y 10).



**Esquema 1.** Obtención del extracto metanólico del pericarpio de *Punica granatum*.

**Tabla 5.** Especie botánica, familia, nombre común, voucher, parte recolectada y usos de las 26 especies recolectadas.

Especie botánica/(Familia) Nombre común/Voucher	Parte recolectada	Usos
<i>Allium sativum</i> (Liliaceae) Ajo/14396	Epidermis del bulbo	Dolor de estómago y disentería
<i>Aloysia triphylla</i> (Verbenaceae) Cedrón/126110	Partes aéreas	Dolor de estómago y diarrea
<i>Annona cherimola</i> (Annonaceae) Chirimolla/14401	Semillas	Diarrea, disentería y parásitos
<i>Artemisia absinthium</i> (Asteraceae) Ajenjo/12609	Partes aéreas	Dolor de estómago, cólicos y parásitos
<i>Artemisia ludoviciana</i> (Asteraceae) Estafiate/1409	Partes aéreas	Dolor de estómago, diarrea, disentería y cólicos
<i>Bocconia frutescens</i> (Papaveraceae) Gordolobo de Campo/12618	Partes aéreas	Dolor de estómago y disentería
<i>Caesalpinia pulcherrima</i> (Leguminosae) Tabachín/13591	Partes aéreas	Dolor de estómago, disentería y cólicos
<i>Carica papaya</i> (Caricaceae) Papaya/14397	Semillas	Diarrea y parásitos
<i>Chenopodium ambrosioides</i> (Chenopodiaceae) Epazote (verde/14402 y rojo/14395)	Partes aéreas	Dolor de estómago, diarrea y parásitos
<i>Chenopodium murale</i> (Chenopodiaceae) Epazote nechquelite/13592	Partes aéreas	Disentería
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i> (Sterculiaceae) Flor de Manita/14404	Flor	Disentería
<i>Chrysactinia mexicana</i> (Asteraceae) San Nicolás/14407	Partes aéreas	Diarrea
<i>Cocos nucifera</i> (Palmae) Coco/14398	Exocarpio del fruto	Parásitos y disentería
<i>Dichondra argentea</i> (Convolvulaceae) Oreja de Ratón/0103m	Partes aéreas	Diarrea
<i>Dorstenia contrajerva</i> (Moraceae) Contrahierba/14406	Partes aéreas	Dolor de estómago, disentería y cólicos
<i>Geranium mexicanum</i> (Geraniaceae) Pata de León/14405	Partes aéreas y raíz	Dolor de estómago, diarrea y disentería
<i>Hippocratea excelsa</i> (Hippocrateaceae) Cancerina/14394	Raíz	Dolor de estómago y cólico
<i>Lippia alba</i> (Verbenaceae) Mirto/14146	Partes aéreas	Diarrea y dolor de estómago
<i>Lygodium venustum</i> (Schizaeaceae) Papatepanzole/13270	Partes aéreas	Diarrea y disentería
<i>Matricaria recutita</i> (Asteraceae) Manzanilla/14399	Partes aéreas	Dolor de estómago, disentería y diarrea
<i>Ocimum basilicum</i> (Labiatae) Albahacar/14393	Partes aéreas	Dolor de estómago y cólicos
<i>Punica granatum</i> (Punicaceae) Granada/14403	Pericarpio del fruto	Diarrea, disentería y parásitos
<i>Ruta chalepensis</i> (Rutaceae) Ruda/14400	Partes aéreas	Dolor de estómago, cólicos y parásitos
<i>Schinus molle</i> (Anacardiaceae) Pirul/14408	Partes aéreas	Dolor de estómago
<i>Senna villosa</i> (Leguminosae) Tsalché/14410	Partes aéreas	Cólicos
<i>Thymus vulgaris</i> (Lamiaceae) Tomillo/13594	Partes aéreas	Dolor de estómago

## VII.4 Fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico.

### VII.4.1 Material cromatográfico.

La cromatografía de adsorción en columna abierta se realizó sobre gel de sílice, Kieselgel 60 Merck (tamaño de partícula, 0.063-0.200 mm, 70-230 mesh ASTM). La cromatografía de filtración por gel en columna abierta se realizó sobre Sephadex G10 (Sigma). Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF), tanto analíticos como preparativos se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio o aluminio recubiertas de fase reversa C-18 (HPTLC-Fertigplatten RP-18 F<sub>254</sub> s für die Nano-DC) y/o sílica gel (Sílica gel 60 F<sub>254</sub> Merck), además de varios eluyentes. Los agentes cromógenos utilizados para revelar los compuestos se incluyen en la tabla 6 y también se visualiza con luz ultravioleta (UV).

**Tabla 6.** Agentes cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

Agente cromógeno	Composición	Referencia
Vainillina	vainillina etanólica al 1 % ácido sulfúrico etanólico al 5 %.	Wagner <i>et al.</i> , 1984.
Dragendorff	2.6 g carbonato de bismuto básico 7 g yoduro de sodio 25 ml ácido acético glacial 89 ml acetato de etilo 0.5 ml agua.	Stahl, 1969.
Sulfato Cérico	12 g sulfato cérico 22.2 ml ácido sulfúrico concentrado 350 g hielo.	Stahl, 1969.
Tricloruro de fierro	tricloruro de fierro-acuoso al 10 %.	Wagner <i>et al.</i> , 1984.

Para el desarrollo de color es necesario calentar durante dos minutos a 110 °C.

### VII.4.2 Fraccionamiento biodirigido.

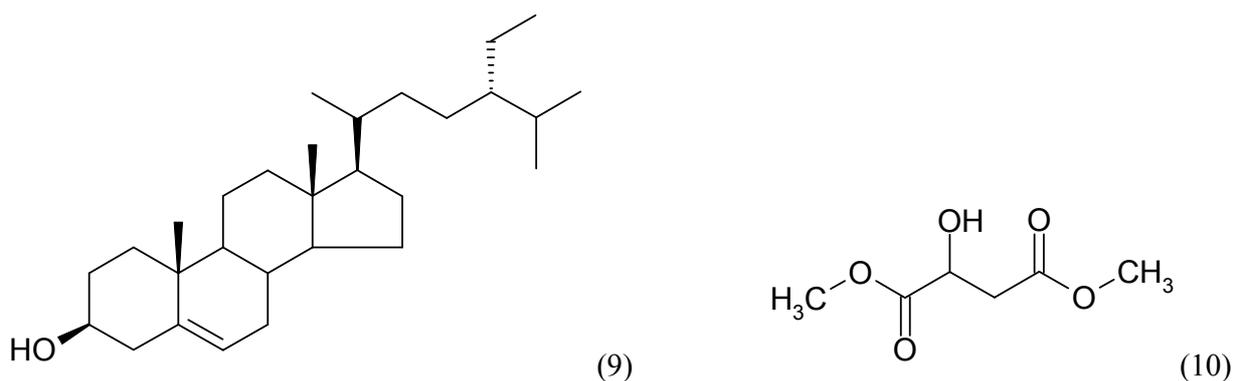
Una parte del extracto metanólico (1.5 Kg) se sometió a un fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria sílica gel (2 Kg) y como eluyentes CHCl<sub>3</sub>:MeOH. Se obtuvieron un total de 120 fracciones (500 ml c/u) reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica y así obtener once fracciones primarias: FP1/FP11.

En la tabla 7 se resume el fraccionamiento primario y se incluyen el eluyente empleado, la proporción del disolvente (s), el número de fracciones y fracciones combinadas.

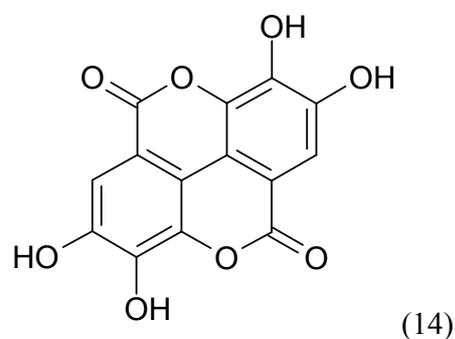
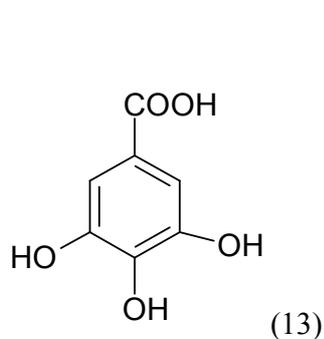
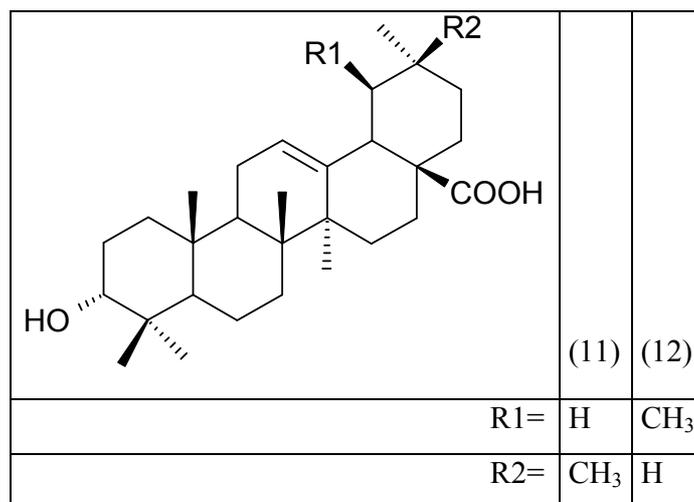
**Tabla 7.** Resumen del fraccionamiento primario del extracto metanólico de *P. granatum*.

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Fracciones combinadas
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	(90:10)	1-31	FP1 (1-9) FP2 (10 15) FP3 (16-26) FP4 (27 31)
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	(80:20)	32-74	FP5 (32 34) FP6 (35) FP7 (36 57) FP8 (58 72)
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	(70:30)	75-96	FP9 (73 81) FP10 (82)
CHCl <sub>3</sub> :MeOH	(60:40)	97-120	FP11 (83-120)

De la fracción primaria FP2 cristalizó espontáneamente el  $\beta$  sitosterol (9). De la fracción primaria FP3 se obtuvo el 1,4-dimetil malato (10), el ácido ursólico (11) y el ácido oleanólico (12). De la fracción primaria FP9 se obtuvo al ácido gálico (13) y de la fracción primaria FP11 se obtuvo al ácido elágico (14).



**Figura 5.** Estructuras de los compuestos aislados del fraccionamiento biodirigido primario del extracto metanólico del pericarpio de *P. granatum*.



**Figura 5.** Estructuras de los compuestos aislados del fraccionamiento biodirigido primario del extracto metanólico del pericarpio de *P. granatum*.

Una parte de la fracción primaria activa FP7 (8 g) se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta, empleando como fase estacionaria sílica gel (62 g) y como eluyentes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH. Se obtuvieron un total de 988 fracciones (50 ml c/u) reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica hasta obtener así 17 fracciones secundarias: FS1/FS17. En la tabla 8 se resume el fraccionamiento secundario y se incluyen los eluyentes empleados, el número de fracciones y fracciones combinadas.

Las fracciones secundarias FS1 (1.5 g), FS8 (1 g) y FS12 (0.87 g), cada una por separado, se sometieron a un fraccionamiento terciario por cromatografía en columna abierta.

**Tabla 8.** Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción primaria FP7.

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Fracciones combinadas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	(99.5:0.5)	1-394	FS1 (1-15) FS2 (16-26) FS3 (27-38) FS4 (39-62) FS5 (63-82) FS6 (83-132) FS7 (133-165) FS8 (166-206) FS9 (207-244) FS10 (245-331) FS11 (332-398)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	(80:20) (70:30) (60:40)	395-790 791-884 885-988	FS12 (399-422) FS13 (423-454) FS14 (455-516) FS15 (517-573) FS16 (574-645) FS17 (646-988)

En el caso de la fracción FS1 se empleó sílica gel (46 g) y como eluyentes hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:acetona. Se obtuvieron un total de 181 fracciones (20 ml c/u) reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica para obtener así 2 fracciones terciarias: FT1 a la FT2. En la tabla 9 se resume el fraccionamiento terciario y se incluyen los eluyentes empleados, la proporción del disolvente (s), el número de fracciones y fracciones combinadas. De la fracción terciaria activa FTI se obtuvo la mezcla de seis ésteres metílicos de ácidos grasos: araquidato de metilo (15), behenato de metilo (16), estearato de metilo (17), hexacosanoato de metilo (18), linoleato de metilo (19) y palmitato de metilo (20).

**Tabla 9.** Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción secundaria FS1.

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Fracciones combinadas
Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	(90:10)	1-151	FT1 (1-143)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	(100)	152 171	FT2 (144-181)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :Acetona	(50:50)	172 178	FT2 (144-181)
Acetona	(100)	179 181	FT2 (144-181)

En la fracción secundaria FS8 se utilizó sílica gel (150 g) y como eluyentes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:AcOEt. Obteniéndose un total de 422 fracciones (20 ml c/u) reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica y así obtener 2 fracciones terciarias: FTI a la FTII. En la tabla 10 se resume el fraccionamiento terciario de la fracción FS8 y se incluyen los eluyentes empleados, la proporción del disolvente (s), el número de fracciones y las fracciones combinadas. De la fracción terciaria FTI se separó al metil galato (21).

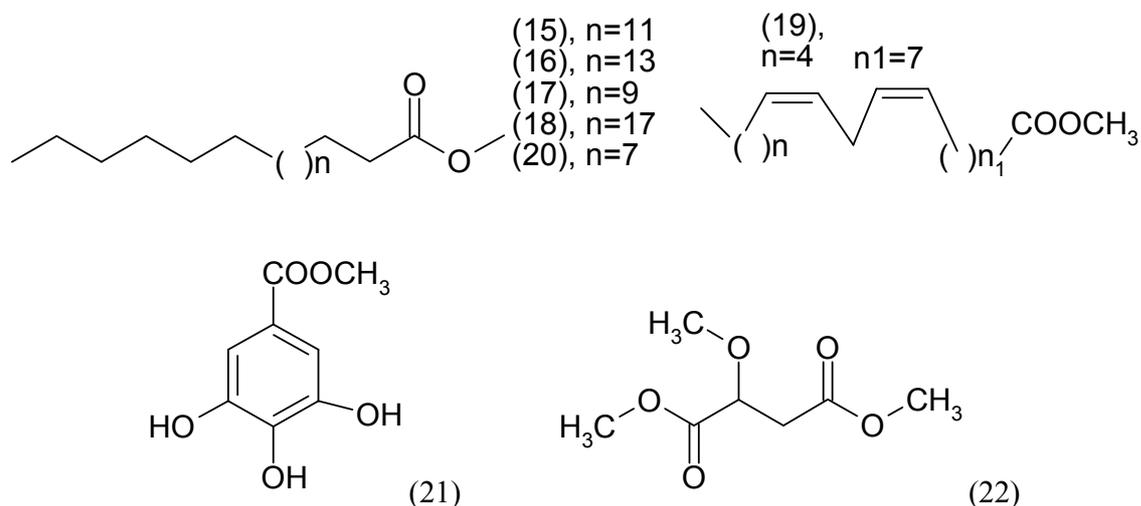
**Tabla 10.** Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción secundaria FS8.

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Fracciones combinadas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	(100)	1-49	FT I (1-183)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt	(99:1)	50-157	FT I (1-183)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt	(97:3)	158 183	FT I (1-183)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt	(96:4)	184 234	FT II (184-422)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt	(95:5)	235 276	FT II (184-422)
AcOEt	(100)	277 422	FT II (184-422)

En el caso de la fracción secundaria FS12 (0.87 g) se empleo sílica gel (150 g) y como eluyentes hexano:AcOEt:MeOH, obteniéndose un total de 395 fracciones (20 ml c/u) reuniéndose aquellas que mostraron similitud cromatográfica para así obtener 6 fracciones terciarias: FTi a la FTvi. En la tabla 11 se resume el fraccionamiento terciario y se incluyen los eluyentes empleados, la proporción del disolvente (s), el número de fracciones y las fracciones combinadas. De la fracción terciaria FTi se separó al trimetil malato (22).

**Tabla 11.** Resumen del fraccionamiento terciario de la fracción secundaria FS12.

Eluyente	Proporción	Número de fracciones	Fracciones combinadas
Hexano	(100)	1-42	FT i (1-119)
Hexano :AcOEt	(80:20)	43-108	
Hexano:AcOEt	(60:40)	109 217	FT ii (120-134) FT iii (135-217)
AcOEt	(100)	218 288	FT iv (218-230)
AcOEt:MeOH	(90:10)	289 28	FT v (231-258)
AcOEt	(100)	329 395	FT vi (259-395)



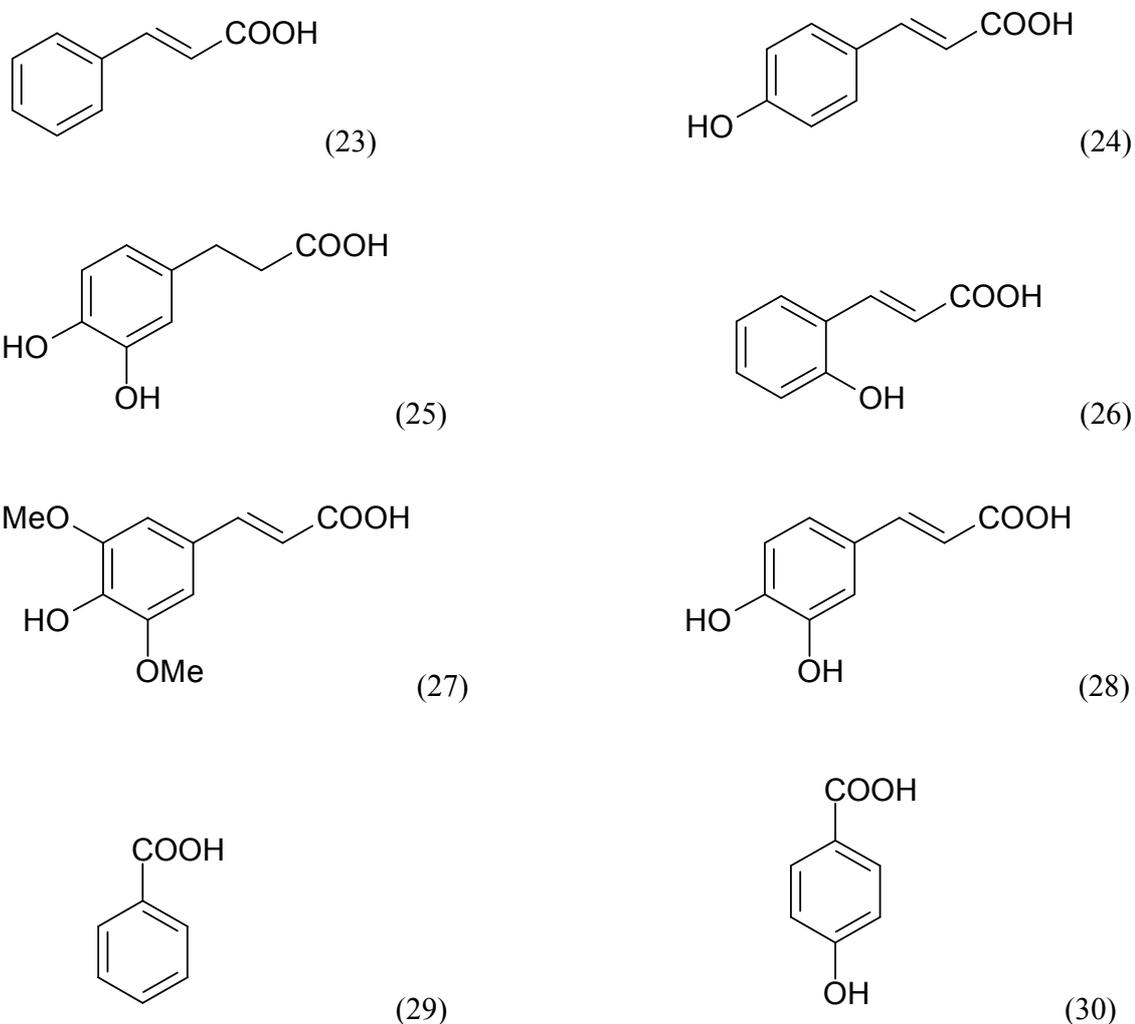
**Figura 6.** Estructuras de los compuestos aislados del fraccionamiento biodirigido secundario y terciario del extracto metanólico del pericarpio de *P. granatum*.

### VII.5 Compuestos fenólicos utilizados para el estudio relación estructura química actividad antibacteriana.

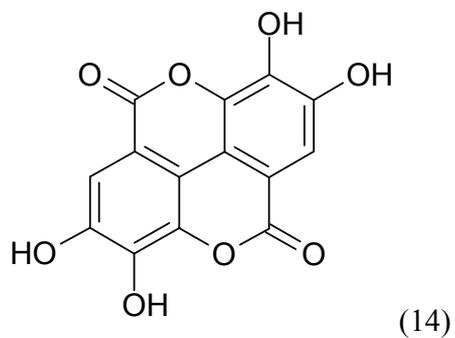
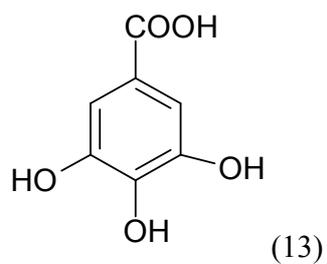
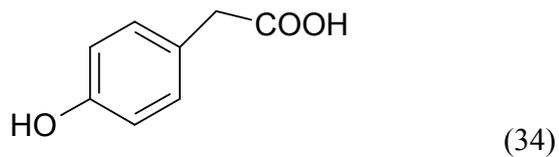
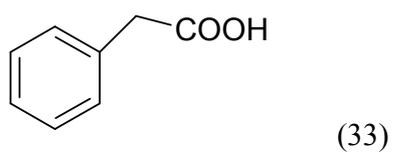
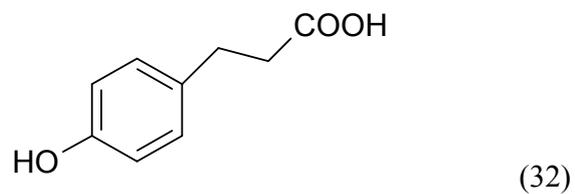
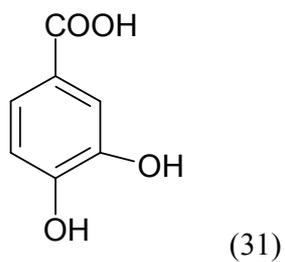
Considerando que del estudio fitoquímico biodirigido del pericarpio del fruto de *Punica granatum* uno de los compuestos con mejor actividad antibacteriana fue un fenol simple (metil galato), se decidió realizar un estudio relación estructura química actividad antibacteriana con 14 ácidos fenólicos de origen natural. Las cepas de enterobacterias empleadas fueron las mismas del estudio fitoquímico biodirigido.

Los compuestos fenólicos seleccionados para el estudio fueron adquiridos comercialmente (Sigma y Aldrich). Los compuestos difieren en el número, naturaleza y localización de los sustituyentes oxigenados y la cadena lateral sobre el anillo aromático.

Los compuestos que se evaluaron son: el ácido *trans*-cinámico (23), el ácido 4'-hidroxi-*trans*-cinámico (24), el ácido 2,3-dihidro-3',4'-dihidroxi-cinámico (25), el ácido 2'-hidroxi-cinámico (26), el ácido sinápico o ácido 3',5'-dimetoxi-4'-hidroxi-cinámico (27), el ácido cafeico o ácido 3',4'-dihidroxi-cinámico (28), el ácido benzoico (29), el ácido 4-hidroxi-benzoico (30), el ácido 3,4-dihidroxi-benzoico (31), el ácido 2,3-dihidro-4'-hidroxi-cinámico (32), el ácido fenilacético (33), el ácido 4'-hidroxi-fenilacético (34), el ácido gálico (13) y el ácido elágico (14).



**Figura 7.** Estructuras de los compuestos fenólicos usados en el estudio relación estructura química actividad antibacteriana.



**Figura 7.** (Continuación) Estructuras de los compuestos fenólicos usados en el estudio relación estructura química actividad antibacteriana.

## VIII. RESULTADOS

Los resultados de la presente disertación se dividen en tres partes. La primera parte comprende los resultados de la actividad antibacteriana obtenidos del cernimiento de 56 extractos derivados de 26 plantas medicinales. La segunda parte incluye el estudio fitoquímico biodirigido del pericarpio del fruto de *Punica granatum*. Por último la tercera parte se refiere al estudio de la relación estructura química actividad antibacteriana de 14 ácidos fenólicos.

### VIII.1 Resultados de la actividad antibacteriana de los 56 extractos derivados de las 26 especies vegetales.

En la primera fase de la investigación se prepararon 28 extractos metanólicos y 28 extractos acuosos a partir de 26 plantas medicinales preseleccionadas mediante el criterio etnobotánico. A los 56 extractos resultantes se les determinó su potencial antibacteriano mediante la evaluación de su efecto *in vitro* sobre enterobacterias causantes de diarrea a concentraciones de 8, 4, 2 y 1 mg/ml. Encontrándose que a la concentración de 8 mg/ml se observó el mejor efecto por lo que en las tablas 13 y 14 se muestran los resultados expresados en porcentajes de inhibición a esta concentración.

De los extractos metanólicos y acuosos que tuvieron un porcentaje de inhibición del 100 % solo a cuatro se le pudieron determinar su concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para la cepa de *S. flexneri* (Tabla 12).

**Tabla 12.** Concentraciones mínimas inhibitorias de cuatro extractos con actividad inhibitoria contra *Shigella flexneri*.

Extracto	<i>Shigella flexneri-1</i>	<i>Shigella flexneri-2</i>
<i>Punica granatum</i> (M)	1.5 mg/ml	1.5 mg/ml
<i>Geranium mexicanum</i> PA (M)	2 mg/ml	2 mg/ml
<i>Punica granatum</i> (A)	1.5 mg/ml	1.5 mg/ml
<i>Geranium mexicanum</i> R (A)	4 mg/ml	4 mg/ml

M= metanólico, A= acuoso, PA= partes aéreas, R= raíz.

**Tabla 13.- Resultados de la actividad antibacteriana de los 28 extractos metanólicos.**

Especies botánicas	% de inhibición a 8 mg/ml							
	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Allium sativum</i>	24	1	35	18	0	0	0	0
<i>Aloysia triphylla</i>	21	0	6	0	11	29	18	0
<i>Annona cherimola</i>	9	0	15	4	0	0	0	0
<i>Artemisia absinthium</i>	52	33	40	29	33	46	29	25
<i>Artemisia ludoviciana</i>	46	13	33	29	33	64	25	13
<i>Bocconia frutescens</i>	54	34	59	55	41	37	15	22
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	39	33	47	33	100	41	29	25
<i>Carica papaya</i>	39	6	25	24	26	52	29	6
<i>Chenopodium ambrosoides</i> <sup>v</sup>	39	22	32	14	25	29	29	16
<i>Chenopodium ambrosoides</i> <sup>r</sup>	46	8	37	21	14	21	13	0
<i>Chenopodium murale</i>	41	3	27	14	0	15	13	0
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	57	59	73	71	43	52	50	50
<i>Chrysactinia mexicana</i>	46	0	33	21	29	100	0	0
<i>Cocos nucifera</i>	46	47	62	50	26	41	41	38
<i>Dichondra argentea</i>	15	0	9	0	0	17	6	0
<i>Dorstenia contrajerva</i>	35	0	33	37	14	36	6	0
<i>Geranium mexicanum</i> <sup>PA</sup>	57	69	60	57	100	100	25	25
<i>Geranium mexicanum</i> <sup>R</sup>	14	18	47	43	29	100	25	13
<i>Hippocratea excelsa</i>	52	56	66	57	33	46	53	56
<i>Lippia alba</i>	30	0	27	15	29	28	19	0
<i>Lygodium venustum</i>	46	28	13	7	29	39	13	13
<i>Matricaria recutita</i>	19	0	33	18	4	6	0	0
<i>Ocimum basilicum</i>	35	6	70	58	43	53	44	38
<i>Punica granatum</i>	57	59	70	64	100	100	52	50
<i>Ruta chalepensis</i>	21	0	17	0	0	29	0	0
<i>Schinus molle</i>	21	0	21	5	0	29	24	13
<i>Senna villosa</i>	27	0	16	0	17	0	0	0
<i>Thymus vulgaris</i>	100	100	67	100	100	100	100	100
Cloranfenicol	15	10	12	26	13	9	5	0
Trimetoprima	100	100	52	29	100	100	100	100

Promedio (n=6). A: *E. coli* ATCC 25922, B: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) 0157:H7, C: *Shigella sonnei*-1, D: *S. sonnei*-2, E: *S. flexneri*-1, F: *S. flexneri*-2, G: *Salmonella* sp-1 and H: *S. sp*-2, <sup>PA</sup> (partes aéreas), <sup>R</sup> (raíz). <sup>r,v</sup>variedad (v=verde/r=rojo).

**Tabla 14.**-Resultados de la actividad antibacteriana de los 28 extractos acuosos.

Especies Botánicas	% de inhibición a 8 mg/ml							
	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Allium sativum</i>	0	20	20	24	8	0	0	0
<i>Aloysia triphylla</i>	0	7	24	2	0	0	0	0
<i>Annona cherimola</i>	0	7	8	0	0	0	0	0
<i>Artemisia absinthium</i>	0	20	28	11	17	12	0	0
<i>Artemisia ludoviciana</i>	0	20	4	0	17	0	4	0
<i>Bocconia frutescens</i>	0	27	24	11	8	0	4	0
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	30	47	68	64	33	36	41	28
<i>Carica papaya</i>	0	20	4	2	0	4	0	0
<i>Chenopodium ambrosoides</i> <sup>v</sup>	0	13	20	16	0	4	0	0
<i>Chenopodium ambrosoides</i> <sup>r</sup>	0	33	20	11	8	20	0	0
<i>Chenopodium murale</i>	0	11	12	2	17	4	0	0
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	39	60	76	73	50	52	56	52
<i>Chrysactinia mexicana</i>	0	20	100	11	100	100	0	19
<i>Cocos nucifera</i>	39	47	60	56	33	36	33	20
<i>Dichondra argentea</i>	0	13	12	2	0	0	0	0
<i>Dorstenia contrajerva</i>	0	27	12	0	0	0	4	4
<i>Geranium mexicanum</i> <sup>PA</sup>	8	33	52	47	100	100	26	28
<i>Geranium mexicanum</i> <sup>R</sup>	54	60	76	73	100	100	56	52
<i>Hippocratea excelsa</i>	23	47	60	56	33	36	33	28
<i>Lippia alba</i>	0	20	48	24	17	12	4	0
<i>Lygodium venustum</i>	0	27	0	0	0	0	0	0
<i>Matricaria recutita</i>	7	32	15	1	11	6	0	6
<i>Ocimum basilicum</i>	0	33	36	24	33	36	19	12
<i>Punica granatum</i>	39	47	68	64	100	100	48	36
<i>Ruta chalepensis</i>	0	33	12	0	0	4	2	0
<i>Schinus molle</i>	8	47	40	29	33	20	11	4
<i>Senna villosa</i>	0	20	28	11	17	4	0	0
<i>Thymus vulgaris</i>	8	33	44	11	100	0	4	0
Cloranfenicol	10	15	12	26	12	8	5	0
Trimetoprima	100	100	52	29	100	100	100	100

Promedio (n=6). A: *E. coli* ATCC 25922, B: EHEC 0157:H7, C: *Shigella sonnei*-1, D: *S. sonnei*-2, E: *S. flexneri*-1, F: *S. flexneri*-2, G: *Salmonella* sp-1 and H: *S. sp*-2, <sup>PA</sup> (partes aéreas), <sup>R</sup> (raíz). <sup>r,v</sup> variedad (v=verde/r=rojo).

### VIII.2 Resultados de la actividad antibacteriana del extracto metanólico, del fraccionamiento y de los compuestos puros del pericarpio de *P. granatum*.

Las propiedades antibacterianas del extracto metanólico se determinaron a gran escala (Tabla 14), los resultados se muestran a las concentraciones de 8 mg/ml, empleándose las cepas enteropatógenas mencionadas en la prueba biológica inciso VII.1.1.

Del proceso de fraccionamiento del extracto metanólico se obtuvieron 11 fracciones primarias, 17 fracciones secundarias y 10 fracciones terciarias. En la tabla 15 se muestran los rendimientos y los porcentajes de inhibición del extracto metanólico de *P. granatum* y de las fracciones primarias (FP1 a la FP11). Estos resultados se muestran a la concentración de 8 mg/ml y se expresan en porciento de inhibición.

**Tabla 15.** Resultados de la actividad antibacteriana y rendimiento del extracto metanólico y de las fracciones primarias obtenidas a partir del extracto metanólico de *P. granatum*.

Muestra/ Rendimiento en g	Actividad antibacteriana (% de inhibición a 8 mg/ml)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>P. granatum</i>	57	59	70	64	100	100	52	50
FP1 / 7.0	62	49	55	21	36	25	49	37
FP2 / 2.7	15	23	13	21	00	04	16	20
FP3 / 9.3	32	46	51	24	25	11	35	20
FP4 / 7.6	22	50	41	31	19	04	35	20
FP5 / 10.8	41	52	44	35	14	25	39	31
FP6 / 3.0	28	54	48	31	00	18	39	25
FP7 / 43.7	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>49</b>	<b>25</b>
FP8 / 46.3	15	46	23	14	09	04	25	00
FP9 / 21.2	36	50	44	31	46	25	25	20
FP10 / 6.2	33	50	41	21	36	32	53	20
FP11 / 24.0	53	62	44	35	36	25	44	31

1=*Ec* ATCC 25922, 2=*EHEC* 0157:H7, 3=*Shigella sonnei*-1, 4= *S. s*-2 , 5=*S. flexneri*-1, 6=*S. f*-2 , 7=*Salmonella* sp-1, 8=*S. sp*-2.

En la tabla 16 se muestran los resultados en porcentajes de inhibición de las fracciones secundarias (FS1a la FS17) y de la fracción primaria FP7, a concentraciones de 400 µg/ml y 8 mg/ml, respectivamente.

**Tabla 16.** Resultados de la actividad antibacteriana y rendimiento de las fracciones secundarias obtenidas a partir de la fracción primaria FP7.

Fracción Secundaria/ Rendimiento en g (concentración)	Actividad antibacteriana (% de inhibición)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
FP7 / 43 (8 mg/ml)	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>49</b>	<b>25</b>
<b>FS1 / 1.53</b> (400 µg/ml)	<b>36</b>	<b>54</b>	<b>69</b>	<b>70</b>	<b>51</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>44</b>
FS2 / 4.67 (400 µg/ml)	11	35	43	32	51	39	18	16
FS3 / 1.46 (400 µg/ml)	24	26	14	17	47	39	11	30
FS4 / 0.53 (400 µg/ml)	17	26	29	25	43	28	04	02
FS5 / 0.57 (400 µg/ml)	17	40	45	43	47	33	18	16
FS6 / 1.49 (400 µg/ml)	34	20	12	12	31	09	28	08
FS7 / 1.74 (400 µg/ml)	30	30	32	23	39	09	24	19
<b>FS8 / 1.06</b> (400 µg/ml)	<b>43</b>	<b>49</b>	<b>57</b>	<b>62</b>	<b>55</b>	<b>39</b>	<b>25</b>	<b>30</b>
FS9 / 0.74 (400 µg/ml)	00	12	14	13	31	18	04	02
FS10 / 2.08 (400 µg/ml)	04	35	26	21	15	28	18	16
FS11 / 1.30 (400 µg/ml)	30	30	29	40	43	28	11	16
<b>FS12 / 0.87</b> (400 µg/ml)	<b>23</b>	<b>44</b>	<b>41</b>	<b>32</b>	<b>51</b>	<b>44</b>	<b>18</b>	<b>16</b>
FS13 / 4.87 (400 µg/ml)	36	26	53	55	35	39	18	16
FS17 / 7.69 (400 µg/ml)	00	00	17	06	19	00	00	00
FS18 / 2.65 (400 µg/ml)	04	00	00	00	00	00	00	00
FS19 / 1.31 (400 µg/ml)	11	00	00	00	08	14	33	33

1=*Ec* ATCC 25922, 2=*EHEC* 0157:H7, 3=*Shigella sonnei*-1, 4=*S. s*-2, 5=*S. flexneri*-1, 6=*S. f*-2, 7=*Salmonella* sp-1, 8=*S. sp*-2.

En la tabla 17 se muestran los resultados en porcentajes de inhibición de la evaluación de las fracciones terciarias obtenidas de las fracciones secundarias FS1 (FT1 y FT2), a la concentración de 200 µg/ml.

**Tabla 17.** Resultados de la actividad antibacteriana y rendimiento de las fracciones terciarias obtenidas a partir de la fracción secundaria FS1.

Fracción terciaria/ Rendimiento en g (concentración)	Actividad antibacteriana (% de inhibición)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>FS1 / 1.7 (400 µg/ml)</b>	<b>36</b>	<b>54</b>	<b>69</b>	<b>70</b>	<b>51</b>	<b>44</b>	<b>45</b>	<b>44</b>
<b>FT1 / 1.53 (200 µg/ml)</b>	<b>33</b>	<b>45</b>	<b>43</b>	<b>45</b>	<b>29</b>	--	<b>33</b>	<b>29</b>
FT2 / 0.13 (200 µg/ml)	08	17	24	32	17	--	17	33

1=*Ec* ATCC 25922, 2=*EHEC* 0157:H7, 3=*Shigella sonnei*-1, 4= *S. s-2* , 5=*S. flexneri*-1, 6=*S. f-2* , 7=*Salmonella* sp-1, 8=*S. sp-2*.

En la tabla 18 se muestran los resultados en porcentajes de inhibición de la evaluación de las fracciones terciarias obtenidas de las fracciones secundarias FS8 (FTI y FTII) y de la FS12 (FTi a la FTvi), a la concentración de 200 µg/ml.

**Tabla 18.** Resultados de la actividad antibacteriana y rendimiento de las fracciones terciarias obtenidas a partir de las fracciones secundarias FS8 y FS12.

Fracción terciaria/ Rendimiento en g (concentración)	Actividad antibacteriana (% de inhibición)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>FS8 / 1.06 (400 µg/ml)</b>	<b>43</b>	<b>49</b>	<b>57</b>	<b>62</b>	<b>55</b>	<b>39</b>	<b>25</b>	<b>30</b>
<b>FTI / 0.69 (200µg/ml)</b>	<b>41</b>	<b>33</b>	<b>41</b>	<b>29</b>	<b>53</b>	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>26</b>
FTII / 0.08 (200µg/ml)	02	19	25	05	49	18	09	16
<b>FS12 / 0.87 (400 µg/ml)</b>	<b>23</b>	<b>44</b>	<b>41</b>	<b>32</b>	<b>51</b>	<b>44</b>	<b>18</b>	<b>16</b>
<b>FTi / 0.29 (200 µg/ml)</b>	<b>36</b>	<b>53</b>	<b>47</b>	<b>61</b>	<b>08</b>	<b>37</b>	<b>31</b>	<b>27</b>
FTii / 0.01 (200 µg/ml)	22	00	10	14	37	18	22	26
FTiii / 0.18 (200 µg/ml)	32	03	11	15	29	16	21	17
FTiv / 0.07 (200 µg/ml)	21	00	00	00	37	22	26	11
FTv / 0.03 (200 µg/ml)	22	00	00	37	22	26	11	00
FTvi / 0.25 (200 µg/ml)	32	09	01	11	46	26	21	22

1=*Ec* ATCC 25922, 2=*EHEC* 0157:H7, 3=*Shigella sonnei*-1, 4= *S. s-2* , 5=*S. flexneri*-1, 6=*S. f-2* , 7=*Salmonella* sp-1, 8=*S. sp-2*.

A los 14 compuestos aislados del estudio fitoquímico biodirigido del pericarpio de *Punica granatum* se les determinó su actividad antibacteriana y en la tabla 19 se muestran los porcentajes de inhibición evaluados a diferentes concentraciones.

**Tabla 19.** Resultados de la actividad antibacteriana de los compuestos obtenidos a partir del fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico de *Punica granatum*.

Compuesto/ concentración	Actividad antibacteriana (% de inhibición)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
$\beta$ -sitosterol/ 8 mg/ml	19	0	9	17	3	0	16	2
Ácido oleanólico/ 400 $\mu$ g/ml	34	41	43	37	43	24	39	24
Ácido ursólico/ 400 $\mu$ g/ml	41	44	49	44	52	24	39	39
1,4-dimetil malato/ 1 mg/ml	30	11	0	14	14	18	39	25
Ácido gálico/ 4 mg/ml	58	58	100	60	100	100	67	43
Ácido elágico/ 1 mg/ml	39	35	2	32	19	59	32	36
Araquidato de metilo/ 200 $\mu$ g/ml	32	25	26	28	17	37	31	27
Behenato de metilo/ 200 $\mu$ g/ml	32	25	15	21	33	21	31	27
Estearato de metilo/ 200 $\mu$ g/ml	19	25	36	31	33	37	35	36
Hexacosanoato de metilo/ 200 $\mu$ g/ml	40	22	08	15	38	26	26	22
Linoleato de metilo/ 200 $\mu$ g/ml	32	25	29	21	33	26	40	27
Palmitato de metilo/ 200 $\mu$ g/ml	40	22	11	21	25	32	26	27
Metil galato / 200 $\mu$ g/ml	56	46	64	48	54	100	42	50
Trimetil malato/ 200 $\mu$ g/ml	51	44	45	61	100	100	37	41
Sulfametoxazol/ 200 $\mu$ g/ml	63	100	7	17	100	100	54	45
Trimetroprima/ 200 $\mu$ g/ml	100	100	23	12	100	100	100	100

1=*Ec* ATCC 25922, 2=*EHEC* 0157:H7, 3=*Shigella sonnei*-1, 4= *S. s*-2 , 5=*S. flexneri*-1, 6=*S. f*-2 , 7=*Salmonella* sp-1, 8=*S. sp*-2.

### VIII. 3 Resultados de la actividad antibacteriana del estudio relación estructura química actividad de compuestos fenólicos.

Los resultados de la evaluación antibacteriana de los 14 compuestos fenólicos se resumen en la tabla 20 a la concentración de 2 mg/ml. En la tabla 21 se muestran los dos compuestos con mejor actividad, está evaluación se realizó a la concentración de 1 mg/ml para poder determinar cual de estos dos compuestos es el más activo.

**Tabla 20.** Resultados de la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos.

Compuesto	Actividad antibacteriana (% de inhibición a 2 mg/ml)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ácido <i>trans</i> -cinámico	100	100	100	100	100	100	34	100
ácido 4'-hidroxi- <i>trans</i> -cinámico	100	100	100	100	100	100	38	38
ácido 2,3-dihidro-3',4'-hidroxi-cinámico	43	39	100	100	33	100	21	24
ácido 2'-hidroxi- <i>trans</i> -cinámico	58	100	100	100	100	100	31	24
ácido 3',5'-dimetoxi-4'-hidroxi-cinámico	27	36	32	32	27	36	28	17
ácido 3',4'-dihidroxi-cinámico	100	100	100	100	100	100	21	24
ácido benzoico	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
ácido 4-hidroxi-benzoico	45	34	45	49	100	100	08	04
ácido 3,4-dihidroxi-benzoico	32	29	56	51	30	100	08	17
ácido 2,3-dihidro-4'-hidroxi-cinámico	48	58	100	66	100	100	29	31
ácido fenil acético	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
ácido 4'-hidroxi-fenil acético	39	48	100	100	100	100	21	17
ácido gálico	39	26	20	10	24	100	13	07
ácido elágico	44	35	02	26	19	61	16	27
Sulfametoxasol	100	100	73	67	100	100	100	100
Trimetoprima	100	100	17	17	100	100	100	100

1=*Ec* ATCC 25922, 2=*EHEC* 0157:H7, 3=*Shigella sonnei*-1, 4=*S. s*-2, 5=*S. flexneri*-1, 6=*S. f*-2, 7=*Salmonella* sp-1, 8=*S. sp*-2.

**Tabla 21.** Resultados de la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos más activos.

Compuesto	Actividad antibacteriana (% de inhibición a 1 mg/ml)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Ácido benzoico	35	20	30	45	03	00	21	08
ácido fenil acético	<b>32</b>	<b>34</b>	<b>67</b>	<b>58</b>	<b>39</b>	<b>100</b>	<b>34</b>	<b>31</b>
Sulfametoxasol	100	100	40	33	100	100	100	100
Trimetoprima	100	100	10	0	100	100	100	100

1=*Ec* ATCC 25922, 2=*EHEC* 0157:H7, 3=*Shigella sonnei*-1, 4=*S. s*-2, 5=*S. flexneri*-1, 6=*S. f*-2, 7=*Salmonella* sp-1, 8=*S. sp*-2.

## IX. ANÁLISIS

### IX.1 Análisis de los resultados de la actividad antibacteriana de los 56 extractos evaluados.

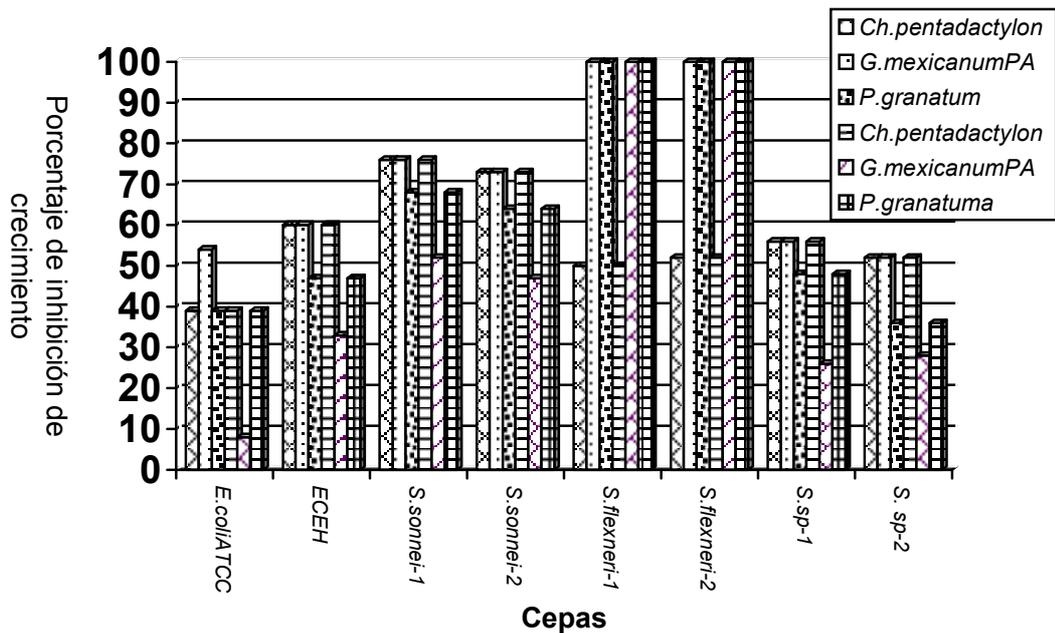
El proceso de preselección de las 26 especies vegetales se llevó a cabo utilizando un criterio etnobotánico, el cual toma en cuenta el uso que hace la población mexicana para tratar sus enfermedades; en este caso se preseleccionaron aquellas especies que son reportadas para el tratamiento de trastornos gastrointestinales que incluyen la diarrea y la disentería, nos apoyamos en el análisis de datos obtenidos a partir de fuentes de información (libros, revistas y directamente con los médicos tradicionales). Cabe hacer mención que en México las plantas para tratar trastornos gastrointestinales han ocupado el primer lugar en uso durante los últimos 20 años (Lozoya *et al.*, 1987; Heinrich, 2000).

Después de la recolección y una vez sometidos a los procesos de secado y molienda se prepararon los correspondientes extractos metanólicos y acuosos, mediante los procesos de maceración y decocción, respectivamente. La selección de los disolventes de extracción se tomó haciendo las siguientes consideraciones; el metanol porque es un disolvente polar que permite obtener compuestos de baja, mediana y alta polaridad; en el caso de el agua se utilizó porque es la forma más usual como la población prepara estas plantas.

Una vez preparados los 56 extractos metanólicos y acuosos de 26 especies diferentes (24 géneros en 20 familias) se sometieron a un rastreo de actividad antibacteriana contra ocho cepas bacterianas enteropatógenas. Se utilizó la prueba antibacteriana considerando que uno de los agentes etiológicos de la diarea son las bacterias, específicamente utilizamos aislados patógenos de pacientes pediátricos mexicanos porque queremos apegarnos más a la realidad para encontrar compuestos contra estos aislados; además de que las cepas que se utilizaron no cuentan con evaluaciones bacterianas.

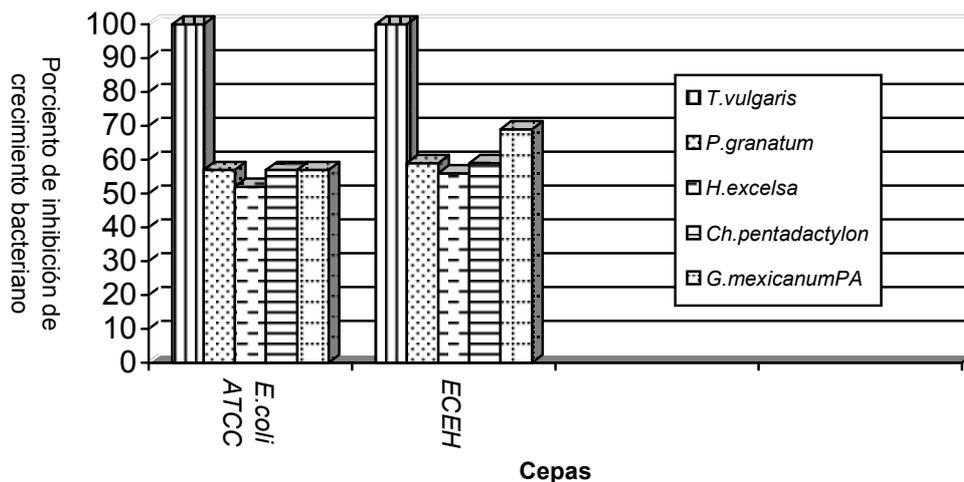
Las plantas evaluadas difieren en sus actividades contra las cepas evaluadas y la mejor actividad antibacteriana se observó a la concentración de 8 mg/ml.

De las 26 plantas evaluadas, ambos extractos de *Caesalpinia pulcherrina*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Cocos nucifera*, *Geranium mexicanum* (R y PA), *Hippocratea excelsa* y *Punica granatum* fueron activas contra todas las bacterias, además de presentar en algunas cepas los mejores porcentos de inhibición (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos y acuosos (8 mg/ml) de tres de las especies que inhibieron a todas las cepas bacterianas.

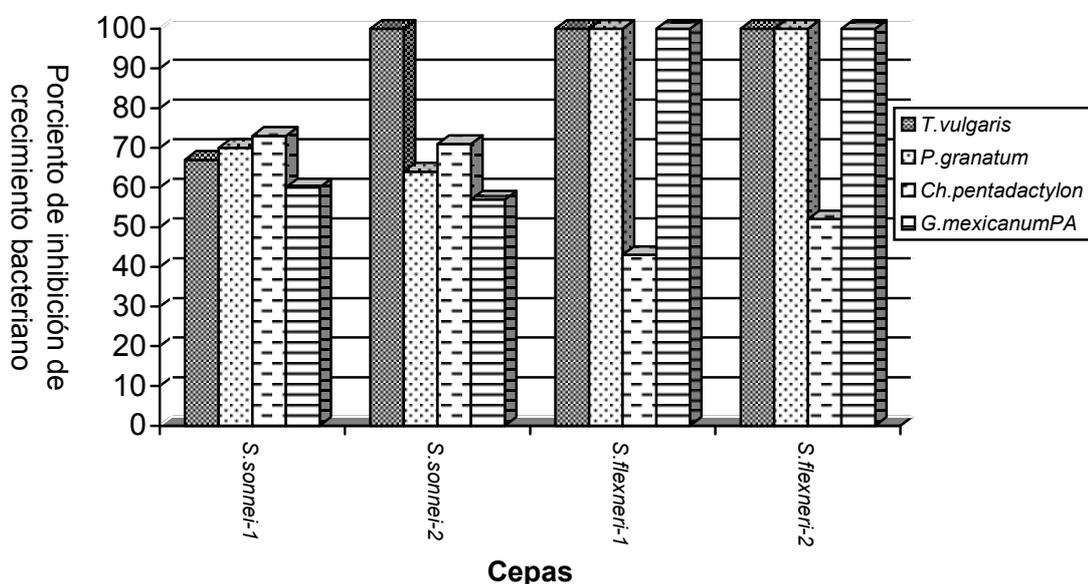
En el caso particular de la actividad específica de cada cepa a continuación analizaremos los porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos. Para las dos cepas de *E. coli* los extractos metanólicos con mayor porcentajes de inhibición fueron *T. vulgaris*, *P. granatum*, *H. excelsa*, *Ch. pentadactylon* y *G. mexicanum* PA, con valores entre 52 al 100 % (Gráfica 2).



**Gráfica 2.** Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos activos (8 mg/ml) contra las cepas de *E. coli*.

Para la cepa de *S. sonnei*-1 el extracto metanólico más activo fue *Ch. pentadactylon* con el porcentaje de inhibición del 73 %. Para la cepa de *S. sonnei*-2 el extracto metanólico más activo fue *T. vulgaris* con el 100 % de inhibición (Gráfica 3).

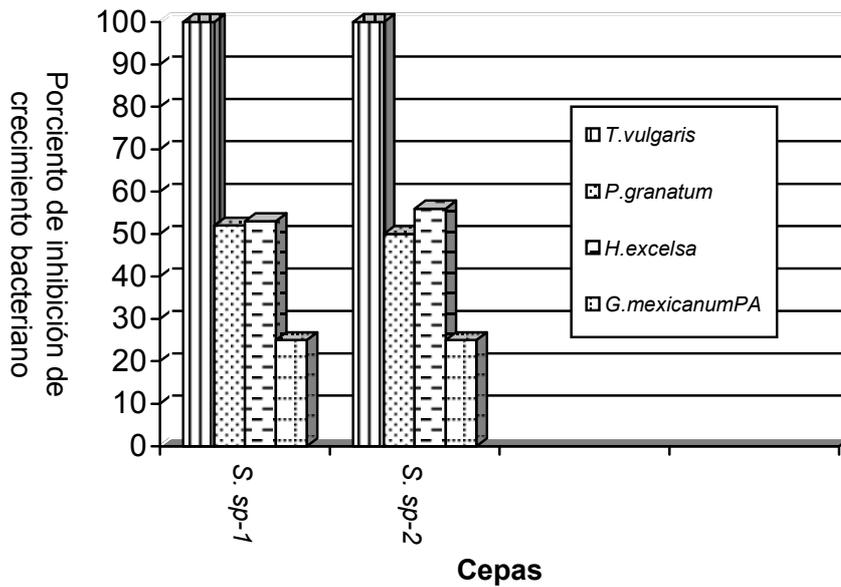
Para las 2 cepas de *S. flexneri* los extractos metanólicos de *P. granatum*, *T. vulgaris* y *G. mexicanum* tuvieron el 100 % de inhibición (Gráfica 3). También hubo otros extractos que solo inhibieron a una cepa de *S. flexneri*; en el caso particular de la cepa de *S. flexneri*-1, el extracto metanólico de *Caesalpinia pulcherrima* tuvo una inhibición del 100 %; para la cepa de *S. flexneri*-2, el extracto metanólico de *Chrysactinia mexicana* tuvo un porcentaje de inhibición del 100 %.



**Gráfica 3.** Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos (8 mg/ml) contra las cepas de *Shigella*.

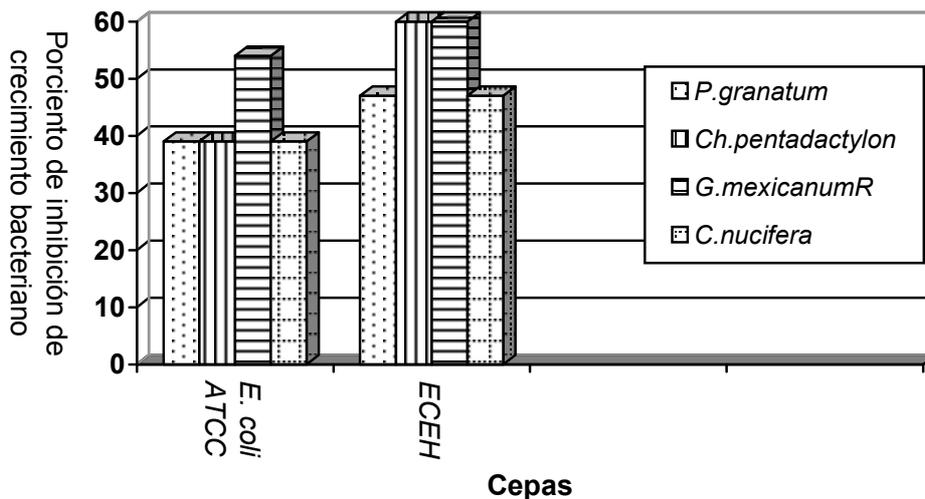
Para las dos cepas de *Salmonella sp* los extractos metanólicos con mejor porcentajes de inhibición son *T. vulgaris*, *P. granatum*, *H. excelsa*, y *G. mexicanum* PA, teniendo entre el 50 al 100 % de inhibición (Gráfica 4).

En el caso de todos los extractos metanólicos, *T. vulgaris* mostró actividad antibacteriana contra la mayoría de las cepas evaluadas con el 100 % de inhibición, excepto para *S. sonnei*-1.



**Gráfica 4.** Porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos activos (8 mg/ml) contra las cepas de *Salmonella*.

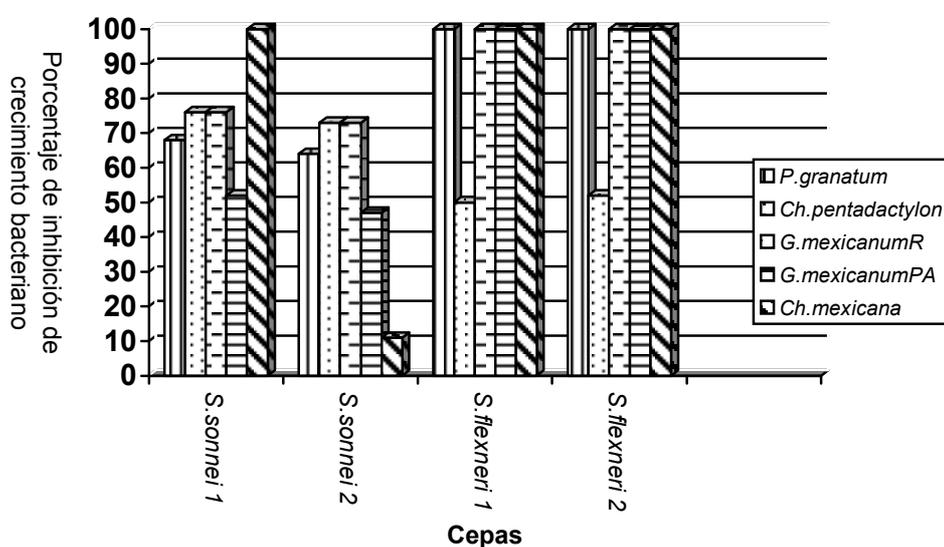
En el caso de los extractos acuosos los que mostraron el porcentaje de inhibición mayor para las dos cepas de *E. coli* fueron los extractos de *Ch. pentadactylon*, *Cocos nucifera*, *G. mexicanum R* y *P. granatum*. En la gráfica 5 se muestran los resultados de los extractos acuosos con el porcentaje de inhibición mayor contra las 2 cepas de *E. coli*.



**Gráfica 5.** Porcentajes de inhibición de los extractos acuosos activos (8 mg/ml) contra las cepas de *E. coli*.

Para el género de *Shigella*, el extracto de *Ch. mexicana* tuvo el 100 % de inhibición para la cepa de *S. sonnei*-1; los extractos de *Ch. pentadactylon* y *G. mexicanum* R tuvieron el porcentaje más alto de inhibición del 73 %, para la cepa de *S. sonnei*-2.

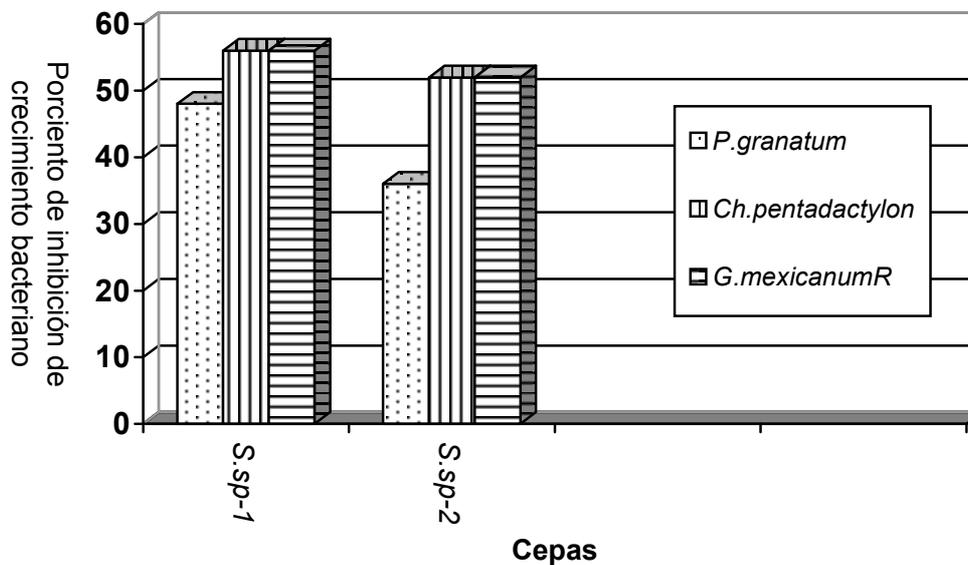
Para las 2 cepas de *S. flexneri* los extractos de *Ch. mexicana*, *G. mexicanum* (R y PA) y *P. granatum* tuvieron el 100 % de inhibición, y el extracto de *T. vulgaris* solo para la cepa de *S. flexneri*-1 tuvo el mismo porcentaje de inhibición. En la gráfica 6 se muestran los resultados de los cinco extractos acuosos más activos contra las 2 cepas de *S. sonnei* y las 2 cepas de *S. flexneri*.



**Gráfica 6.** Porcentajes de inhibición de los extractos acuosos activos (8 mg/ml) contra las cepas de *Shigella*.

Para las 2 cepas de *Salmonella* sp los extractos acuosos con mejores porcentajes de inhibición fueron *Ch. pentadactylon*, *G. mexicanum* R y *P. granatum* con rangos entre el 36 al 56 % de inhibición (Gráfica 7).

Los extractos que inhibieron el menor número de cepas fueron el extracto metanólico de *Annona cherimola* que solo inhibió a las dos cepas de *S. sonnei* y la cepa control de *E. coli* con porcentajes de inhibición de entre el 4 al 15 %. En el caso de los extractos acuosos *Lygodium venustum* solo inhibió a la cepa *E. coli* 0157:H7 con un porcentaje de inhibición del 27 %.



**Gráfica 7.** Porcentajes de inhibición de los extractos acuosos activos (8 mg/ml) contra las cepas de *Salmonella*

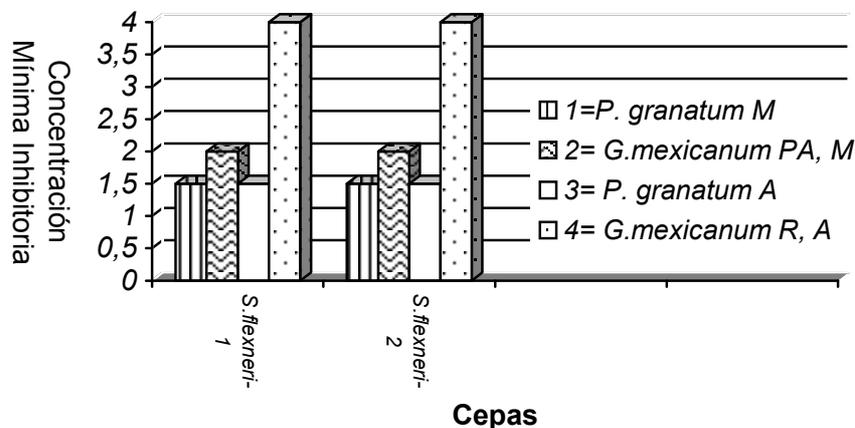
Los extractos metanólicos y acuosos más activos superaron en actividad al control cloranfenicol. En relación al control trimetoprima solo el extracto metanólico de *T. vulgaris*, lo superó en actividad contra las cepas evaluadas. Cabe destacar que en el caso de las dos cepas de *S. sonnei* los extractos metanólicos de *P. granatum*, *H. excelsa*, *G. mexicanum*, *C. nucífera*, *Ch. pentadactylon* y *O. basilicum* superaron a la trimetoprima. En el caso de los extractos acuosos además de los extractos metanólicos ya mencionados y el extracto de *C. pulcherrima*, exceptuando a *O. basilicum*, fueron más activos que el cloranfenicol en todas las cepas evaluadas y para el caso de las dos cepas de *S. sonnei* estos extractos acuosos fueron más activos que la trimetoprima.

A los extractos metanólicos y acuosos de *G. mexicanum* PA y *P. granatum* que se encontraron sus CMI de entre 1 a 4 mg/ml, contra ambas especies de *Shigella flexneri*, siendo las mejores CMI las de los extractos de *P. granatum* (Tabla 14, Gráfica 8).

En general, los extractos metanólicos fueron más activos que los extractos acuosos. Todos los extractos probados tienen propiedades contra por lo menos uno de los microorganismos evaluados.

Con base a que el extracto metanólico de *P. granatum* fue uno de los extractos que ocupó el primer lugar en tener los porcentajes de inhibición mayores (50-100 %) para todas las cepas

bacterianas evaluadas y que su CMI fue de 1.5 mg/ml para las cepas de *Shigella flexneri* se seleccionó a esta especie para realizar su investigación fitoquímica biodirigida.



M=Metanólico, PA=Partes aéreas, A.=Acuoso, R=Raíz.

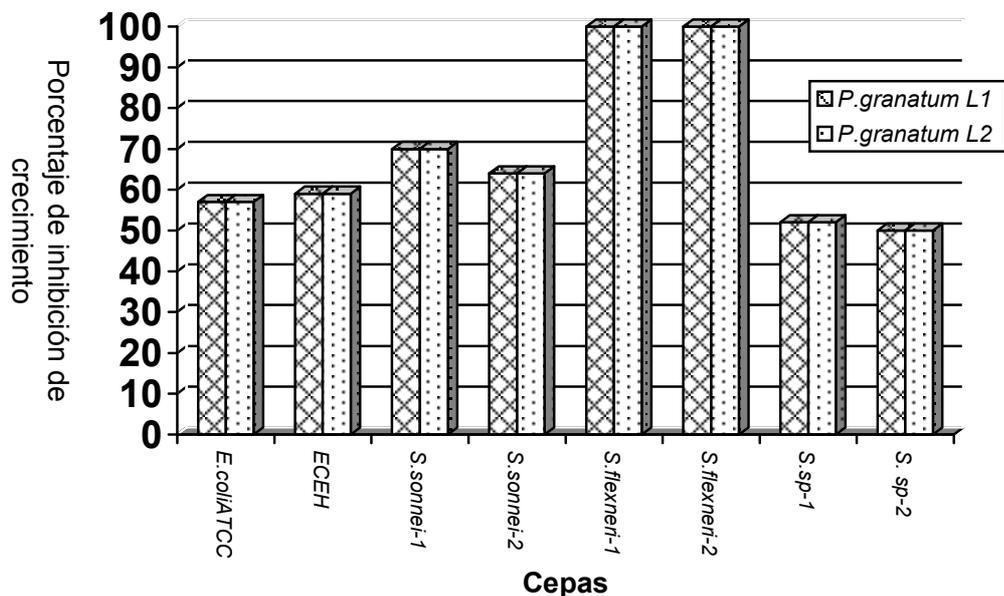
**Gráfica 8.** CMIs de los extractos metanólicos y acuosos de las especies de *G. mexicanum* (PA y R) y *P. granatum* contra *S. flexneri*.

## IX.2 Análisis de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto metanólico, fracciones y compuestos puros obtenidos a partir de *P. granatum*.

Con base en los resultados obtenidos en la evaluación antibacteriana del grupo de 26 plantas se seleccionó al extracto metanólico del pericarpio del fruto de *P. granatum* para realizar su fraccionamiento biodirigido (Tablas 12-14).

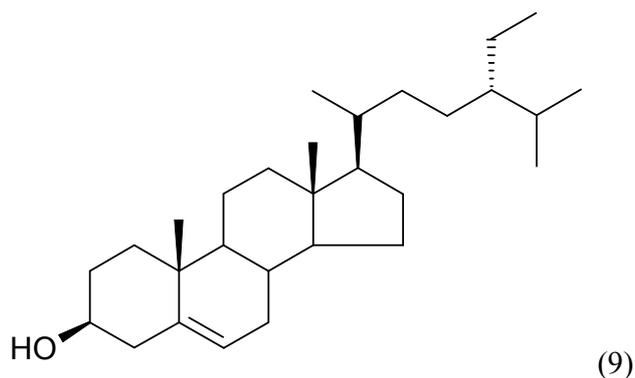
Posteriormente se llevó a cabo la recolección y extracción de un segundo lote (L2) del cual se deriva esta parte de la tesis. A este extracto se le determinaron las propiedades antibacterianas (Tabla 15), los resultados se muestran a las concentraciones de 8 mg/ml, empleándose las cepas enteropatógenas mencionadas en la prueba biológica inciso VII.1.1. La actividad del extracto obtenida del segundo lote fué idéntica al primero (L1) por lo que se continuó con su fraccionamiento (Gráfica 9).

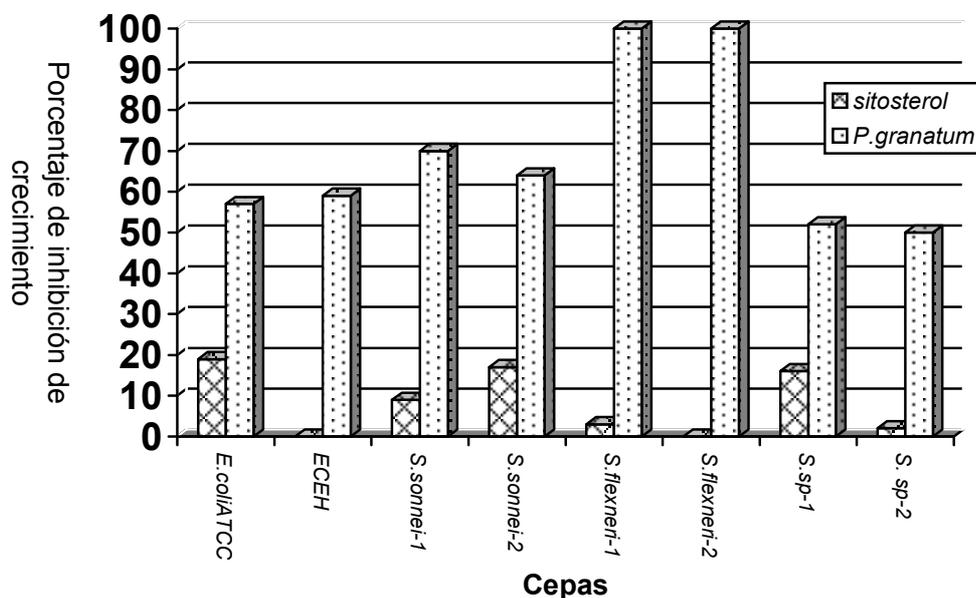
Del proceso de fraccionamiento del extracto metanólico se obtuvieron 11 fracciones primarias, a las cuales se les realizó la evaluación antibacteriana y se encontró que la fracción FP7 eluída con una mezcla de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (80:20) mostró el porcentaje de inhibición más alto a la concentración de 8 mg/ml, por lo que fue seleccionada para su separación en fracciones menos complejas.



**Gráfica 9.** Porcentajes de inhibición de los dos lotes del extracto metanólico de *P. granatum* (8 mg/ml).

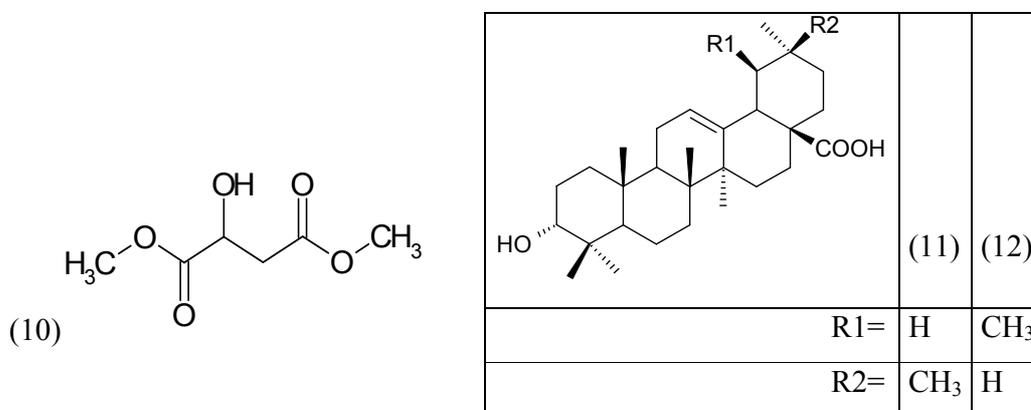
De la fracción primaria FP2 eluída con  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1), cristalizó de manera espontánea un compuesto soluble en cloroformo lo que es consistente con sus propiedades no polares, el compuesto se identificó mediante comparación en cromatografía en capa fina y punto de fusión mixto como  $\beta$  sitosterol (9, Anexo I). La determinación antibacteriana del estero, su fracción y el extracto de origen a concentraciones similares (8 mg/ml) demostró que es inactivo contra todas las cepas empleadas (Gráfica 10).



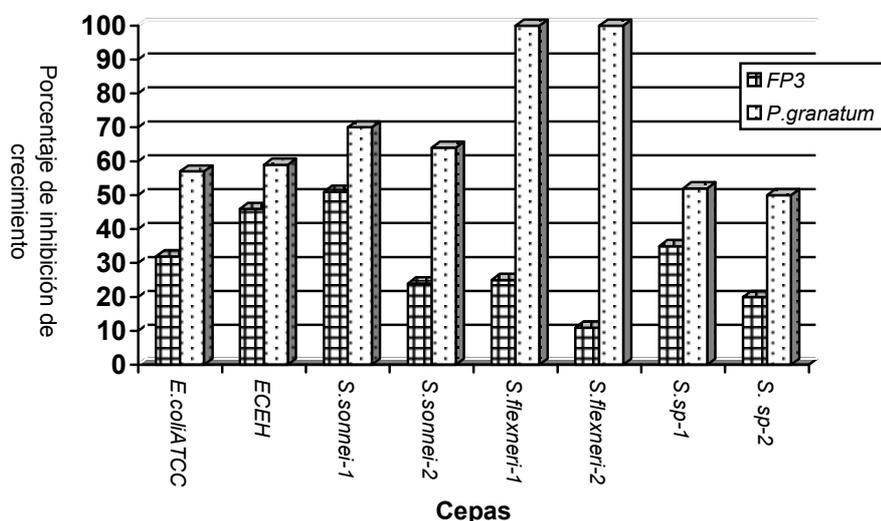


**Gráfica 10.** Porcentajes de inhibición del  $\beta$  sitosterol y el extracto metanólico de *P. granatum* (8 mg/ml).

De la fracción primaria FP3 eluída con una mezcla de baja polaridad de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (9:1), se obtuvo un precipitado que al ser analizado por cromatografía de gases, acoplada a espectrometría de masas, se encontró que estaba constituido por tres compuestos, que fueron identificados de la siguiente manera: el compuesto 10, por el análisis de sus espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$ ,  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  y EMIE; los compuestos 11 y 12 por el análisis de sus espectros de masas. De la mezcla obtenida el producto mayoritario fue el ácido 1,4-dimetil malato (10), con un 99 % de rendimiento, los terpenoides, ácido ursólico (11) y ácido oleanólico (12) estaban en un 0.5% de la mezcla.

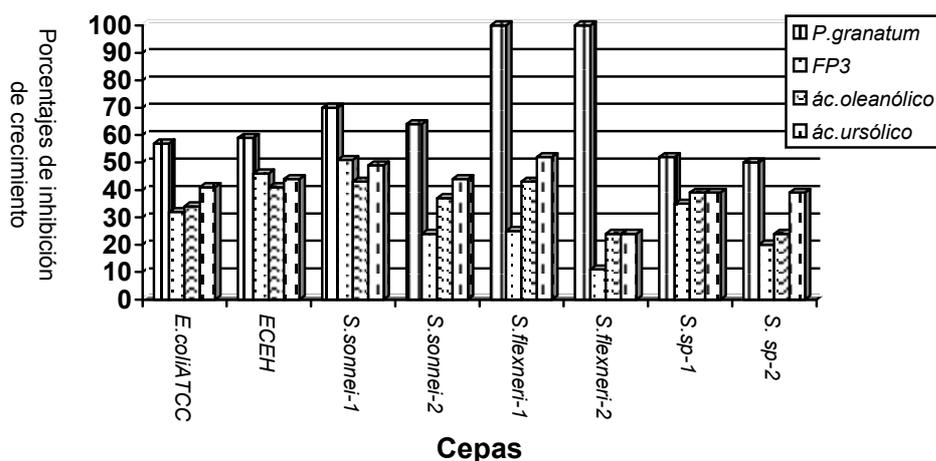


La evaluación de la actividad antibacteriana de estos compuestos se realizó de dos maneras como mezcla (FP3) y como compuestos puros. Como mezcla fueron menos activos que el extracto de origen a la concentración de 8 mg/ml (Gráfica 11).



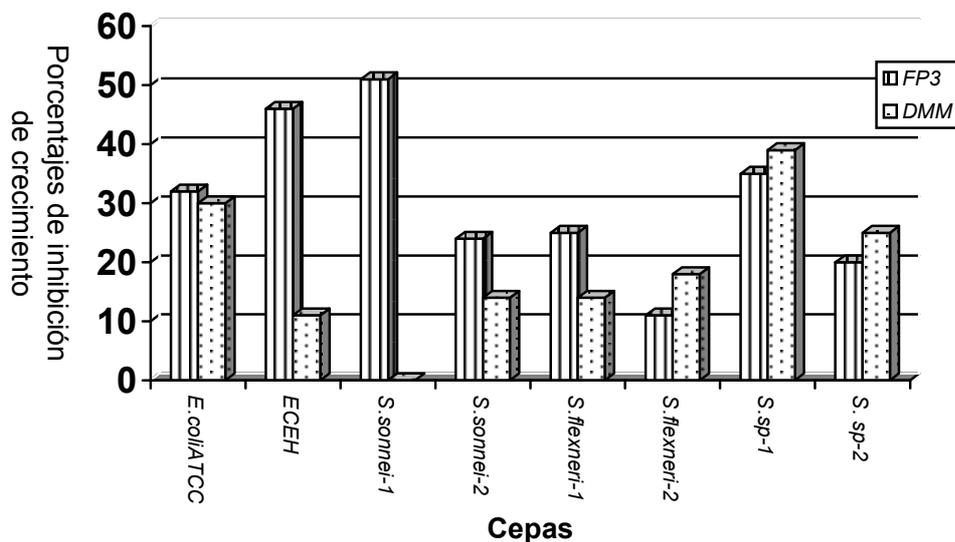
**Gráfica 11.** Porcentajes de inhibición de la fracción primaria FP3 y el extracto metanólico de *P. granatum* (8 mg/ml).

Como compuestos puros se observa que los ácidos ursólico (400  $\mu$ g/ml) y oleanólico (400  $\mu$ g/ml) son más activos con inhibiciones superiores a la del extracto y fracción de origen (8 mg/ml). Es de destacar que ambos triterpenos fueron evaluados a concentraciones 20 veces menores (Gráfica 12).



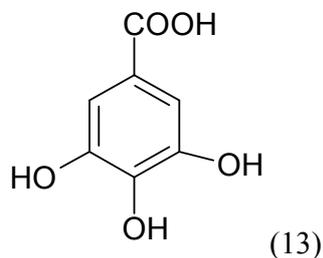
**Gráfica 12.** Porcentajes de inhibición del extracto metanólico de *P. granatum*, la fracción primaria FP3 a concentración de 8 mg/ml; el ácido oleanólico y el ácido ursólico a 400  $\mu$ g/ml.

En relación al ácido dicarboxílico, 1,4-dimetil malato (DMM) se evaluó a una concentración 8 veces menor (1 mg/ml) que la de su fracción de origen (8 mg/ml), originando inhibiciones superiores contra todas las cepas evaluadas, excepto contra *Shigella sonnei*-1 (Gráfica 13).

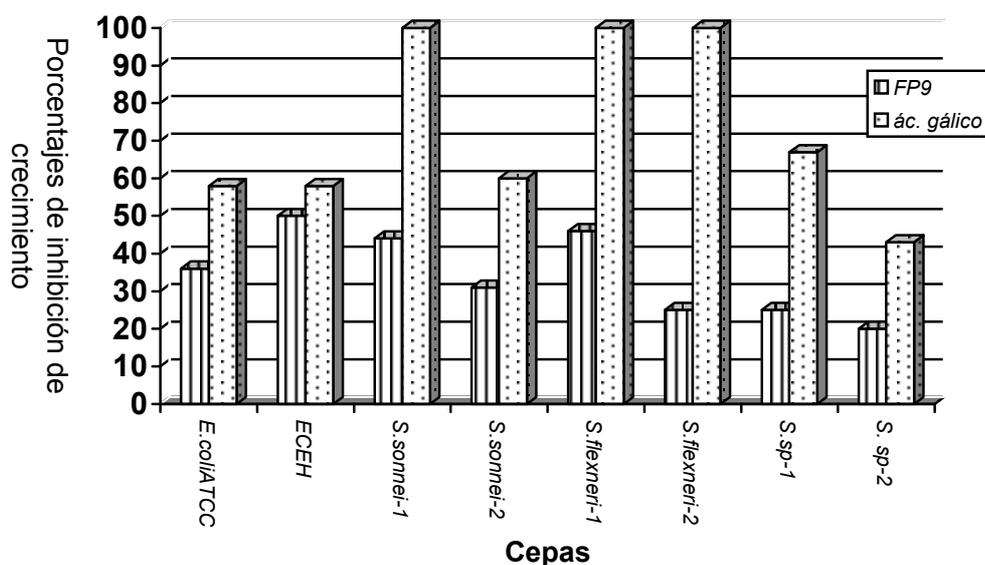


**Gráfica 13.** Porcentajes de inhibición de la fracción primaria FP3 y del 1,4-dimetil malato (DMM) a 1 mg/ml.

De la fracción primaria FP9 eluída con una mezcla de mediana polaridad de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (7:3), cristalizó de manera espontánea un sólido de color café claro, soluble en metanol, lo cual fue consistente con su naturaleza polar. El compuesto se identificó mediante el análisis de sus espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  como el ácido gálico (13, Anexo I).

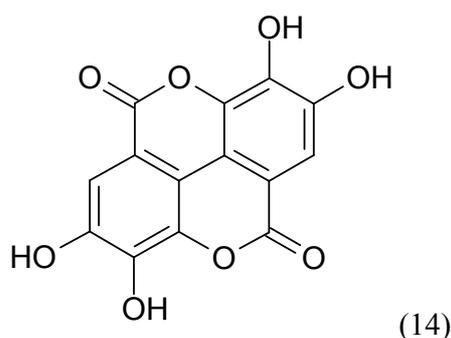


La determinación de la actividad antibacteriana del compuesto a 4 mg/ml demostró efectos inhibitorios mayores que los de su fracción de origen a 8 mg/ml. Es de destacar que el ácido fenólico se evaluó a una concentración dos veces menor (Gráfica 14).

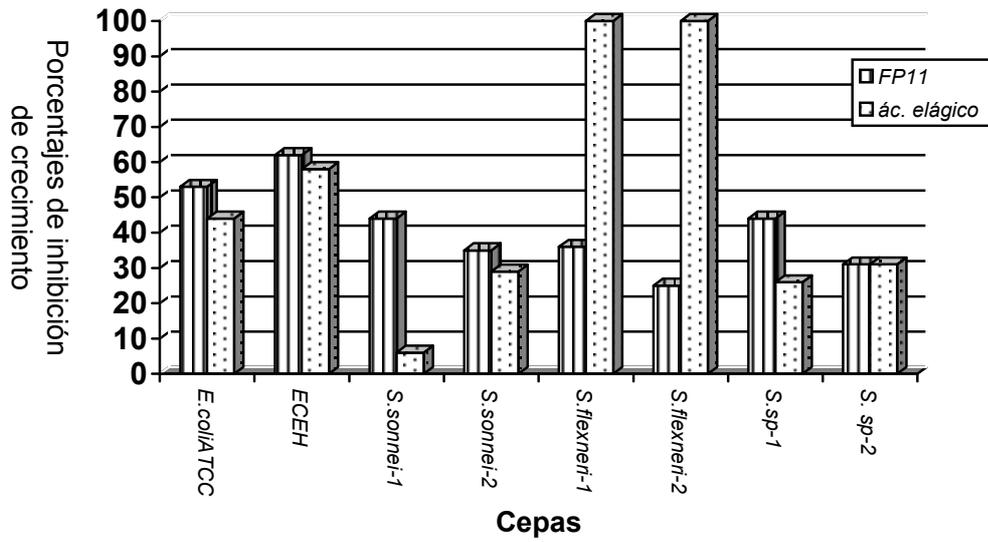


**Gráfica 14.** Porcentajes de inhibición de la fracción primaria FP9 (8 mg/ml) y del ácido gálico (4 mg/ml).

La fracción primaria FP11 se eluyó con una mezcla polar de  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$  (6:4), precipitando de manera espontánea como un sólido de color café oscuro, soluble en DMSO, lo cual fue consistente con su naturaleza polar. El compuesto fue identificado mediante el análisis de sus espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  como el ácido elágico (14, Anexo I).

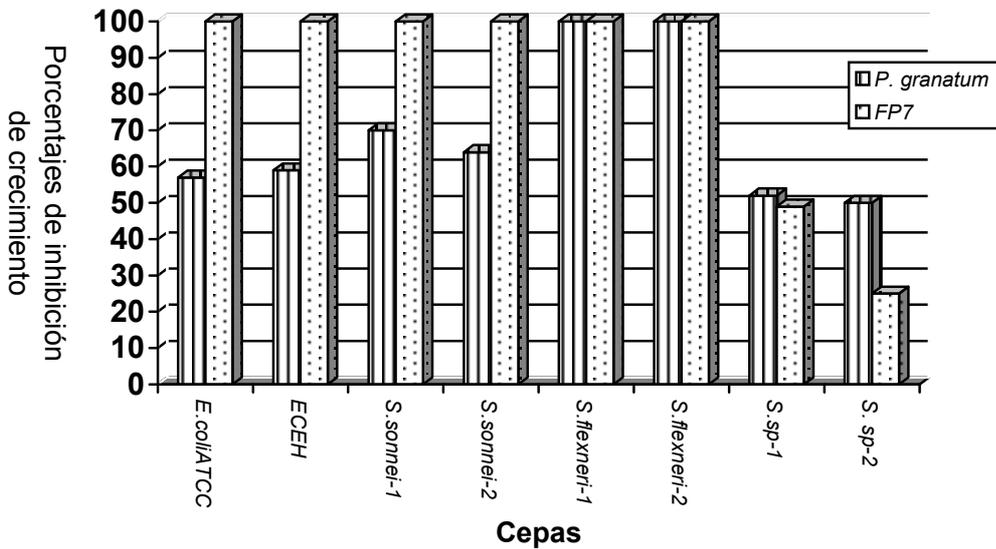


La determinación de la actividad antibacteriana a 4 mg/ml del ácido fenólico dimérico demostró efectos inhibitorios mayores que los de su fracción de origen, excepto con la cepa de *S. sonnei*-1 (Gráfica 15). El compuesto se evaluó a una concentración dos veces menor de su fracción de origen.



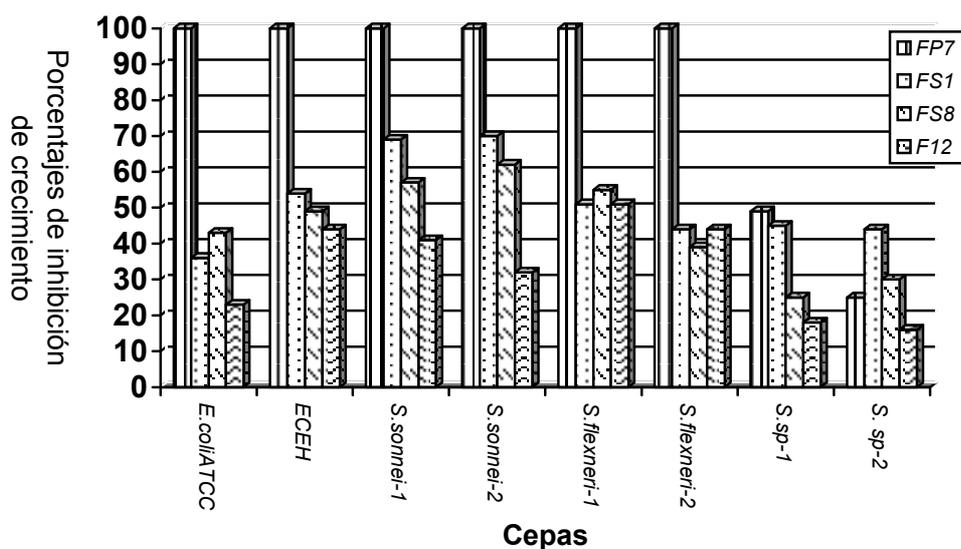
**Gráfica 15.** Porcentajes de inhibición de la fracción primaria FP11 (8 mg/ml) y del ácido elágico (1 mg/ml).

En cuanto a la fracción primaria FP7 con mayor actividad eluida con una mezcla poco polar de  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (8:2). Se encontró que su actividad antibacteriana evaluada a 8 mg/ml, en general fue mayor que la de su extracto de origen (Gráfica 16).



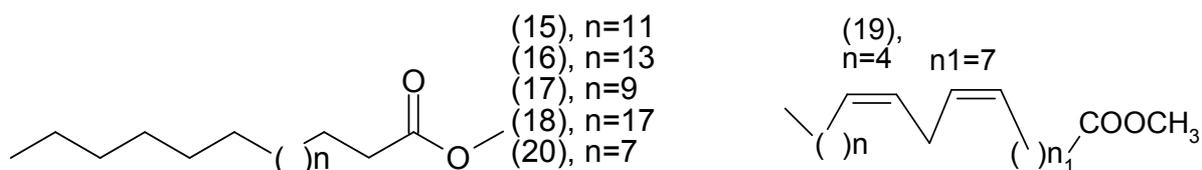
**Gráfica 16.** Porcentajes de inhibición del extracto de *P. granatum* y de la fracción primaria FP7 (8 mg/ml).

La fracción FP7 se separó mediante cromatografía en columna abierta para obtener 19 fracciones secundarias (FS1 a FS19). La determinación de la actividad antibacteriana de estas demostró que su actividad se concentraba en tres fracciones secundarias: FS1, FS8 y FS12. La actividad de las tres fracciones fue superior a su fracción de origen y al extracto de origen para todas las cepas evaluadas. Las fracciones se evaluaron a una concentración 20 veces menor (0.4 mg/ml) (Gráfica 17).

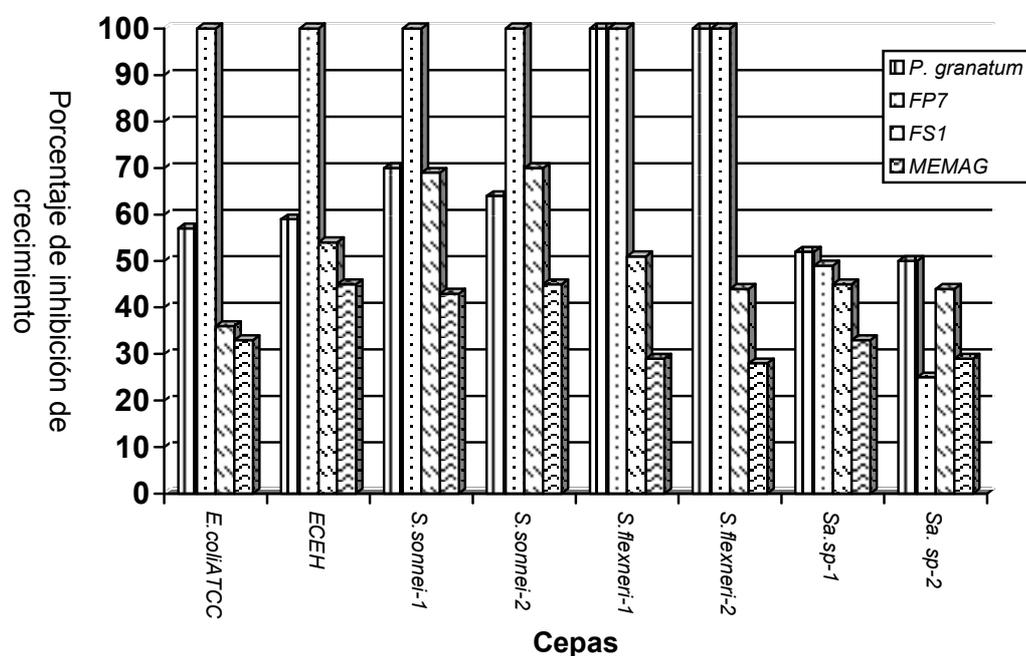


**Gráfica 17.** Porcentajes de inhibición de la fracción primaria FP7 (8 mg/ml) y de las fracciones secundaria FS1, FS8 y FS12 (4 µg/ml).

La fracción secundaria activa FS1 eluida con una mezcla no polar de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (99.5:0.5) se separó mediante cromatografía en columna para obtener dos fracciones terciarias (FT1 y FT2). De la fracción terciaria de mayor actividad (FT1) después de ser separada mediante un experimento de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se encontró que estaba constituida por una mezcla de seis ésteres metílicos de ácidos grasos, que fueron identificados mediante el análisis del patrón de fragmentación observado en sus espectros de masas (Anexo I) como: araquidato de metilo (15), (AM, 2.7 %), behenato de metilo (16), (BM, 2.7 %), estearato de metilo (17), (EM, 7.3 %), hexacosanoato de metilo (18), (HM, 3.6 %), linoleato de metilo (19), (LM, 51.8 %) y palmitato de metilo (20), (PM, 31.8 %).



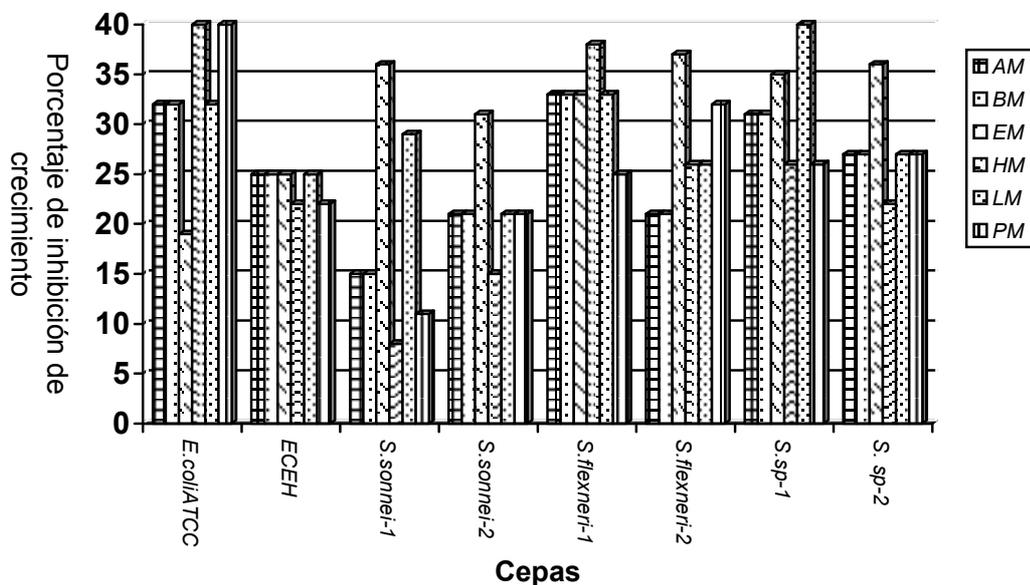
La actividad de la mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (MEMAG) fue superior a las fracciones (FS1 y FP7) y el extracto de origen (Gráfica 18). La mezcla se evaluó a una concentración 40 veces menor (0.2 mg/ml) que la del extracto y la fracción primaria FP7 (8 mg/ml) y dos veces menor que la fracción secundaria FS1 (0.4 mg/ml) de origen.



**Gráfica 18.** Porcentajes de inhibición del extracto, la fracción primaria FP7 (8 mg/ml), la fracción secundaria FS1 (4 µg/ml) y de la mezcla de los ésteres metílicos de ácidos grasos (MEMAG, 2 µg/ml).

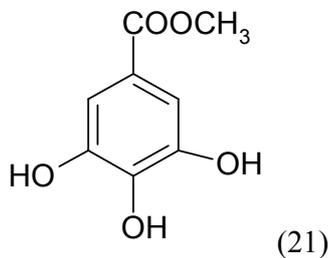
Una vez que los constituyentes de la mezcla se identificaron, éstos se adquirieron comercialmente (Sigma) y a cada uno de ellos se les realizó su evaluación antibacteriana. De los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antibacteriana de los seis ésteres metílicos de ácidos grasos se observó que el EM es el compuesto más activo contra cinco de las ocho cepas evaluadas. Para el AM y el BM sus porcentajes de inhibición fueron muy similares en el rango de 15-37 % para todas las cepas evaluadas; el PM y el HM fueron los que produjeron el porcentaje

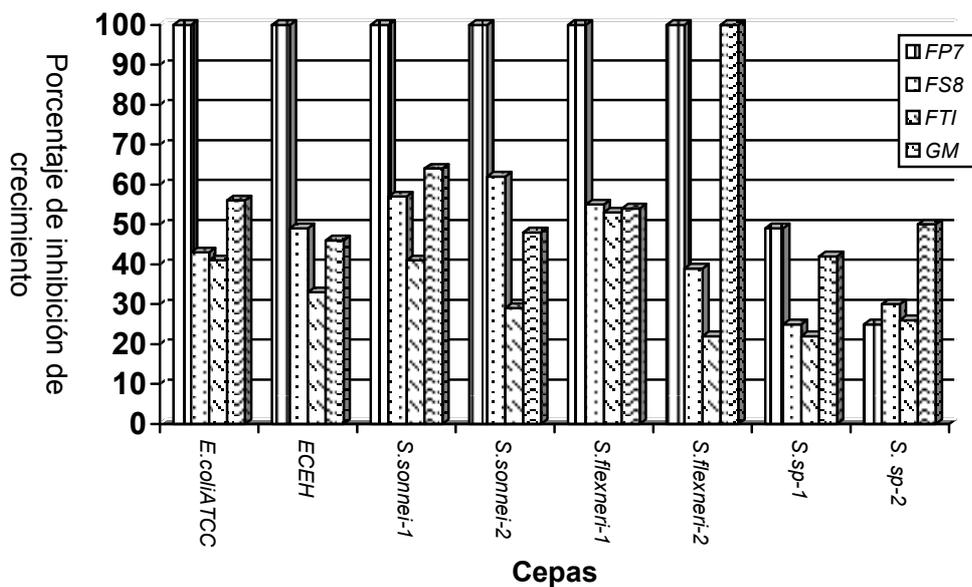
de inhibición mayor del 40 % para la cepa control de *E. coli* ATCC; el HM tuvo el mejor porcentaje de inhibición de 38 % para las cepas de *S. flexneri*-1; para la cepa de *Salmonella* sp -1, el linoleato de metilo (LM) tuvo el mayor porcentaje de inhibición del 40 % (Gráfica 19).



**Gráfica 19.** Porcentajes de inhibición de los ésteres metílicos: AM, BM, EM, HM, LM y PM (2  $\mu\text{g/ml}$ ).

La fracción secundaria activa FS8 eluida con una mezcla no polar de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (99.5:0.5) se separó mediante cromatografía en columna para obtener dos fracciones terciarias (FTI a FTII). De la fracción terciaria con mayor actividad (FTI) precipitó un sólido de color café claro que se identificó mediante el análisis de sus espectros de  $\text{RMN}^1\text{H}$  y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  como el metil galato (21), (Anexo I, Gráfica 20).

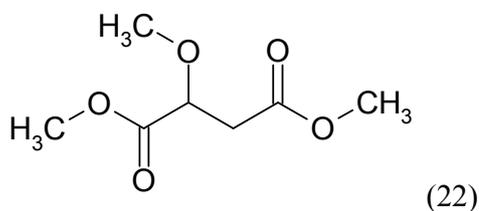




**Gráfica 20.** Porcentajes de inhibición de las fracciones FP7 (8 mg/ml), FS8 (400 µg/ml), FTI y el metil galato (GM) (200 µg/ml).

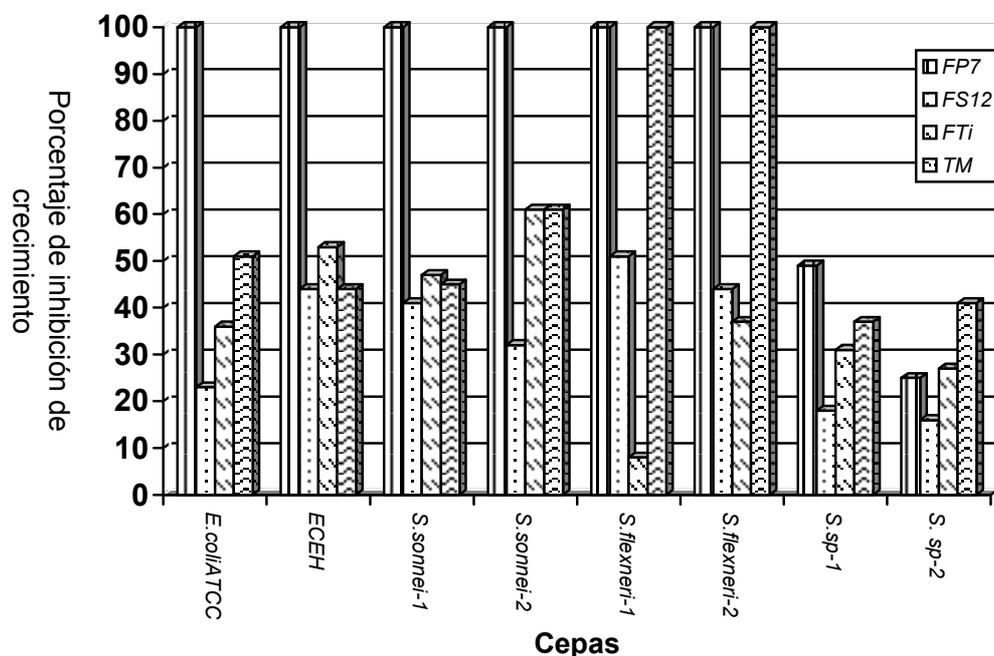
La actividad del éster fenólico fue superior al extracto y fracciones de origen, ya que el compuesto se evaluó a una concentración 40 veces menor (0.2 mg/ml) que la del extracto y la fracción primaria FP7 (8 mg/ml). La concentración del compuesto fue dos veces menor que la fracción secundaria FS8 (0.4 mg/ml) y similar a la fracción terciaria de origen FTI (0.2 mg/ml), (Gráfica 21).

La fracción secundaria activa FS12 eluida con una mezcla no polar de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (8:2) se separó mediante cromatografía en columna para obtener seis fracciones terciarias (FTi y FTvi). De la fracción terciaria con mayor actividad (FTi) precipitó un sólido de color café claro que se identificó mediante el análisis de sus espectros de RMN<sup>1</sup>H y RMN<sup>13</sup>C como el trimetil malato (22).



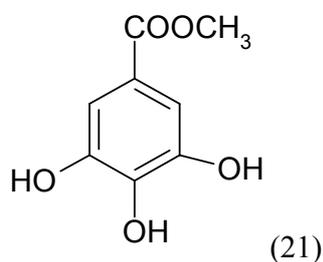
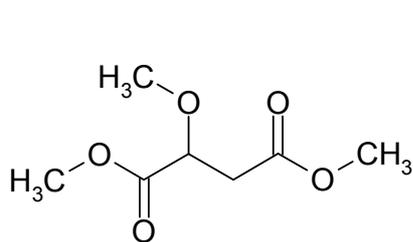
La actividad del éster dicarboxílico fue superior al extracto y fracciones de origen, el compuesto se evaluó a una concentración 40 veces menor (0.2 mg/ml) que la del extracto y la

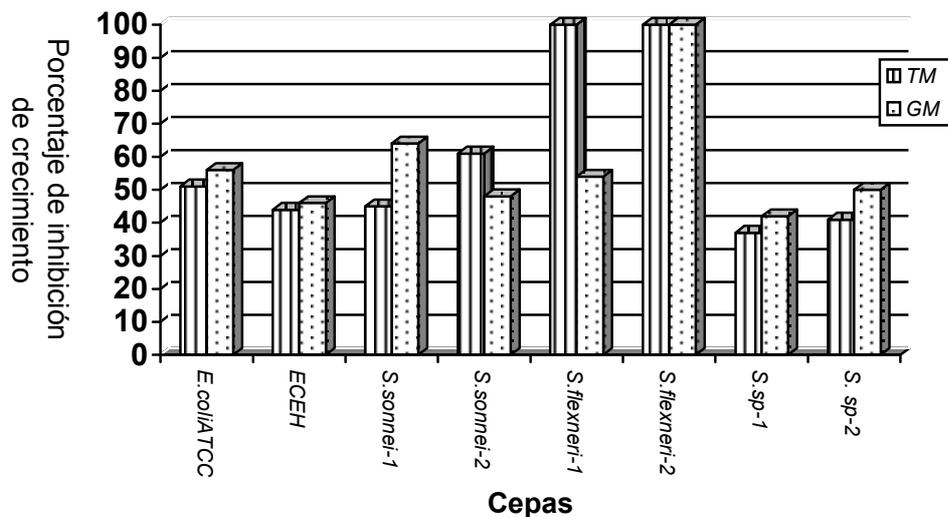
fracción primaria FP7 (8 mg/ml), dos veces menor que la fracción secundaria FS12 (0.4 mg/ml) y similar a la fracción terciaria de origen FTi (0.2 mg/ml) (Gráfica 21).



**Gráfica 21.** Porcentajes de inhibición de las fracciones FP7 (8 mg/ml), FS12 (400 µg/ml), FTi y el trimetil malato (TM) (200 µg/ml).

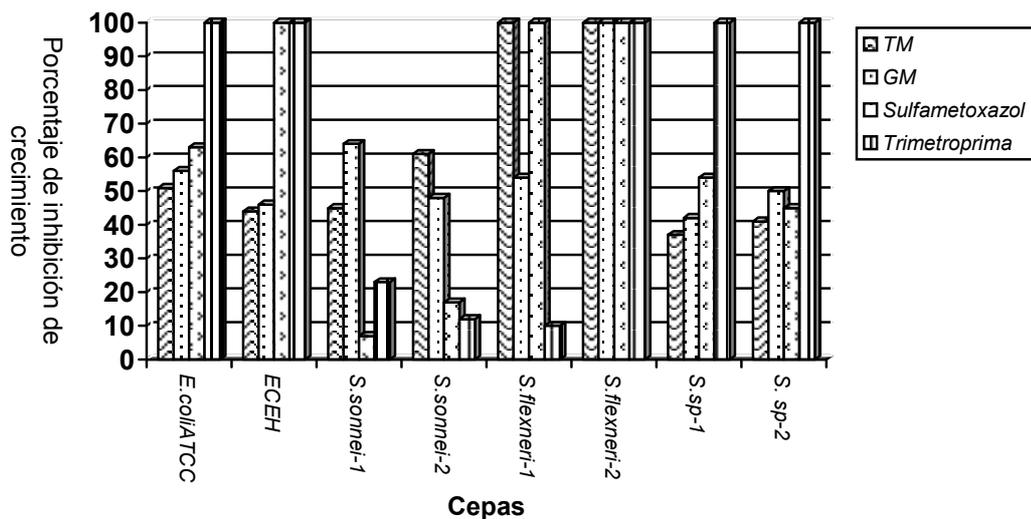
En resumen de los 14 compuestos obtenidos del estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico del pericarpio de *P. granatum*, los compuestos trimetil malato (22) y metil galato (21) fueron similares en cuanto a actividad antibacteriana, excepto contra la cepa de *S. flexneri-1* donde el trimetil malato tuvo una CMI de 150 µg/ml (Gráfica 22).





**Gráfica 22.** Porcentajes de inhibición de los compuestos trimetil malato (TM) y el metil galato (GM) (200 µg/ml).

El trimetil malato y el metil galato resultaron ser más activos contra las cepas de *S. sonnei* que los antimicrobianos control trimetoprima y sulfametoxazol. En el caso de la cepa de *S. flexneri*-2 resultaron tener la misma actividad. Para *S. flexneri*-1 son más activos que la trimetoprima. En cuanto a las cepas de *Salmonella*, ambas mostraron actividad similar que sulfametoxazol. Para las cepas restantes los antibióticos control mostraron mejor porcentaje de inhibición (Gráfica 23).



**Gráfica 23.** Porcentajes de inhibición del trimetil malato (TM), el metil galato (GM), el sulfametoxazol y la trimetoprima (200 µg/ml).

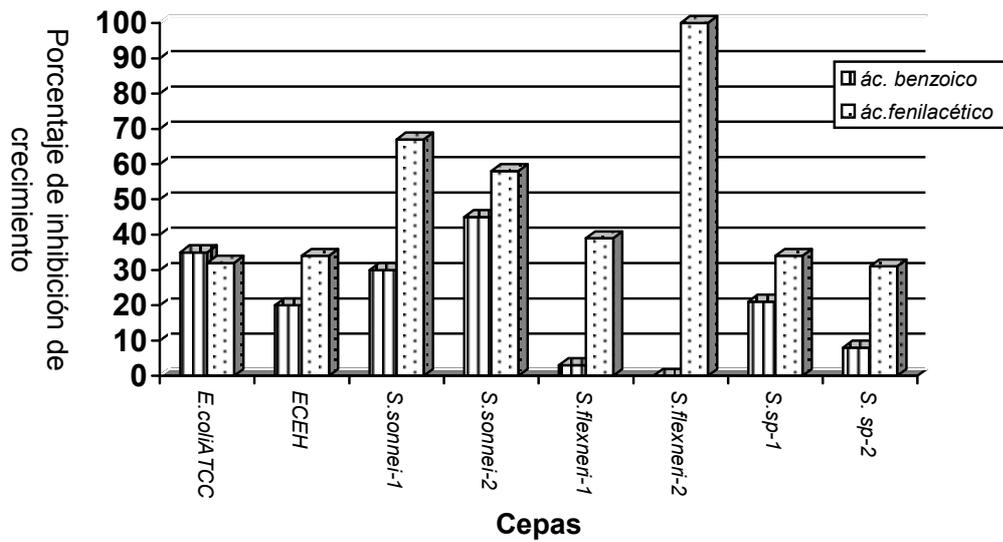
### **IX.3 Análisis de los resultados del estudio de la relación estructura química actividad antibacteriana de compuestos fenólicos.**

Uno de los compuestos con mayor actividad antibacteriana fue el metil galato, que resultó ser el compuesto activo proveniente de varias especies vegetales usadas para el tratamiento de trastornos gastrointestinales (Calzada *et al.*, 1999). Con la finalidad de contribuir al conocimiento de las propiedades antibacterianas de fenoles simples se decidió diseñar un estudio relación estructura química actividad antibacteriana de ácidos fenólicos selectos. Para ello se evaluó el efecto de 14 ácidos fenólicos de origen natural sobre ocho cepas de enterobacterias causantes de diarrea: *Escherichia coli* enterohemorrágica 0157:H7, *Shigella sonnei* (dos cepas), *Shigella flexneri* (dos cepas), *Salmonella* sp (dos cepas) y como cepa control *Escherichia coli* ATCC 25922.

Los objetivos de las evaluaciones efectuadas en los compuestos fenólicos fueron por una parte, determinar la contribución de los grupos hidroxilo presentes en los productos naturales en el aumento o disminución de la actividad antibacteriana y por la otra, comprobar si la actividad de los ácidos fenólicos se afecta por la ausencia, largo de la cadena e insaturación de la cadena asociada al carboxilo.

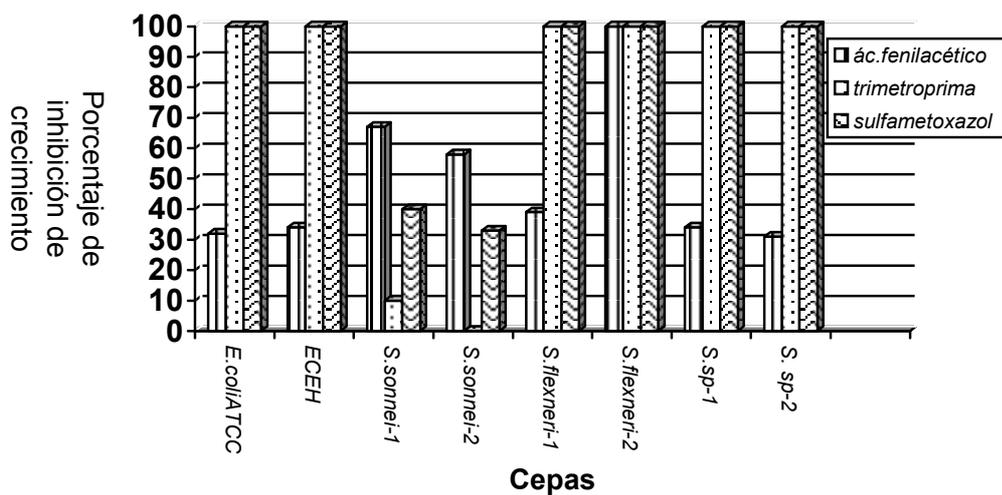
Los productos naturales evaluados (Figura 7) difieren en el número y localización de los sustituyentes oxigenados en el anillo aromático y en la presencia o ausencia de la cadena, la presencia o ausencia de la insaturación en la cadena y largo de la cadena asociada al ácido carboxílico.

De acuerdo con los resultados, que se resumen en la tabla 19, en las evaluaciones realizadas a una concentración de 2 mg/ml, los cinco ácidos fenólicos con mejor actividad de inhibición fueron el ácido trans-cinámico, el ácido 4'-hidroxi-trans-cinámico, el ácido 3',4'-dihidroxi-cinámico, el ácido benzoico y el ácido fenil acético. De estos los más activos fueron los ácidos benzoico (29) y fenil acético (33). Los compuestos mostraron 100 % de inhibición contra las ocho cepas evaluadas. Con la finalidad de establecer cual de los dos compuestos era el mejor inhibidor, se hizo la evaluación a una concentración de 1 mg/ml y se encontró que el ácido fenil acético fue superior en actividad contra siete de las cepas evaluadas, siendo más evidente para la cepa de *S. flexneri*-2 (Tabla 20, Gráfica 24).



**Gráfica 24.** Porcentajes de inhibición a 1 mg/ml del ácido benzoico y ácido fenil acético.

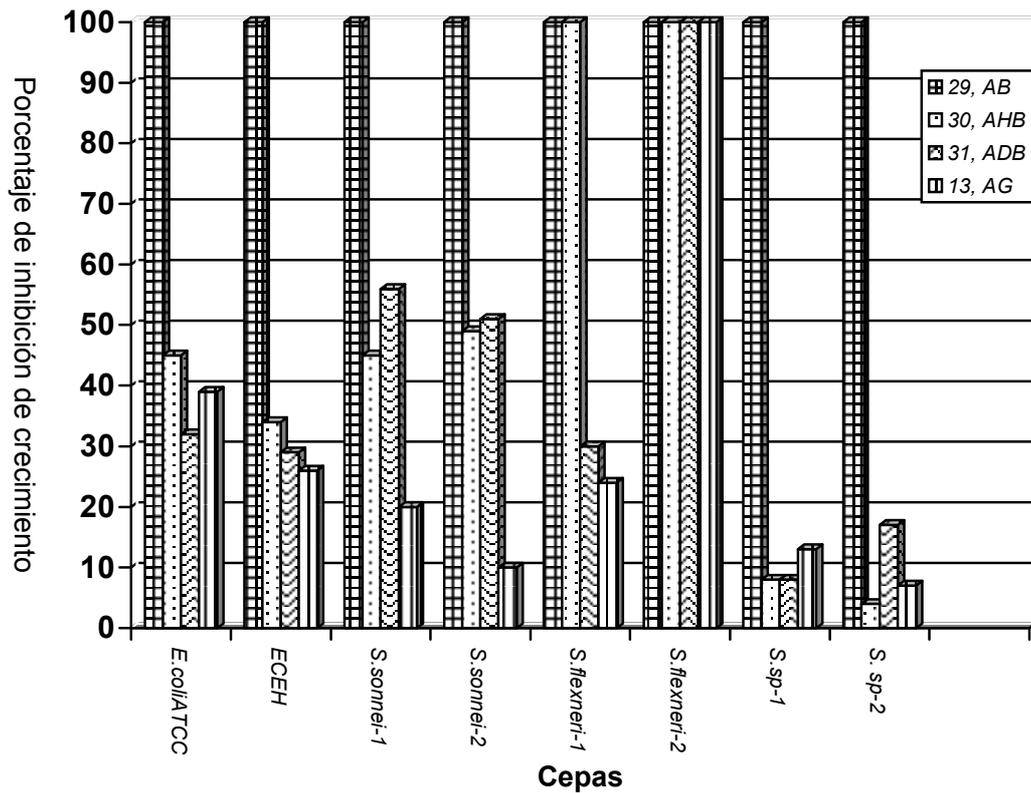
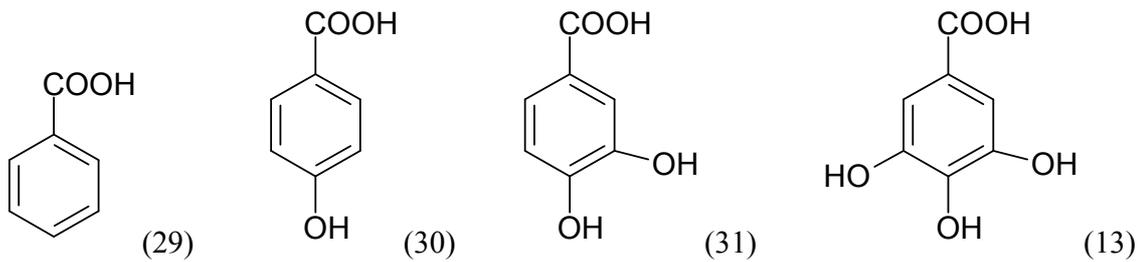
El ácido fenil acético a 1 mg/ml resultó con mejor actividad antibacteriana, contra las cepas de *S. sonnei* y con actividad similar contra la cepa *S. flexneri*-2, comparado con los dos controles antimicrobianos (Gráfica 25). La presencia de los ácido benzoico y fenil acético en varias especies de plantas usadas tradicionalmente para tratar padecimientos gastrointestinales podrían explicar su uso en la medicina tradicional como agentes terapéuticos.



**Gráfica 25.** Porcentajes de inhibición a 1 mg/ml del ácido fenil acético, trimetoprima y sulfametoxazol.

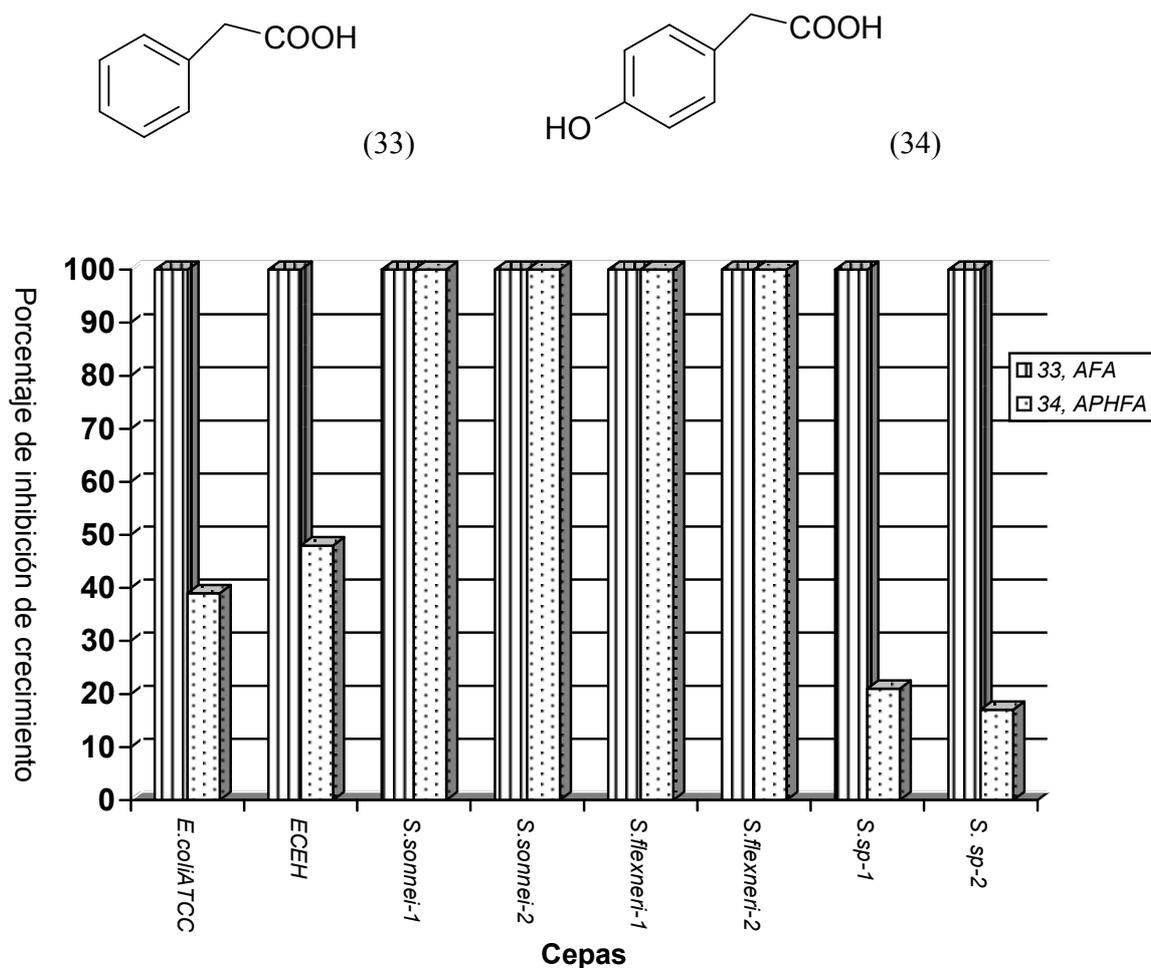
El análisis comparativo de los resultados de la tabla 21 permitió establecer las siguientes observaciones:

1) En cuanto a los ácidos benzoicos, la mayor actividad se observó cuando en el anillo aromático no hay funciones oxigenadas, así tenemos que el compuesto 29 que carece de hidroxilos es más activo que los compuestos 30, 31 y 13 que poseen uno, dos y tres oxígenos en el anillo, respectivamente (Gráfica 26).



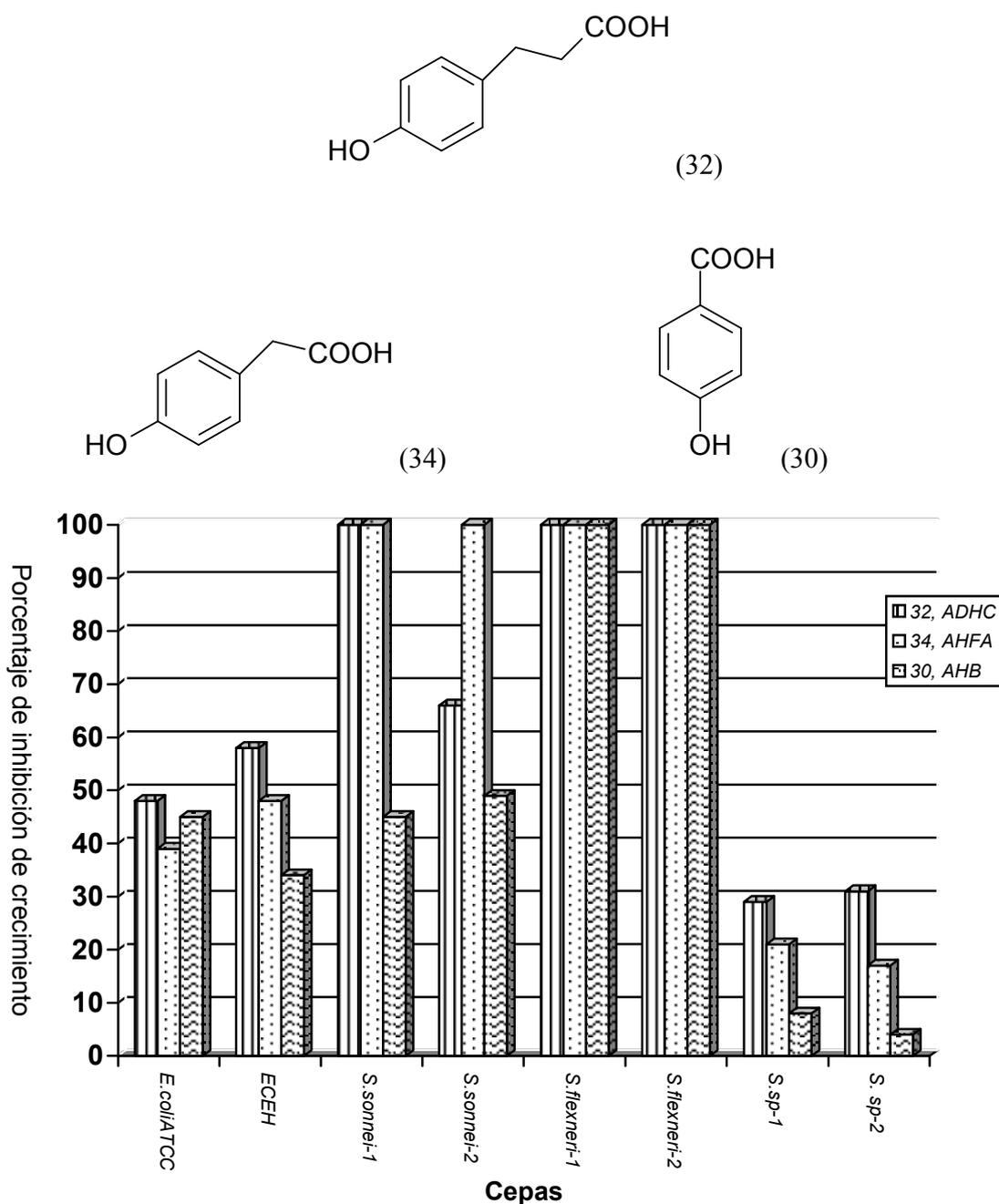
**Gráfica 26.** Porcentajes de inhibición del ácido benzoico (29), (AB); el ácido 4-hidroxi-benzoico (30), (AHB); el ácido 3,4-dihidroxi-benzoico (31), (ADB) y el ácido gálico (13), (AG).

2) En cuanto a los ácidos fenil acéticos, igual que en el caso anterior, la mayor actividad se observó cuando en el anillo aromático no hay funciones oxigenadas, el compuesto 33 que carece de hidroxilos fue más activo que el compuesto 34 que posee un hidroxilo en el anillo (Gráfica 27).



**Gráfica 27.** Porcentajes de inhibición del ácido fenil acético (33), (AFA) y del ácido *para*-hidroxi-fenil acético (34), (APHFA).

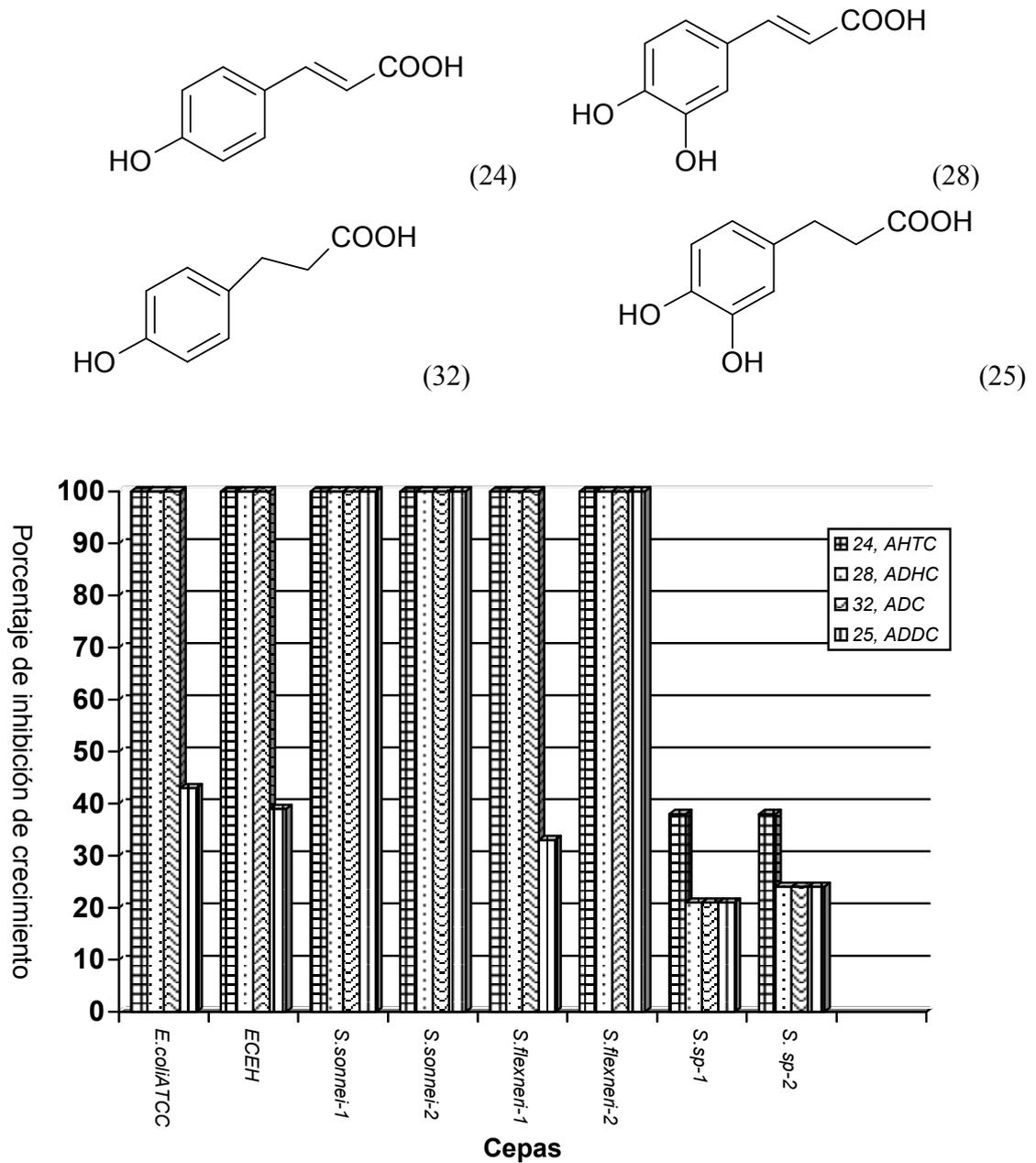
3) En los ácidos fenólicos monohidroxilados, la mayor actividad se observó cuando la cadena adyacente del ácido carboxílico tiene dos carbonos, el compuesto 32 con dos carbonos fue más activo que los compuestos 34 y 30 que poseen uno o ningún carbono (Gráfica 28).



**Gráfica 28.** Porcentajes de inhibición del ácido 2,3-dihidro-4'-hidroxi-cinámico (32), (ADHC); el ácido 4'-hidroxi-fenil acético (34), (AHFA) y el ácido 4-hidroxi-benzoico (30), (AHB).

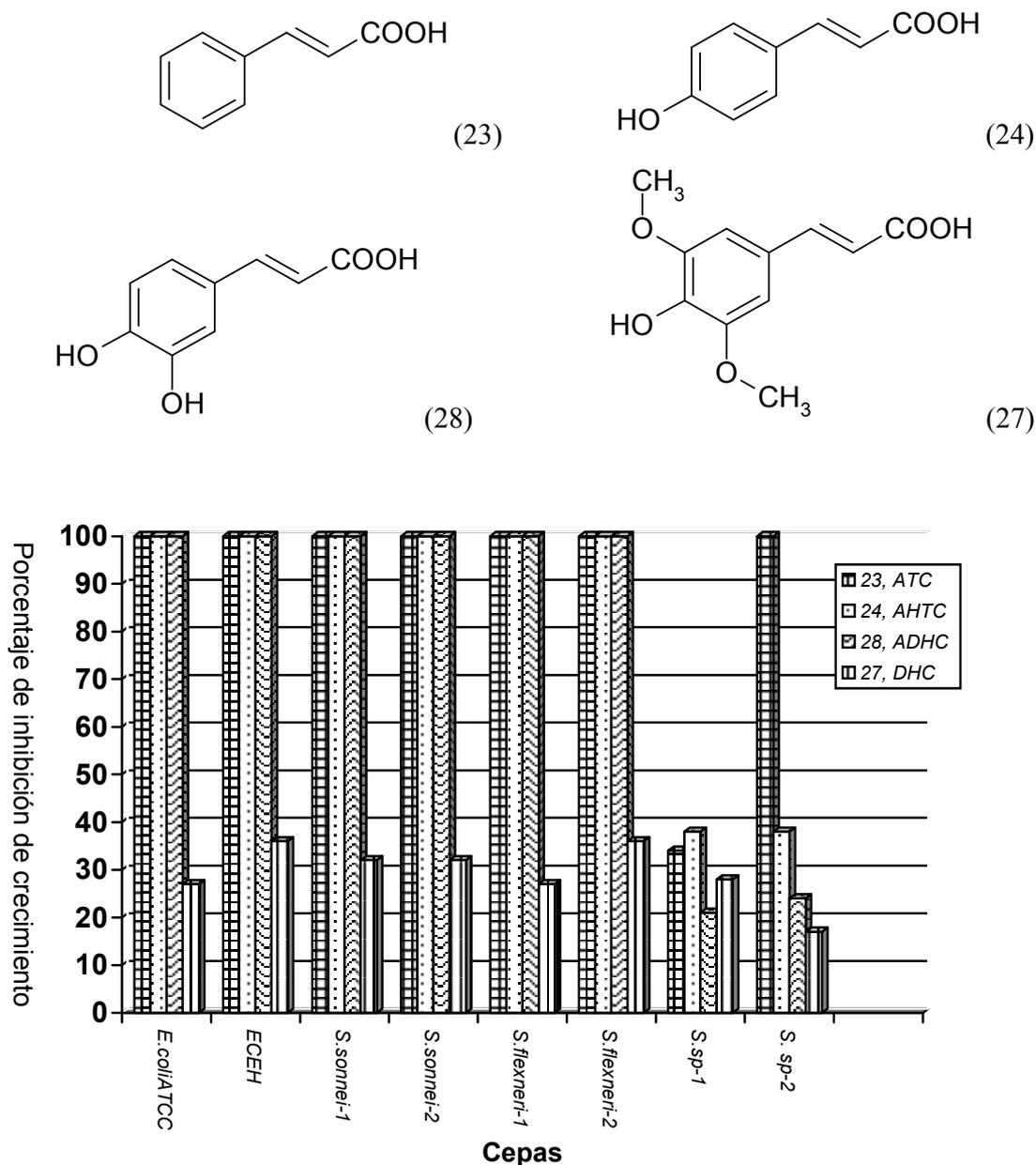
4) Para los ácidos cinámicos, el doble enlace entre los carbonos C2/C3 adyacente al ácido carboxílico fue necesario para la actividad antibacteriana, así los compuestos 24 y 28 que tienen este doble enlace fueron más activos que los compuestos 32 y 25 que no lo tienen. En consecuencia es posible que la actividad antibacteriana de los compuestos del tipo ácido cinámico

se encuentre relacionada con la geométrica plana que se da entre el anillo aromático y el doble enlace (Gráfica 29).



**Gráfica 29.** Porcentajes de inhibición del ácido 4-hidroxi-*trans*-cinámico (24), (AHTC); el ácido 3',4'-dihidroxi-cinámico (28), (ADC); el ácido 2,3-dihidro-4'-hidroxi-cinámico (32), (ADHC) y el ácido 2,3-dihidro-3',4'-dihidroxi-cinámico (25), (DAC).

5) En los ácidos cinámicos, la mayor actividad se observó cuando en el anillo aromático no hay funciones oxigenadas; el compuesto 23 que carece de hidroxilos fue más activo que los compuestos 24, 28 y 27 que poseen uno, dos y tres oxígenos en el anillo (Gráfica 30).



**Gráfica 30.** Porcentajes de inhibición del ácido *trans*-cinámico (23), (ATC); el ácido 4-hidroxi-*trans*-cinámico (24), (AHTC); el ácido 3',4'-dihidroxi-cinámico (28), (ADC) y el ácido 3',5'-dimetoxi-4'-hidroxi-cinámico (27), (DHC).

## X. CONCLUSIONES

La herencia medicinal de nuestros antepasados nos llena de orgullo e interés, además de que en México debería existir el deseo de la preservación de las tradiciones culturales mexicanas, esto aunado a que las plantas medicinales ofrecen una amplia fuente de nuevos productos naturales, frecuentemente con actividades biológicas interesantes y esto se demuestra con los resultados globales de esta investigación.

Con la información etnomédica existente en los bancos de datos referente a las plantas usadas en las prácticas médicas alternativas de México para el tratamiento de la diarrea y la disentería se realizó el rastreo con 26 plantas obteniéndose el potencial antibacteriano de estas, concluyendo que los bancos de datos tienen una información fiable para poder seleccionar a las plantas medicinales mexicanas.

Los resultados derivados de la evaluación de la actividad antibacteriana de las 26 plantas seleccionadas validan el uso de estas plantas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, tales como la diarrea y disentería. También los resultados sugieren que por lo menos una parte de su acción es debido a sus propiedades antibacterianas. Esta es la primera evaluación de estas plantas contra patógenos bacterianos aislados, los cuales causan diarrea y disentería en la población mexicana. Estos resultados condujeron a una base de datos que permita seleccionar las plantas con actividad antibacteriana y proseguir con su estudio fitoquímico biodirigido, aislando e identificando los compuestos responsables de la actividad antibacteriana y así contribuir en el conocimiento de las propiedades farmacológicas de estas especies de plantas.

De este estudio podemos concluir que los extractos que tuvieron poca actividad son susceptibles de analizarlo mediante una metodología fitoquímica biodirigida debido a que conforme se van separando los constituyentes de la planta se va encontrando una actividad mayor y así se podrían encontrar compuestos con actividad antibacteriana buena. En el caso de *C. pulcherria*, *Ch. pentadactylon*, *C. nucifera*, *T. vulgaris*, *G. mexicanum* (R y PA), *H. excelsa* y *P. granatum* que son plantas con actividad significativa contra enteropatógenos, son las candidatas idóneas a priori para su posterior estudio fitoquímico. Además de que para las plantas *C. pulcherria*, *C. nucifera* y *G. mexicanum* son escasos los estudios químicos y biológicos que se le han encontrado, por lo que se podrían encontrar novedosos compuestos con actividad farmacológica (Alanís *et al.*, 2005).

De la determinación del potencial antibacteriano de 26 plantas usadas en la medicina

tradicional mexicana para el tratamiento de la diarrea y la disentería se seleccionó por discriminación del efecto farmacológico a una de las especies más activas *P. granatum*, concluyendo que mediante el estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico de la cáscara de *P. granatum* se pudieron aislar 14 compuestos: ácido gálico, ácido elágico,  $\beta$  sitosterol, ácido ursólico, ácido oleanólico, 1,4-dimetil malato, metil galato, trimetil malato, araquidato de metilo, behenato de metilo, estearato de metilo, hexacosanoato de metilo, linoleato de metilo y palmitato de metilo. Con estos resultados podemos concluir que nuestra hipótesis es cierta ya que se encontraron los compuestos con actividad antibacteriana aislados mediante el método fitoquímico biodirigido utilizado. Algunos compuestos que se obtuvieron del pericarpio, se han encontrado en otras partes de la planta, por lo que podemos decir que el perfil metabólico de las partes de la planta en donde se ha encontrado este tipo de metabolitos es similar.

*P. granatum* es una planta medicinal con actividad antibacteriana significativa contra enteropatógenos causantes de diarrea y disentería y nos sugiere que la planta es un potencial útil como un método alternativo para el tratamiento de infecciones entéricas. Concluimos que por lo menos una parte de su acción o efectividad es debido a sus propiedades antibacterianas y con los resultados obtenidos se demuestran las propiedades antibacterianas de *P. granatum* y productos derivados contra los aislados patógenos causantes de diarrea y disentería en la población mexicana. También se contribuyó al conocimiento químico de esta especie ya que de la cáscara de granada no se había descrito que contenía ácido gálico,  $\beta$  sitosterol, 1,4-dimetil malato, ácido ursólico, ácido oleanólico, metil galato, trimetil malato y los seis ésteres metílicos de ácidos grasos. Los resultados de este estudio validan el uso de esta parte de la planta en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales tales como diarrea y disentería; proporcionando evidencia científica para posteriores estudios de desarrollo de fármacos.

Los compuestos encontrados en las fracciones del ensayo biodirigido del extracto activo, muestran una alta actividad antibacteriana especialmente por la presencia del metil galato, trimetil malato, ácido gálico, ácido elágico y la mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos. La actividad demostrada por el trimetil malato y el metil galato permite proponerlos como candidatos al desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos.

Como las enfermedades gastrointestinales son uno de los principales problemas de salud en México se deben tomar en cuenta a los compuestos metil galato, ácido gálico y ácido elágico además de la actividad antibacteriana demostrada se les han demostrado la actividad antiprotozoaria contra

*Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*, ambas causantes de diarrea (Alanís, 2000; Alanís *et al.*, 2003; Calzada *et al.*, 1999), por lo que podemos concluir que estos compuestos son candidatos idóneos para realizarles estudios *in vivo* y de toxicidad para poder llevarlos a la clínica.

En general con los ácidos fenólicos analizados se pudo determinar el efecto que hay en la actividad antibacteriana con el incremento de las funciones oxigenadas, largo de la cadena e instauraciones. Con el incremento de las funciones oxigenadas en el anillo aromático decrece la actividad antibacteriana. En cuanto a lo largo de la cadena se encontró que el incremento de la cadena aumenta la actividad antibacteriana. El análisis de la ausencia o presencia del doble enlace dio como resultado que cuando el compuesto tiene esta instauración su actividad es superior que si no la tiene, así se contribuyó al conocimiento de las propiedades antibacterianas de 14 ácidos fenólicos, conociendo las variaciones estructurales que se necesitan para tener actividad contra estas enterobacterias.

Con este trabajo se demuestra que la selección de plantas mediante el criterio etnobotánico en colaboración con otros expertos y su estudio mediante el empleo de procedimientos fitoquímicos biodirigidos constituyen métodos adecuados para la obtención de compuestos con actividad biológica. Contribuyendo al conocimiento de la flora medicinal de México, para así evitar que se pierda el conocimiento tradicional de esta planta medicinal.

Es una satisfacción poder contribuir con evidencia científica a la investigación de las plantas medicinales en México para el beneficio de la población y poder así aumentar el porcentaje de las especies estudiadas con una metodología biodirigida.

En cuanto al desarrollo de formación de recursos humanos hasta el momento podemos decir que 2 estudiantes de licenciatura lograron obtener el grado en la obtención de los principios antibacterianos de las especies *H. excelsa* y *T. vulgaris*, un estudiante de licenciatura realiza la obtención de los principios antibacterianos de la especie *Chirantodendron pentadactylon*, un estudiante de maestría trabaja con la especie de *G. mexicanum*. Todos estos estudiantes contaron con la asesoría de la que suscribe esta tesis. De los resultados encontrados en el rastreo se generaron estos proyectos y se generarán otros proyectos científicos además de más formación de recursos humanos.

## **XI. RECOMENDACIONES**

Se recomienda que cuando se seleccione una planta medicinal para su estudio fitoquímico biodirigido, se realice una revisión exhaustiva en el banco de datos acerca de plantas con uso en las prácticas médicas alternativas; para que de la investigación que se haga se obtengan resultados satisfactorios.

Es recomendable que el estudio fitoquímico de plantas se lleve a cabo de manera biodirigida, ya que hay veces que solo se aísla el compuesto mayoritario o hasta que obtienen este y otros compuestos les realizan la evaluación farmacológica. Para poder obtener los compuestos en cantidad suficiente para poder evaluarlos, se recomienda que para el estudio se recolecte el material vegetal en cantidades de por lo menos 10 kilos. Además de que la parte de la planta que se estudie sea cualquiera menos la raíz para evitar su posterior extinción.

La utilización de las cepas enterobacterianas obtenidas de aislados patógenos de pacientes pediátricos mexicanos, fue con el fin de poder obtener compuestos, fracciones o extractos que inhiban a las cepas por las cuales la población infantil mexicana sea propensa a padecer diarrea o disentería.

Con respecto a la evaluación farmacológica podemos recomendar con la experiencia adquirida que la lectura del crecimiento bacteriano se puede realizar a las 24 horas, solo en caso de que uno tenga la duda de si hubo crecimiento o no, se recomienda esperar las 48 horas que marca la técnica.

## **XII. SUGERENCIAS PARA TRABAJO FUTURO**

Se sugiere que para trabajos futuros que se requiera seleccionar plantas para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, tales como diarrea y disentería referentes a agentes bacterianos, se haga uso de los datos que contiene el análisis de los porcentajes de inhibición de los 56 extractos (Alanís et al., 2005). También que se seleccionen las plantas que casi no tengan estudios químicos y farmacológicos.

También se sugiere continuar con estudios *in vivo*, de toxicidad, preclínicos y clínicos de los compuestos activos, en particular con los compuestos activos, metil galato y trimetil málico; así como del extracto de *P. granatum* para poder desarrollar nuevos fármacos o fitofármacos antibacterianos. También se sugiere realizar la purificación de todas las fracciones en las cuales se obtuvieron porcentajes de inhibición mayores el 50 %.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abramov, V. (1996). Health communications and public relations, WHO, Geneva. [www.who.int/inf-fs/en/fact134.html](http://www.who.int/inf-fs/en/fact134.html)
- Afaq, F., Sallem, M., Krueger, C. G., Reed, J. D., Mukhtar, H. (2005). Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF-kappaB pathways and inhibits skin tumorigenesis in CD-1 mice. *International Journal of Cancer*. 113 (3):423-433.
- Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S., (1994). Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica, 1st ed. IMSS, México.
- Aguilar, M. M. O. (1998). Aislamiento de los compuestos con actividad antimicrobiana de las partes aéreas de *Helianthemum glomeratum* Lag. Tesis, FES Iztapalapa, UNAM.
- Ajaikumar, K.B., Asheef, M., Babu, B. H., Padikkala, J. (2005). The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*. 96 (1-2):171-176.
- Alanís, R. A. D. (2000). (-)Epi-catequina, principio con actividad antiprotozoaria *in vitro* contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* contenido de las partes aéreas de *Rubus coriifolius* Focke (Rosaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química, UNAM.
- Alanís, A. D. Calzada, F. Cedillo-Rivera, R. Meckes, M. (2003). Antiprotozoal activity of the constituents of *Rubus coriifolius*. *Phytotherapy Research*. 17 (6):681-682.
- Alanís, A. D. Calzada, F. Cervantes, J. A. Torres, J. Cevallos, G. M. (2005). Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*. 100:153-157.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. P. (1994). Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc. N.Y. & London E.U. 45-46, 478.
- Almaguer, G. J. A., Vargas, V. V., Ruiz, B. A. (2002). Fortalecimiento y desarrollo de la medicina tradicional mexicana y su relación intercultural con la medicina tradicional. Secretaría de Salud. Dirección de Medicina Tradicional.
- Amorim, L.F., Catanho, M.T., Terra, D.A., Brandao, K.C. Holanda, C.M., Jales-Junior, L.H. Brito, L.M. Gomes, M.L. De Melo, V.G. Bernardo-Filho, M. Cavalcanti-Jales R.L. (2003). Assessment of the effect of *Punica granatum* (pomegranata) on the bioavailability

- of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate ( $^{99m}\text{Tc}$ ) in Wistar rats. *Cell Mol Biol.* 49(4):501-507.
- Anesini, C., Perez, C. (1993). Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology.* 39 (2):119-128.
- Aranda, T. F. (1996). Guía de México Desconocido. Plantas que curan. Edición especial, guía 29. Editorial Jilguero SA de CV. Septiembre. 63.
- Armstrong, D., Cohen, J. (1999). Infectious diseases. Mosby. Harcourt Publishers Ltd. Barcelona, España. 8, 17:1-9.
- Arreche, A. G., Vanaclocha, B. V, Güenechea, J. I. S., Martínez, R. C. (1998). Fitoterapia. Vademécum de prescripción de plantas medicinales. Tercera edición. Masson, S.A. Barcelona.
- Arredondo, G. J. L., Hernández, T. M. (1998). Diarrea infecciosa. En: Subdirección General de Investigación. Instituto Nacional de Perinatología. Ed. Shering-Plough.
- Aviram, M., Dornfeld, L., Kaplan, M., Coleman, R., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Rosenblat, M., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Hayek, T., Fuhrman, B (2002). Pomegranate juice flavonoids inhibit low-density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. *Drugs under Experimental Clinical Research.* 28 (2-3):49-62.
- Aviram, M., Rosenblat, M., Gaitini, D., Nitecki, S., Hoffman, A., Dornfeld, L., Volkova, N., Presser, D., Attias, J., Liker, H., Hayek, T. (2004). Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition.* 23 (3):423-433.
- Balandrin, M. F., Klocke, J. A., Wurtele, E. S., Bollinger, H. W. (1985). Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science.* 228:1154-60.
- Bagozzi, D. (2001). Communications Officer, Health technology and pharmaceuticals, WHO, [www.who.int/](http://www.who.int/)
- Bennish, M. (1997). Tratamiento de diarrea infecciosa: el papel de la terapéutica antimicrobiana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología.* 17 (69):179-186.
- Braga, L. C., Shupp, J. W., Cummings, C., Jett, M., Takahashi, J. A., Carmo, L. S., Chartone-Souza, E., Nascimento, A. M. A. (2005). Pomegranate extract inhibits *Staphylococcus aureus* growth and subsequent enterotoxin production. *Journal of Ethnopharmacology.* 96

(1-2):335-339.

- Cañigüeral, S. (2002). La fitoterapia ¿Una terapéutica para el tercer milenio? En: *Revista de Fitoterapia*. Barcelona. 2 (2):101-120.
- Calzada, F. B. (2000). Proantocianidinas de tipo A y flavonoles con actividad antiprotozoaria de *Geranium niveum* S. Watson (Geraniaceae) y *Conyza filagidoides* (D.C.) Hieron (Asteraceae). Tesis, Facultad de Química, UNAM.
- Calzada, F., Cerda-García, R., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., Bye, R., Mata, R. (1999). Geranins A and B, new antiprotozoal A-type proanthocyanidins from *Geranium niveum*. *Journal Natural Products*. 62:705-709.
- Carnevale, R. Molback, K. Bager, F. Aarestrup, F. M.(2000).Fluoroquinolone resistance in Salmonella a web discussion. *Clin Infect Dis*. 31 (1):128-130.
- Cerda, B., Espin, J. C., Parra, S., Martínez, P., Tomas-Barberan, F. A. (2004). The potent *in vitro* antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of healthy humans. *European Journal of Nutrition*. 43 (4):205-220.
- Cerda, B., Llorach, R., Ceron, J. J., Espin, Tomas-Barberan, F. A. (2003). Evaluation of the bioavailability and metabolism in the rat of punicalagin, an antioxidant polyphenol from pomegranate juice. *European Journal of Nutrition*. 42 (1):18-28.
- Chidambara, M. K. N., Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P. (2002). Studies on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel extract using *in vivo* models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 14, 50(17):4791-4795.
- Coello-Ramírez, P., Madrazo-de la Garza, A., Séller-Rouassant, S., Larrosa-Haro, A., García-Aranda, J. A. (2001). Diarrea crónica. *Boletín Médico Hospital Infantil de México*. 58:491-498.
- Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. (1995). Collins and Lyne's, Microbiological Methods. Septima edition. Butterworth-Heinemann Ltd, Great Britain. 308 309, 322, 324.
- Cordell, G. A., Colvard, M. D. (2005). Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 100:5-14.
- Cordero, C. (2002). La industria farmacéutica en busca de nuevos elementos: explora la biodiversidad. Conabio. 1-4.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*.12

(4):564-582.

- Cox, P. A., Balick, M. J. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery. *Scientific American*. 82 87.
- Cutler, S. J., Cutler, H. G. (2000). Biologically active natural products: pharmaceutical. CRC Press. USA. 1-2, 7, 25 26, 46
- Das, A. K., Mandal, S. C., Banerjee, S. K., Sinha, S., Das, J., Saha, B. P., Pal, M. (1999). Studies on antidiarrhoeal activity of *Punica granatum* seed extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 68: 205-208.
- Das, A. K., Mandal, S. C., Banerjee, S. K., Sinha, S., Saha, B. P., Pal, M. (2001). Studies on the hypoglycaemic activity of *Punica granatum* seed in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytotherapy Research*. 15 (7):628-629.
- El-Toumy, S. A., Rauwald, H. W. (2002). Two ellagitannins from *Punica granatum* heartwood. *Phytochemistry*. 61 (8):971-974.
- El-Toumy, S. A., Rauwald, H. W. (2003). Two new ellagic acid rhamnosides from *Punica granatum* heartwood. *Planta Medica*. 69:679-682.
- Espinosa, G. V. (1994). Flora medicinal indígena de México I. Instituto Nacional Indigenista. 1ª edición. México.
- Evans, W.C. (1991). Farmacognosia Trease-Evans. 13ava edición. Interamericana. McGraw-Hill. 3, 743.
- Fatope, M. O., Al Burtomani, S. K., Takeda, Y. (2002). Monoacylglycerol from *Punica granatum* seed oil. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 16, 50 (2):357-360.
- Fyhrquist, P., Mwasumbi, L., Haeggström, C.-A., Vuorela, H., Hiltunen, R., Vuorela P. (2002). Ethnobotanical and antimicrobial investigation on some species of *Terminalia* and *Combretum* (Combretaceae) growing in Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology*. 79:169-177.
- Gharzouli, K., Khennouf, S., Amira, S., Gharzouli, A. (1999). Effects of aqueous extracts from *Quercus ilex* L. root bark, *Punica granatum* L. fruit peel and *Artemisia herba-ala* Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. *Phytotherapy Research*. 13 (1):42-45.
- Goodman, G. A., Rall, T. W., Nies, A. S., Taylor, P. (1995). Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 11 edition. Pergamon Press. E. U. 2, 914-931, 1018.

- Guevara, J. M., Chumpitaz, J., Valencia, E. (1994). The *in vitro* action of plants on *Vibrio cholerae*. *Revista de Gastroenterología del Perú*. 14 (1):27-31.
- Guía (1996). Guía México Desconocido. Plantas que curan. Edición especial, editorial Jilguero SA de CV. número 29. Septiembre.
- Gracious, R. R., Selvasubramanian, S., Jayasundar, S. (2001). Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits- a preliminary study. *Journal of Ethnopharmacology*. 78:85-87.
- Handley, K. S., Petry, J. J. (1999). Medicinal Herbs: A primer for primary care. Clinical experience, *Hospital Practice* June 15:105-123.
- Hanes, D. E., Robl, M. G., Schneider, C. M., Burr, D. H. (2001). New Zealand white rabbit as a nonsurgical experimental model for *Salmonella enterica* gastroenteritis, *Infection and Immunity*. 69 (10):6523-6526.
- Harrison, C. J. (1995). Perspectives on newer oral antimicrobials: what do they add?. *Pediatric Infectious Disease*. 14:436-444.
- Heinrich, M. (2000). Ethnobotany and its role in drug development. *Phytotherapy Research*. 14:479-488.
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., García, C. D. A., Nakamura, A. V., Dias, F. B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97 (7):1027-1031.
- Hora, J. J., Maydew, E. R., Lansky, E. P., Dwivedi, C. (2003). Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. *Journal of Medicinal Food*. 6 (3):157-161.
- Hostettmann, K., Marston, A., Maillard, M., Hamburger, M. (1995). Proceedings of the phytochemical society of Europe. Phytochemistry of plants used in traditional medicine. New York. Oxford. 1-77.
- House, P. R., Lagos-Witte, S., Ochoa, L. (1995). Plantas medicinales comunes de Honduras. 1ª edición, Litografía López S de R L. Honduras. 385.
- Huerta, C. (2002). La herbolaria: mito o realidad. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. 1-6.
- Huerta, C. (1997). La herbolaria. Biodiversitas. Boletín bimestral de la Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Año 3, 12:1-7.

- Jafri, M. A., Islam, M., Javed, K., Singh, S. (2000). Effect of *Punica granatum* Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 70:309-314.
- Jiménez. M. C. A., Rojas, H. N. M., Lopez, A. A. M. (1979). Biological evaluation of Cuban plants. IV. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 31 (1):29-35.
- Kawaii, S., Lansky, E. P. (2004). Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Journal of Medicinal Food*. 7 (1):13-18.
- Kim, N. D., Mehta, R., Yu, W., Neeman, I., Lyvney, T., Amichay, A., Poirier, D., Nicholls, P., Kirby, A., Jiang, W., Mansel, R., Ramachandran, C., Rabi, T., Kaplan, B., Lansky, E. (2002). Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*. 71 (3):203-217.
- Kim, H.S. (2005). Do not put too much value on conventional medicines. *Journal of Ethnopharmacology*. 100:37-39.
- Kohno, H., Suzuki, R., Yasui, Y., Hosokawa, M., Miyashita, K., Tanaka, T. (2004). Pomegranate seed oil rich in conjugated linolenic acid suppresses chemically induced colon carcinogenesis in rats. *Cancer Science*. 95 (6):481-486.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Sommers, H. M. (1990). Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana. México. 40-63.
- Lennette, E. H., Balows, A., Hausler, Jr. J. W., Truant, P. J. (1980). Manual of clinical microbiology. Third edition. American Society for Microbiology. 460-461.
- Li, Y., Wen, S., Prasad, B. K., Peng, G., Quian, G. L., Yamahara, J., Roufogalis, B. D. (2005). *Punica granatum* flower extract, a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 99 (2):, 239-244.
- Lozoya, X., Aguilar, A., Camacho, J. R. (1987). Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana. *Revista Médica IMSS*. 25 (4):16-24.
- Longtin, R. (2003). The pomegranate: Nature's power fruit?. *Journal of the National Cancer Institute*. 95 (5):346-348.
- Machado, T. B., Pinto, A. V., Pinto, M. C., Leal, I. C., Silva, M. G., Amaral, A. C., Kuster, R.

- M., Netto-dosSantos, K. R. (2003). *In vitro* activity of brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 21 (3):279-284.
- Machado, T. B., Leal, I. C., Amaral, A. C., Netto-dosSantos, K. R., Silva, M. G., Kuster, R. M. (2002). Antimicrobial ellagitannins of *Punica granatum* fruits. *Journal Brazilian Chemical Society*. 13 (5):606-610.
- Martínez, M. (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México. 325.
- Mata, R. (2002). Exploring natural products from mexican biodiversity as source of potencial medicinal agents. *Revista de Fitoterapia*. 50<sup>th</sup> International Congress. Society for Medicinal Plant Research. Barcelona. Septiembre. PL 12 Volumen 2. Suplemento 1. 44.
- McLaughlin, J. L. (1991). Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. (en: *Methods in plant biochemistry*). Series editors Dey P.M. and Harborne J.B., edited by Hostettmann. Academic Press. 2-3.
- Morales, E. R., González-Valencia, G., Muñoz, O., Torres, J. (1993). Production of cytotoxins and enterotoxins by strains of *Shigella* and *Salmonella* isolated from children with bloody diarrhea. *Archives of Medical Research*. 24 (1):13-21.
- Mori-Okamoto, J., Otawara-Hamamoto, Y., Yamamoto, H., Yoshimura, H. (2004). Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 92 (1):93-101.
- Morsy, T. A., Mazyad, S. A., el-Sharkawy, I. M. (1998). The larvicidal activity of solvent extracts of three medicinal plants against third instar larvae of *Chrysomya albiceps*. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 28 (3):699-709.
- Morton, J. F. (1981). Atlas of medicinal plants of middle America, Bahamas to Yucatán. Charles C. Thomas Publisher. USA. 613-614.
- Mota, F. H. (2002). Diarrea aguda e infecciones respiratorias: caras nuevas de viejos conocidos. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*. 45 (3):103-109.
- Murthy, K. N., Reddy, V. K., Veigas, J. M., Murthy, U. D. (2004). Study on wound healing activity of *Punica granatum* peel. *Journal of Medicinal Food*. 7 (2):256-259.
- Nair, R. y Chanda, S. 2005. Anticandidal activity of *Punica granatum* exhibited in different

- solvents. *Pharmaceutical Biology*. 43 (1):21-25.
- Neurath, A. R., Strick, N., Li, Y. Y., Debnath, A. K. (2004). *Punica granatum* (Pomegranate) juice provides an HI-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infectious Diseases*. 14, 4 (1):41.
- Noda, Y., Kaneyuki, T., Mori, A., Packer, L. (2002). Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2, 50 (1):166-171.
- Ocegueda, S. Moreno, E. Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. Biodiversitas. Boletín bimestral de la Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. 62: 12-14.
- Olarte, J. (1992). Etiología de las diarreas infecciosas: viejos y nuevos agentes. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 49:143-150.
- Perez, C., Anesini, C. (1994). *In vitro* antibacterial activity of Argentine folk medicinal plants against *Salmonella typhi* *Journal of Ethnopharmacology*. 44 (1):41-6.
- Perry, E. K., Pickering, A. T., Wang, W. W., Houghton, P. J., Perry, N. L. (1999). Medicinal plants and alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 51:527-534.
- PLM (2005). Diccionario de especialidades farmacéuticas, edición 51, México.
- Prakash, A. O., Saxena, V., Shukla, S., Tewari, R. K., Mathur, S., Gupta, A., Sharma, S., Mathur, R. (1985). Anti-implantation activity of some indigenous plants in rats. *Acta European Fertilitatis*. 16 (6):441-448.
- Prashanth, D., Asha, M. K., Amit, A. (2001a). Antibacterial activity of *Punica granatum*. *Fitoterapia*. 72:171-173.
- Prashath, D., Padmaja, R., Samiulla, D. S. (2001b). Effect of certain plant extracts on alpha-amylase activity. *Fitoterapia*. 72 (2):179-181.
- Raj, R. K. (1975). Screening of indigenous plants for antihelminthic actino against human *Ascaris lumbricoides*: Part-II. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 19:1.
- Reploge, M. L. Fleming, D. W. Cieslak, P. R. (2000). Emergence of antimicrobial-resistant shigellosis in Oregon. *Clin Infect Dis*. 30 (3):515-519.
- Rojas, A. M. (1999). The virtual healer. Tlahui-Medic. México. 7:1.  
[www.tlahui.com/medic/medic7/granada.htm](http://www.tlahui.com/medic/medic7/granada.htm)

- Ross, I. A. (1999). Medicinal plants of the world chemical constituents traditional and modern medicinal uses. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey, USA. 273-279.
- Ross, R. G., Selvasubramanian, S., Jayasundar, S. (2001). Immunomodulatory activity of *Punica granatum* in rabbits- a preliminary study. *Journal of Ethnopharmacology*. 78: 85-87.
- Sastravaha, G, Yotnuengnit, P., Booncong, P., Sangtherapitikul, P. (2003). Adjunctive periodontal treatment with *Centella asiatica* and *Punica granatum* extracts. A preliminary study. *Journal of the International Academy of Periodontology*. 5 (4):106-115.
- Schubert, S. Y., Neeman, I., Resnick, N. (2002). A novel mechanism for the inhibition of NF-kappaB activation in vascular endothelial cells by natural antioxidants. *FASEB Journal*. 16 (14):1931-1933.
- Schubert, S. Y., Resnick, N., Neeman, I (1999). Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*. 66 (1):11-17.
- Schulz, V., Hänsel, R., Tyler, V. E. (2001). Rational Phytotherapy. A physicians' guide to herbal medicine. 4 edición, Springer, Germany, 232.
- Seeram, N. P., Lee, R., Heber, D. (2004). Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellagitannins from pomegranate (*Punica granatum* L.) juice. *Clinical Chimica Acta*. 348 (1-2):63-68.
- Segura, J. J., Morales-Ramos, L. H., Verde-Star, J., Guerra, D. (1990). Growth inhibition of *Entamoeba histolytica* and *E. invadens* produced by pomegranate root (*Punica granatum* L.). *Archivos de Investigación Médica*. 21 (3):235-239.
- Singh, R. P., Chidambara Murthy, K. N., Jayaprakasha, G. K. (2002). Studies on the oxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2, 50 (1):81-86.
- Singhal, K. C. (1983). Anthelmintic activity of *Punica granatum* and *Artemisia siversiana* against experimental infections in mice. *The Indian Journal of Pharmacology*. 15 (2):119-122.
- SS, Secretaría de Salud.(1993). Guía para el manejo efectivo de niños con enfermedad diarreica y pacientes con cólera. S. S. A. 7ª. Ed. México. Ed. Mota, H. F.
- SS, Secretaría de Salud. Kumate, J. Biseca, T. C. Sanfilipo, B. J. (1993a). La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana. Secretaría de Salud. Edición

- Conmemorativa. México. 11, 19.
- SS, Secretaría de Salud.(2003). Manual de vigilancia epidemiológica. DGE, México.  
<http://www.ssa.gob.mx/epide/2003/sem49/cua4.1.html>.
- Stahl, E. (1969). Thin-Layer chromatography, A Laboratory Handbook. Segunda edición.  
Springer-Verla. New York. 861-874.
- Suarez-Hoil, G. D., Flores-Abuxapoqui, J. J., Heredia-Navarrete, M. R. (1993). Prevalencia de bacterias enteropatógenas en niños con diarrea aguda con sangre. *Boletín Medico del Hospital Infantil de Mexico*. 50:151-156.
- Torregrosa, F. L., Santos, P. J. I., Rodríguez, S. R. S., Velásquez, J. L., García, A. J. A., Alpuche, A. C. M. (1996) Enfermedades diarreicas en el niño. Décima edición. Editorial Interamericana. México. 32-59, 83-97, 127 151, 170-186.
- Torres, J., González-Arroyo, S., Pérez, R., Muñoz, O. (1995). Inappropriate treatment in children with bloody diarrhea: clinical and microbiological studies. *Archives of Medical Research*. 26: 23-29.
- Tripathi, S. M., Singh, V. K., Singh, D. K. (2004). Enzyme inhibition by the molluscicidal agent *Punica granatum* Linn. Bark and *Canna indica* Linn. Root. *Phytotherapy Research*. 18 (7):501-506.
- Tripathi, S. M., Singh, D. K. (2000). Molluscicidal activity of *Punica granatum* bark and *Canna indica* root. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33 (11):1351:1355.
- Vademecum de prescripción (1998). Plantas Medicinales, tercera edición, editorial Masson, SA, Barcelona, España.243.
- van Elswijk, D. A., Schobel, U. P., Lansky, E. P., Irth, H., Van der Greef, J. (2004). Rapid dereplication of estrogenic compounds in pomegranate (*Punica granatum*) using on-line biochemical detection coupled to mass spectrometry. *Phytochemistry*. 65 (2):233-241.
- Vasconcelos, L. C., Sampaio, M. C., Sampaio, F. C., Higinio, J. S. (2003). Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses*. 46 (6-

5):192-196.

- Vidal, A., Fallarero, A., Pena, B. R., Medina, M. E., Gra, B., Rivera, F., Gutierrez, Y. (2003). Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 89 (2-3):295-300.
- Voet, D., Voet, J. (1992). Bioquímica. Ediciones Omega S.A. Barcelona. 283-287.
- Voravuthikunchai, S., Lortheeranuwat, A., Jeeju, W., Sririrak, T., Phongpaichit, S., Supawita, T. (2004). Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Ethnopharmacology*. 94 (1):49-54.
- Wang, R. F., Xie, W. D., Zhang, Z., Xing, D. M., Ding, Y., Wang, W., Ma, C., Du, L. J. (2004) Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (Pomegranate). *Journal of Natural Products*. 67 (1-2):2096-2098.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M. (1984). Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York Tokio. 301-304.
- Watanabe, H., Shibuya, T. (1999). Pharmacological research on traditional herbal medicines. Harwood Academia Publishers. Netherlands. 17, 31, 34, 41.
- Weniger, B., Robledo, S., Arango, G. J., Deharo, E., Aragón, R., Muñoz, V., Callapa, J., Lobstein, A., Antón, R. (2001). Antiprotoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 78:193-200.
- Wickes, F. H., Uri, L. J. (1898). Granatum (USP) Pomegranate. King's American Dispensatory. [www.ibiblio.org/herbmed/eclectic/kings/punica.html](http://www.ibiblio.org/herbmed/eclectic/kings/punica.html)
- WHO Organización Mundial de la Salud. (2002a). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Organización mundial de la salud Ginebra.
- WHO Organización Mundial de la Salud. (2002b). Pautas generales par alas metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Organización mundial de la salud Ginebra.
- WHO (2003). 56° Asamblea mundial de la salud. Décima sesión plenaria, 28 de mayo del 2003. WHA56.31.
- WHO (2004). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. 22 de junio del 2004. Ginebra. 1-3.
- Yesilada, E. (2005). Past and future contributions to traditional medicine in the health care

system of the middle-east. *Journal of Ethnopharmacology*. 100:135-137.

Zhang, J., Zhan, B., Yao, X., Gao, Y., Shong, J. (1995). Antibacterial activity of tannin from the pericarp of *Punica granatum* L. against genital Herpes virus *in vitro*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 20 (9):556-558.

## XIV. ANEXO I

### **A.I Caracterización estructural de los compuestos aislados del estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico del pericarpio de *P.granatum*.**

#### **A.I.1 Equipo utilizado para la caracterización estructural de los compuestos**

Los puntos de fusión se midieron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros en el IR (pastilla) se midieron en un espectrómetro Perkin Elmer 599. Los espectros de RMN se obtuvieron en los siguientes equipos: Varian 300, Varian UNITY PLUS 500 y Bruker DMX500, utilizando  $\text{CDCl}_3$  o  $\text{DMSO-d}_6$  como disolventes y TMS como referencia interna.

Los espectros de masas se registraron en un espectrofotómetro de masas, marca JEOL, modelo SX-102 A, tipo doble sector, geometría inversa, utilizando una matriz de glicerol. Para impacto electrónico, la temperatura de la cámara es de 300 °C, la temperatura de la línea de transferencia es de 300 °C, el rango de masas de 33 a 800 UMA y el estándar de calibración perfluorokeroseno.

El cromatógrafo de gases acoplado a espectroscopía de masas utilizado es de la marca Hewlett Packard, modelo 5890 serie II, con columna capilar clave HP-5MS (5 % metil fenil silicona), las dimensiones de longitud de 30 m, de diámetro interno de 0.31 mm, de espesor de la película 0.25  $\mu\text{m}$ , el gas acarreador fue Helio de alta pureza, la velocidad lineal es de 30 cm / Kg, relación de split 1:30 y la temperatura del inyector de 300 °C.

#### **A.I.2 Identificación de los compuestos obtenidos del fraccionamiento biodirigido.**

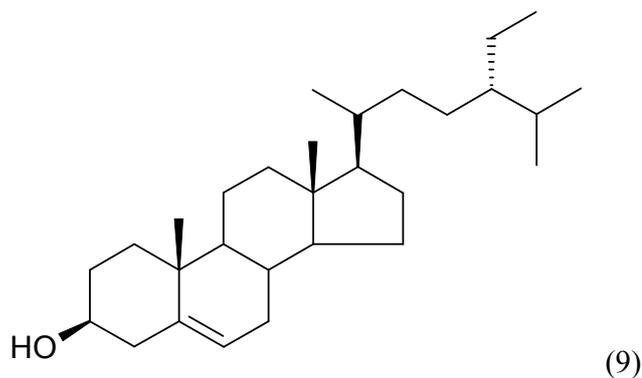
Al realizar el fraccionamiento del extracto metanólico del pericarpio de *Punica granatum* se aislaron los siguientes compuestos, que fueron identificados mediante métodos cromatográficos, espectroscópicos y espectrométricos:

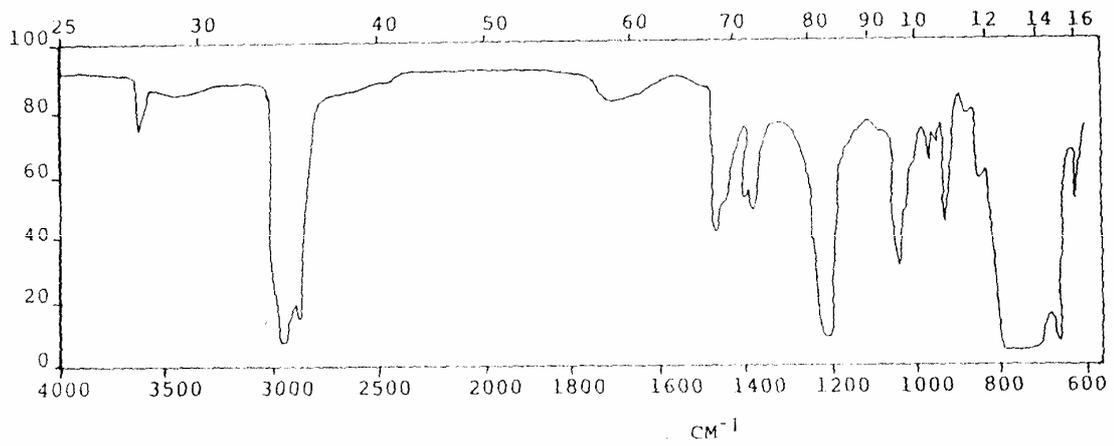
### A.I.2.1 Caracterización estructural del $\beta$ -sitosterol (9).

De la fracción primaria FP2 se obtuvo un sólido de color blanco que fue identificado como  $\beta$ -sitosterol mediante CCF con un estándar (ICN) y cuya cocromatografía fue uniforme, por comparación de sus espectros de IR y RMN. El esteroide tuvo un punto de fusión de 130-132 °C y reveló de color azul utilizando como agente cromógeno vainillina.

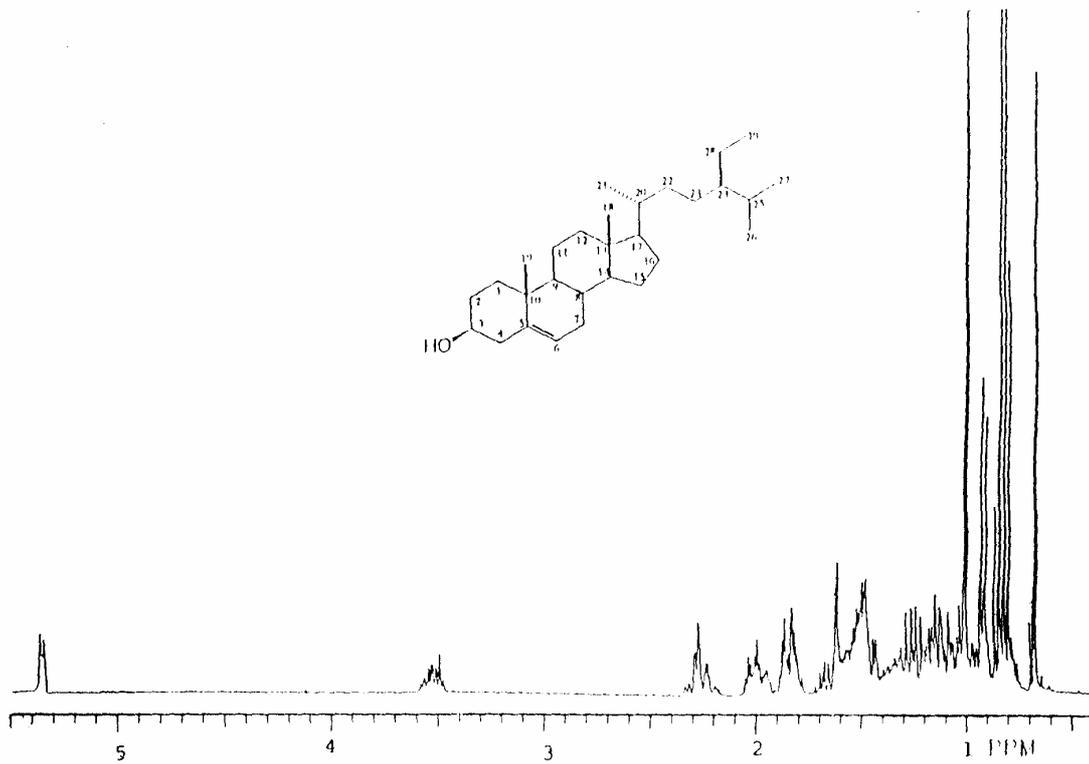
El espectro de infrarrojo (Espectro 1) mostró el perfil característico de un esteroide, a 3373  $\text{cm}^{-1}$  y 1050  $\text{cm}^{-1}$  bandas típicas para las vibraciones de OH y a 1636  $\text{cm}^{-1}$  para dobles enlaces; a 2933, 2867, 1462 y 1369  $\text{cm}^{-1}$  señales características para carbono e hidrógeno. Lo anterior permitió sugerir que este producto natural posee en su estructura un alcohol.

Estas observaciones fueron corroboradas con su espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 2) donde se observaron señales para un hidrógeno vinílico a 5.3 ppm; una señal ancha a 3.5 ppm que se asignó a un hidrógeno base de OH. Otro conjunto de señales simples a campo alto entre 0-2 ppm, sugirieron que este compuesto correspondía al esqueleto de un esteroide. Con la información anterior se concluyó que se trataba del  $\beta$ -sitosterol, esteroide conocido y ampliamente distribuido en la naturaleza.





Espectro 1. IR del  $\beta$  sitosterol



Espectro 2. RMN $^1\text{H}$  del  $\beta$  sitosterol

### A.I.2.2 Caracterización estructural del 1,4-dimetil malato (10).

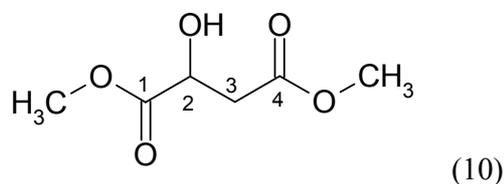
De la fracción primaria FP3 se obtuvo un sólido de color café claro que fue identificado como 1,4-dimetil malato.

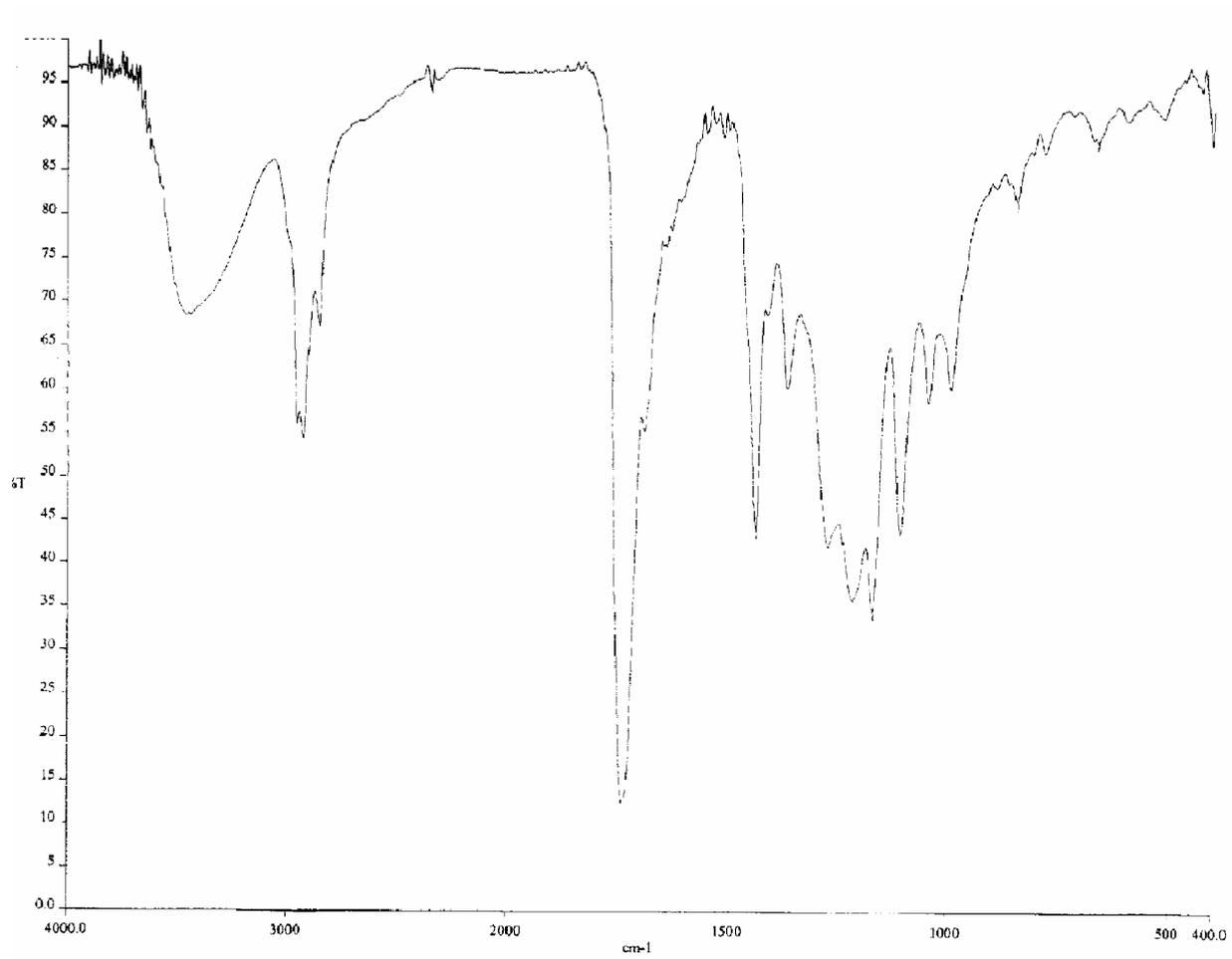
El espectro de IR (Espectro 3) mostró máximos de absorción para OH a 3459 y 1108  $\text{cm}^{-1}$ ; para C-H saturado a 2927, 2854, 1439 y 1368  $\text{cm}^{-1}$ ; para carbonilo de éster a 1740, 1217 y 1171  $\text{cm}^{-1}$ .

Las señales observadas en el espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 4) fueron las siguientes: se observó un doble de dobles a 4.5 ppm que integra para un hidrógeno atribuible al metino-2 base del alcohol, dos dobles de dobles a 2.79 y 2.88 ppm que integran para dos hidrógenos del metileno-3, dos singuletes a 3.76 y 3.82 ppm que integran para dos metóxilos (MeO-1 y MeO-4).

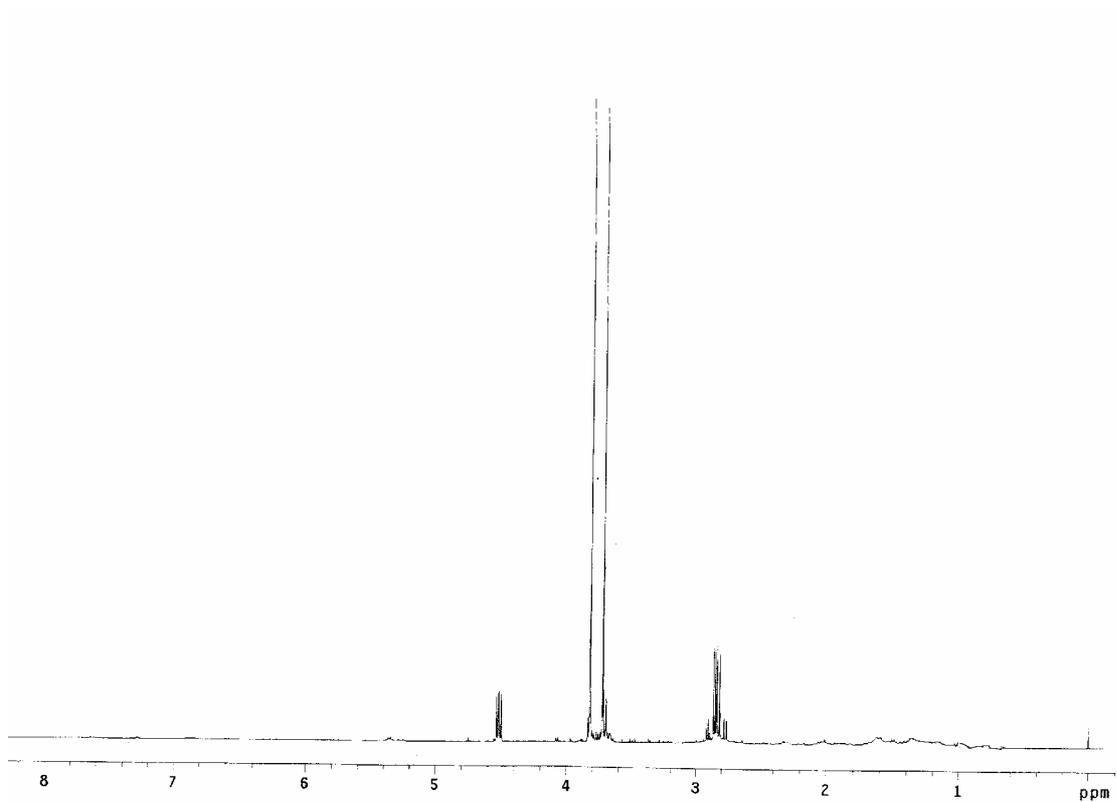
El espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectro 5) mostró señales para dos carbonilos de éster a 173.6 ppm (C-1) y en 170.9 ppm (C-4); para un carbono de metino en 67.2 ppm (C-2); para dos metoxilos a 52.8 y 51.9 ppm y a 38.4 ppm para el carbono del metileno (C-3).

En el espectro de masas de impacto electrónico (Espectro 6) se observó el pico base a m/z 162, consistente con la fórmula molecular establecida como C<sub>6</sub>O<sub>5</sub>H<sub>10</sub>, por espectrometría de masas de impacto electrónico. Con la información anterior se concluye que el compuesto era el 1,4-dimetil malato.

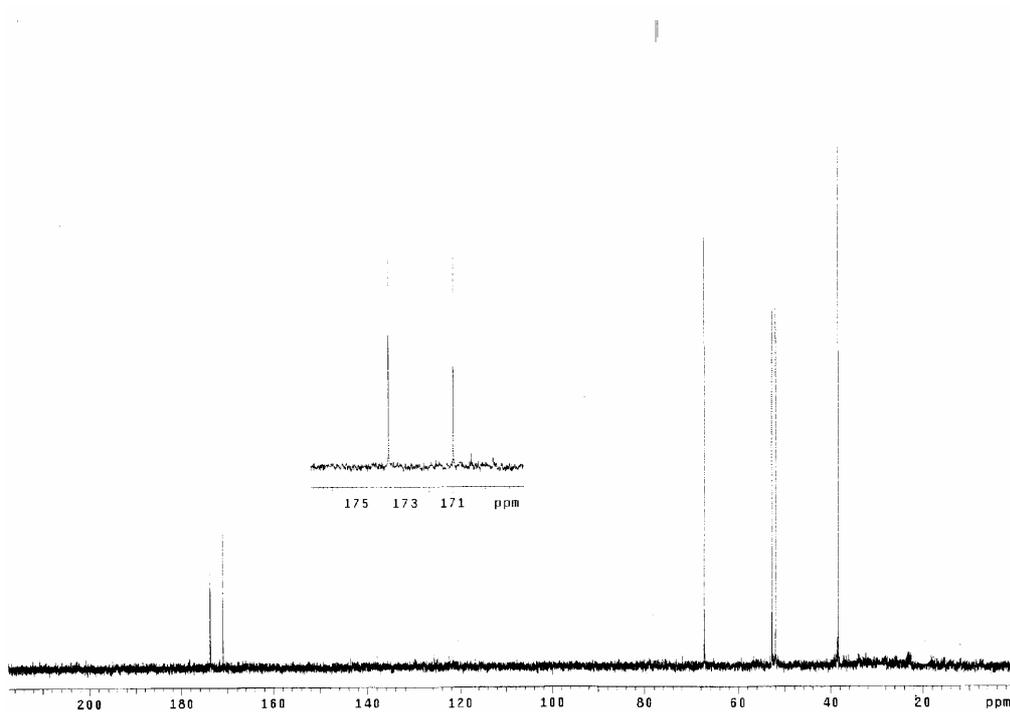




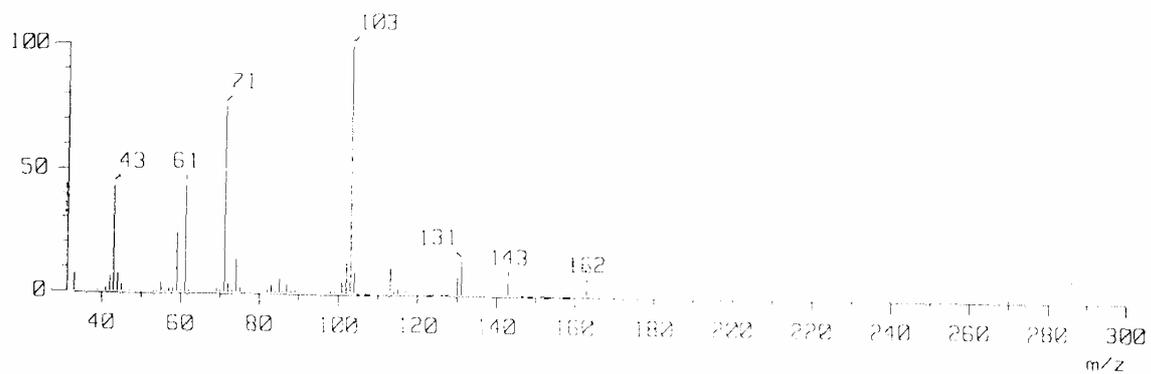
Espectro 3. IR del 1,4 dimetil malato



Espectro 4. RMN<sup>1</sup>H del 1,4-dimetil malato.



Espectro 5. RMN<sup>13</sup>C del 1,4-dimetil malato.



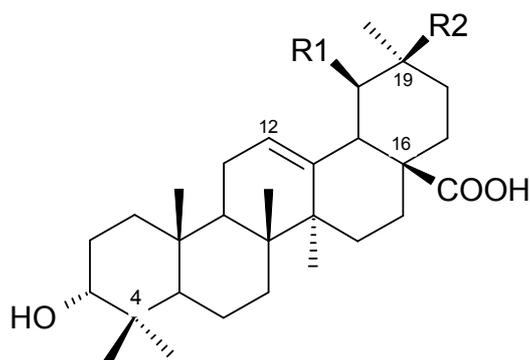
Espectro 6. EMIE del 1,4-dimetil malato

### A.I.2.3 Caracterización estructural del ácido oleanólico (11) y ácido ursólico (12).

De la fracción primaria FP3 se obtuvo un sólido de color café claro, identificado como la mezcla de los triterpenos, ácido oleanólico y ácido ursólico, al ser comparados mediante CCF con sus estándares (Sigma) y por sus espectros de RMN y espectroscopia de masas. Los triterpenos revelaron de color azul con el agente cromógeno vainillina. Estos compuestos se encuentran en la naturaleza siempre en mezcla epimérica.

En el espectro de IR (Espectro 7) se observaron bandas de absorción a  $3431\text{ cm}^{-1}$  para OH a  $2966$ ,  $2927$  y  $2871\text{ cm}^{-1}$  para C-H y a  $1692\text{ cm}^{-1}$  señal para el carbonilo del ácido.

En el espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 8) se observaron señales para un hidrógeno vinílico trisustituído a 5.25 ppm, señales para un hidrógeno base de alcohol secundario a 3.17 ppm, dos señales para los hidrógenos del C18 una señal que es característica para un oleaneno a 2.85 ppm observándose como un doblete de dobles y la otra señal característica para un urseno es de un doblete a 2.25 ppm y por último en la zona de 0.75 a 1.25 ppm se observan las señales para los hidrógenos de los metilos.



(11)

(12)

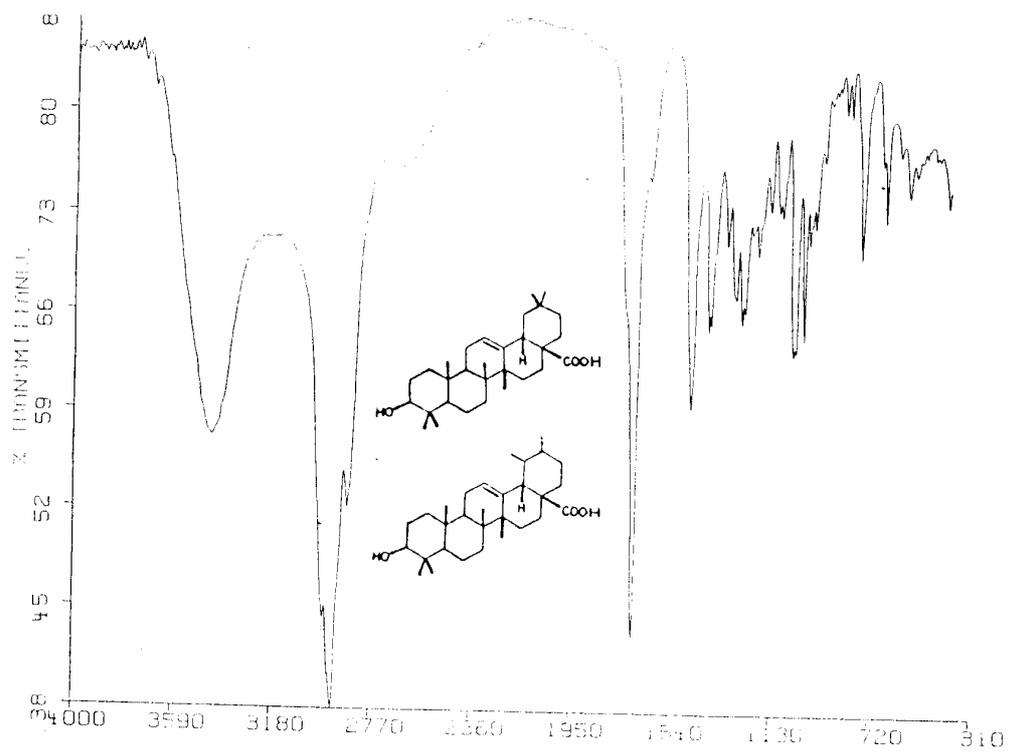
R1=H

CH<sub>3</sub>

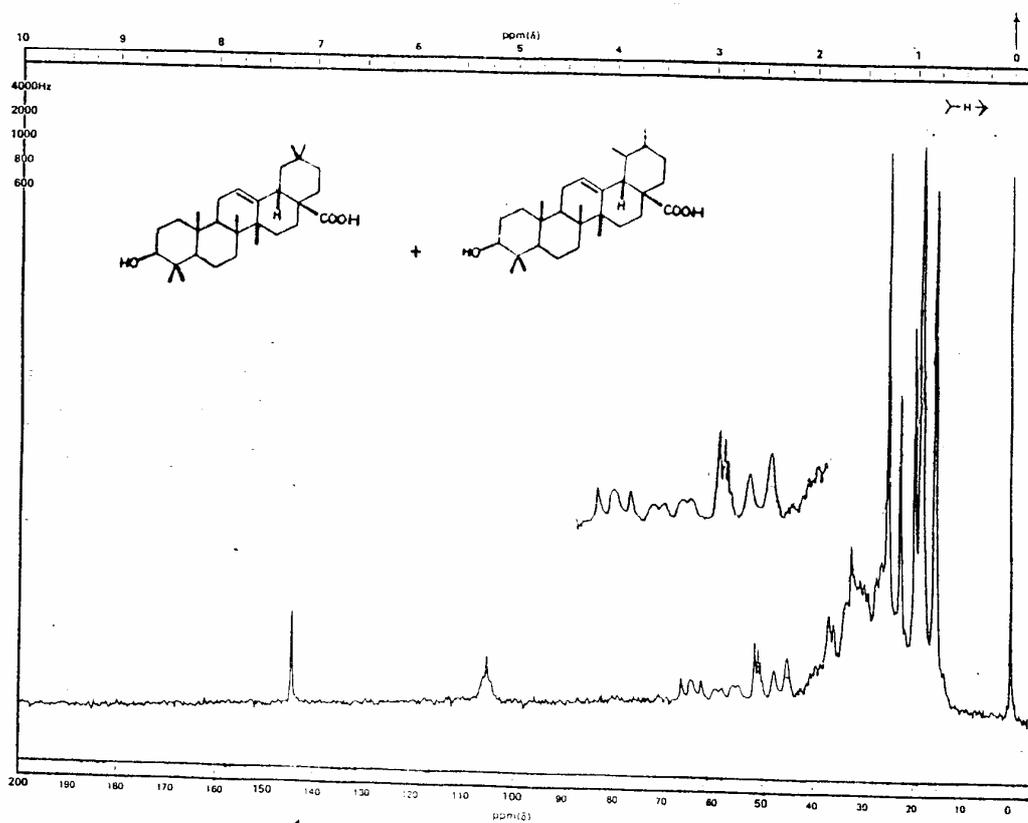
R2=CH<sub>3</sub>

H

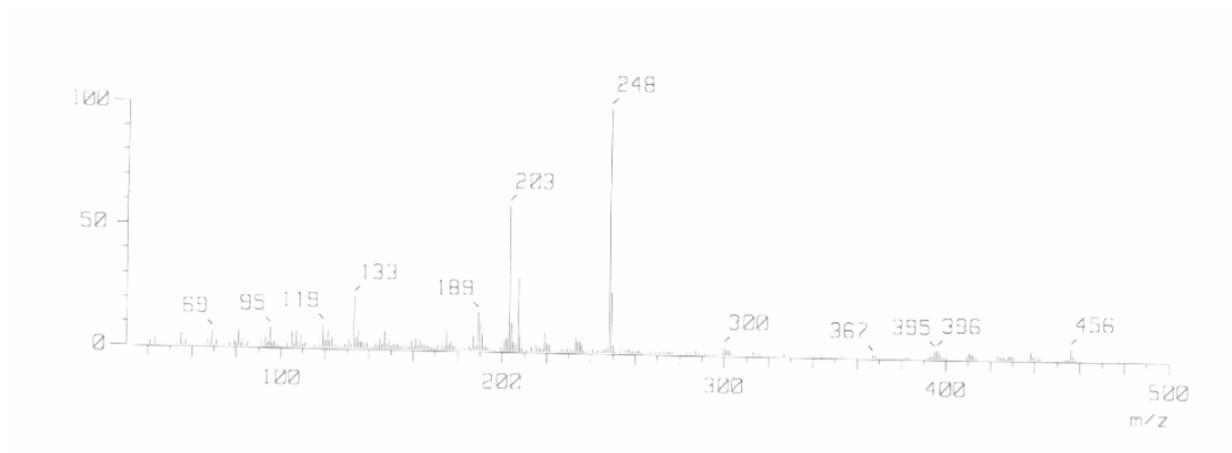
El espectro de masas (Espectro 9) presentó un ión molecular a 456 m/z para una fórmula molecular de C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>3</sub>. El análisis espectroscópico global confirmó que el sólido está constituido por una mezcla de ácidos triterpénicos el ácido 3β-hidroxi-12-oleanen-28-oico (11) y el ácido 3β-hidroxi-12-ursen-28-oico (12).



Espectro 7. IR de la mezcla del ácido oleanólico y ursólico



Espectro 8. RMN<sup>1</sup>H de la mezcla del ácido oleanólico y ursólico



**Espectro 9. EMIE de la mezcla del ácido oleanólico y ursólico**

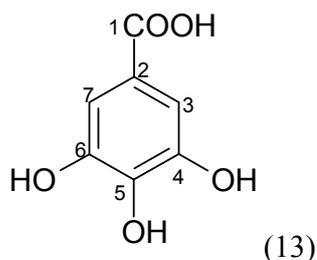
#### A.I.2.4 Caracterización estructural del ácido gálico (13).

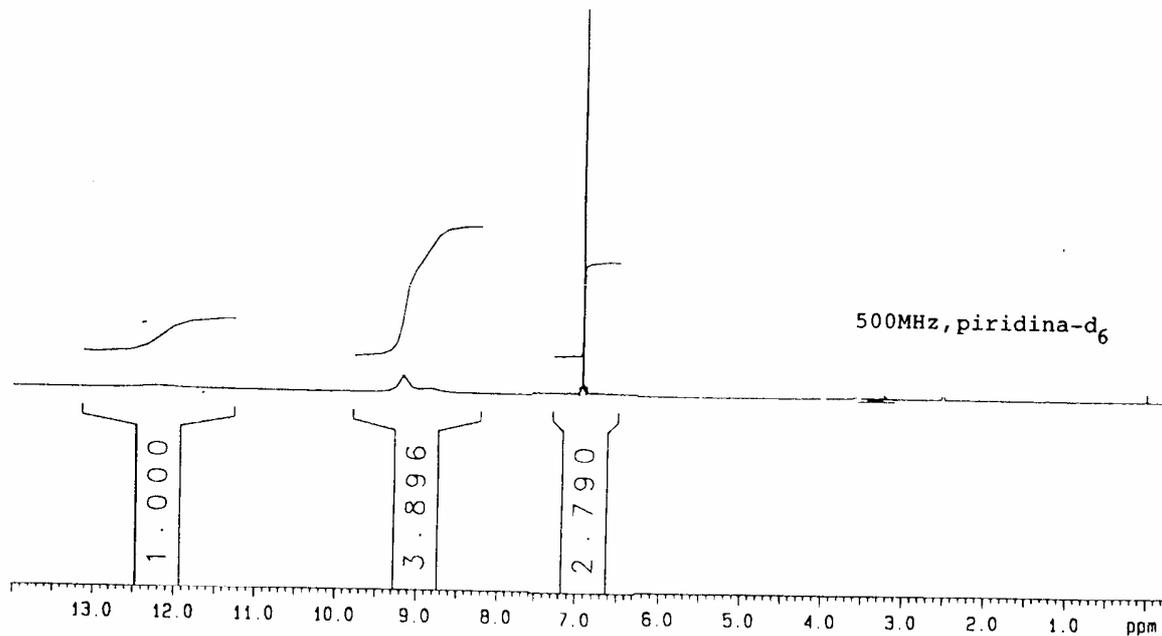
De la fracción primaria FP9 se obtuvo un sólido de color café claro (14 g) que fue identificado como ácido gálico, al ser comparado con un estándar (Merck) mediante CCF. El tanino tuvo un punto de fusión de 231-233 °C, el sistema de elusión fue CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (8:2) y reveló de color azul marino con el agente cromógeno cloruro férrico.

El espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 10) muestra un singulete a 6.9 ppm característico para los hidrógenos aromáticos H3 y H7.

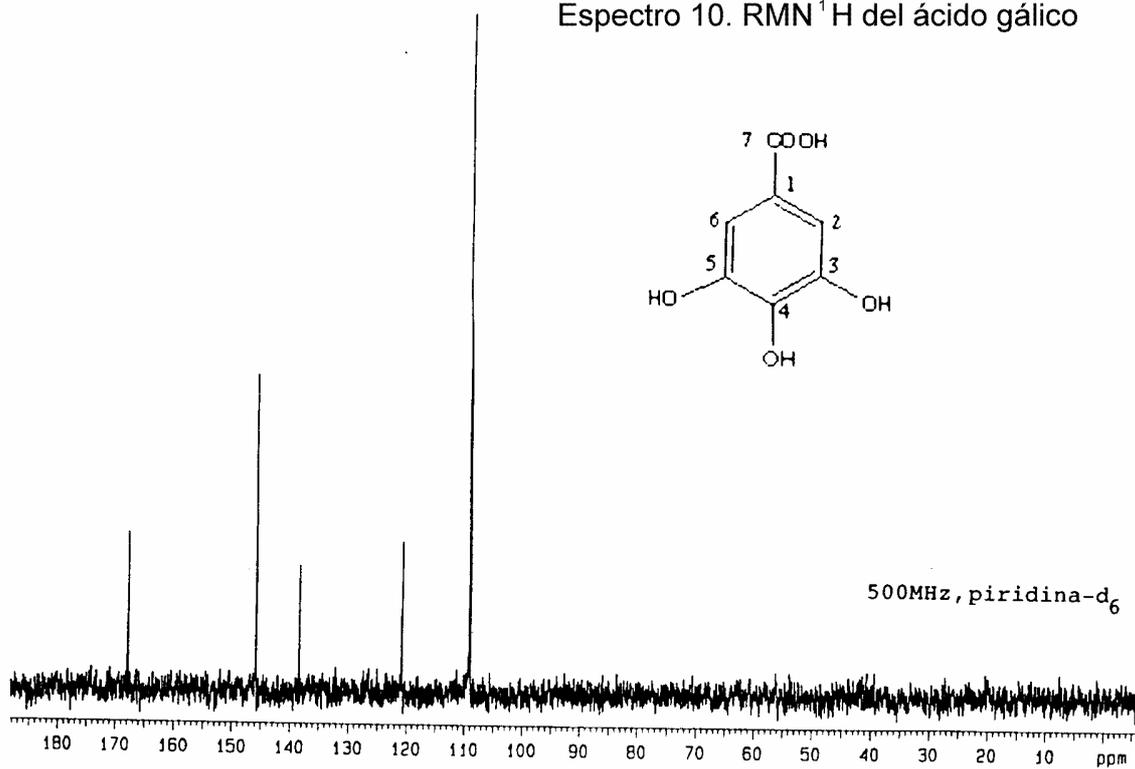
En el espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectro 11) las señales correspondientes para los carbonos C3 y C7 se observaron a 110 ppm. También se muestran señales a 120, 138, 146, 146 y 167 ppm correspondientes a los carbonos C2, C5, C4, C6 y C1, respectivamente.

El análisis de las señales de los espectros de RMN permitieron establecer que el compuesto (13) es el ácido gálico.





Espectro 10. RMN<sup>1</sup>H del ácido gálico



Espectro11. RMN<sup>13</sup>C del ácido gálico

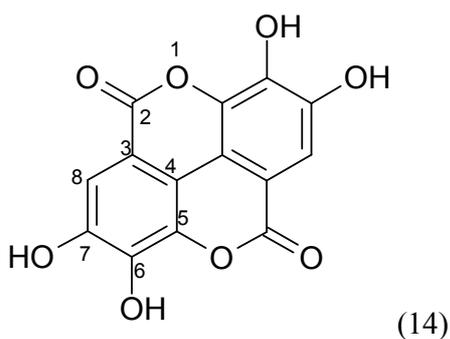
#### A.I.2.5 Caracterización estructural del ácido elágico (14).

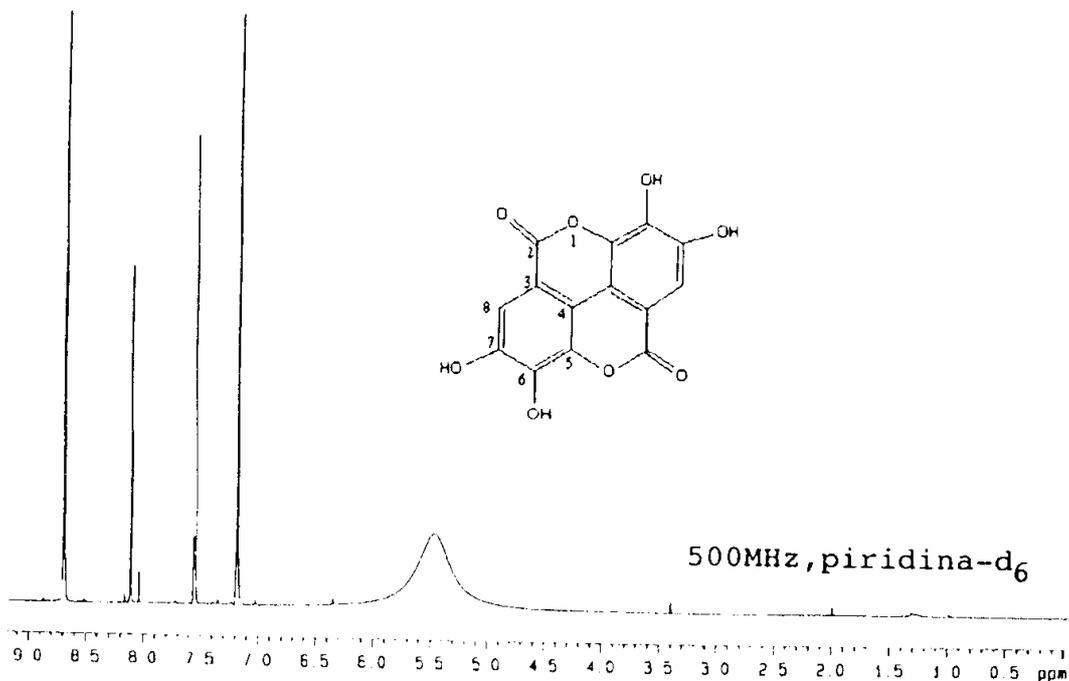
De la fracción primaria FP11 se obtuvo una resina de color café oscuro (34 g), que fue identificada como el ácido elágico al ser comparada mediante CCF con un estándar (Merck). El tanino tuvo un punto de fusión de 205-209 °C, el compuesto reveló de color azul marino con el agente cromógeno cloruro férrico.

El espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 12) muestra un singulete a 7.2 ppm característico para los hidrógenos aromáticos H8 y H8'.

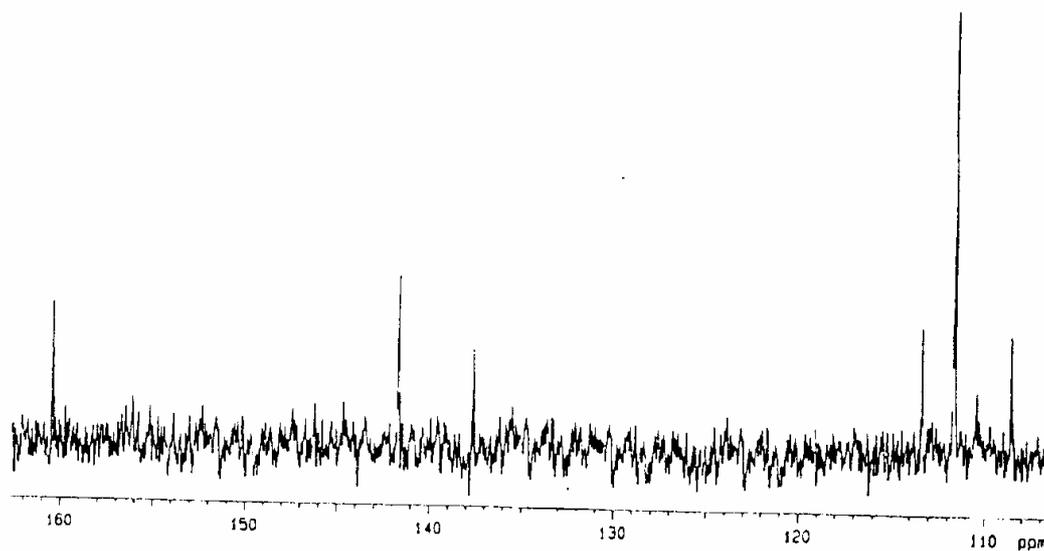
En el espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectro 13) las señales correspondientes para los carbonos C8 y C8' se observaron a 111 ppm. También se muestran señales a 109, 114, 137, 142 y 161 ppm correspondientes a los carbonos C4, C3, C5, C6 y C2, respectivamente.

El análisis de las señales de los espectros de RMN permitieron establecer que el compuesto 14 es el ácido elágico.





Espectro 12. RMN <sup>1</sup>H del ácido elálgico



Espectro 13. RMN <sup>13</sup>C del ácido elálgico

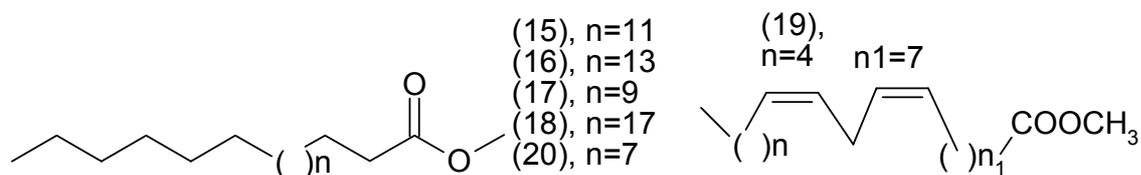
### A.I.2.6 Caracterización estructural de los metil ésteres de ácidos grasos (15-20).

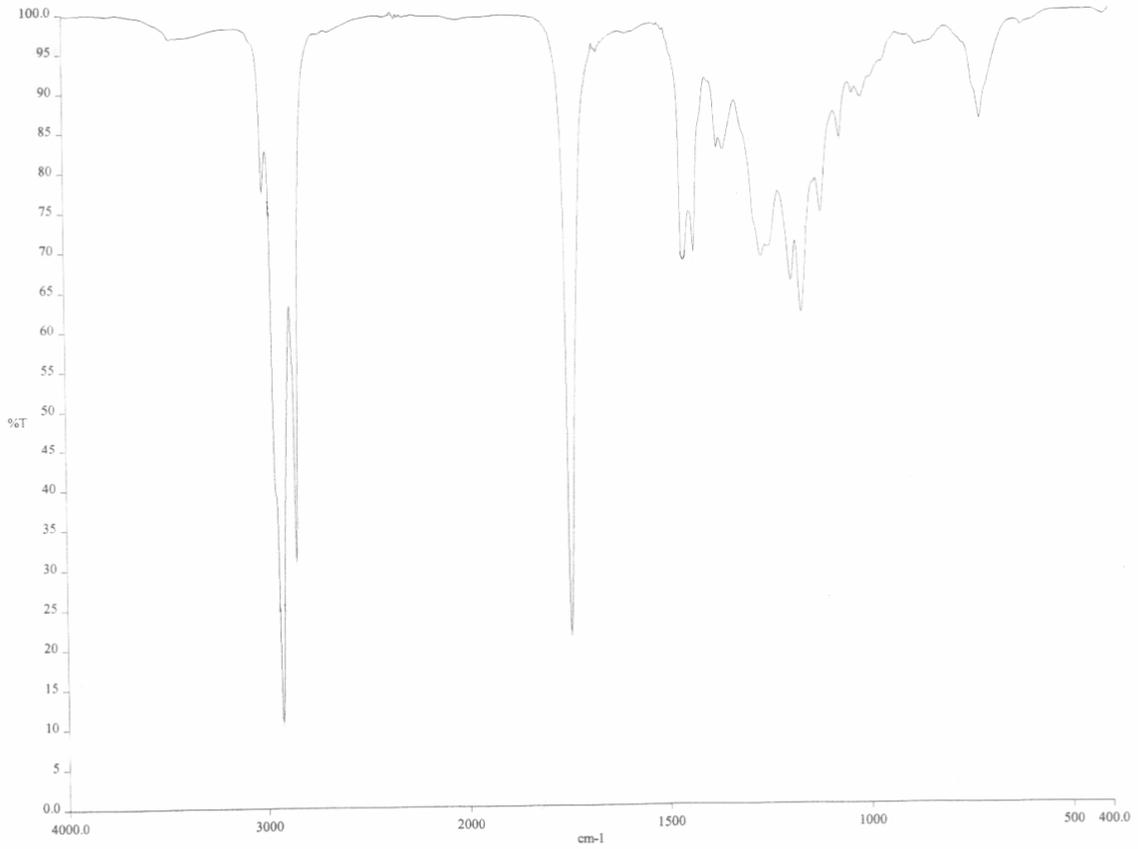
De la fracción terciaria FT1 se obtuvo un aceite de color amarillo (1 g) que fue identificado como una mezcla de seis metil ésteres de ácidos grasos: el araquidato de metilo, el behenato de metilo, el estearato de metilo, el hexacosanoato de metilo, el linoleato de metilo y el palmitato de metilo al analizar sus espectros de IR, RMN<sup>1</sup>H y EM. Los ácidos revelaron de color rojo con el agente cromógeno CeSO<sub>4</sub>.

En el espectro de IR (Espectro 14) se observaron máximos de absorción para éster a 1743, 1362 a 1072 cm<sup>-1</sup> señales, para C-H saturados a 2925, 2854, 1463, 1435 y 723 cm<sup>-1</sup> señales características y la última señal es característica de cadenas con más de cuatro metilenos.

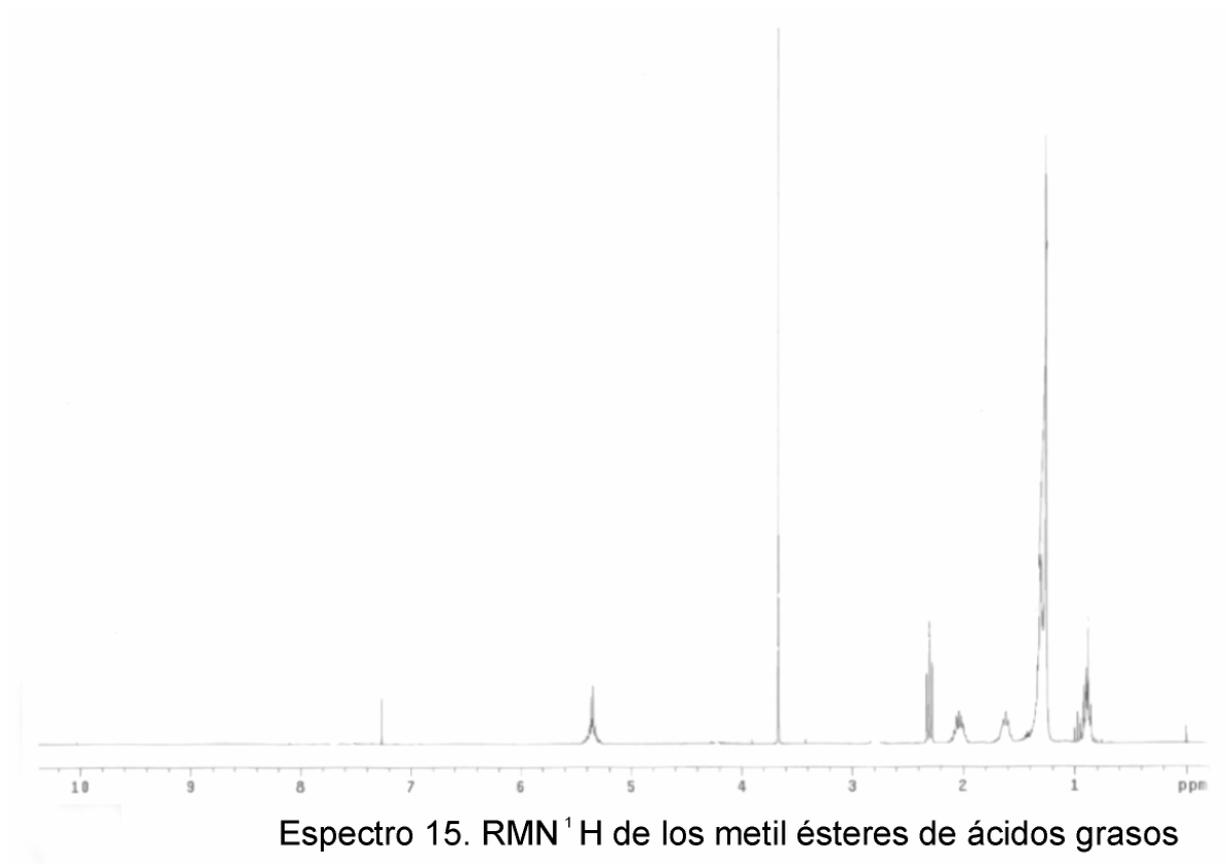
En el espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 15) se observó un singulete a 3.66 ppm que integró para tres hidrógenos atribuibles al metoxilo, un triplete a 2.30 ppm que integró para dos hidrógenos atribuibles al metileno que se encuentra unido a un grupo carbonilo, un multiplete a 1.61 ppm que integró para dos hidrógenos atribuibles al metileno β al carbonilo, un singulete a 1.25 ppm que integró para 44 hidrógenos atribuibles a la cadena hidrocarbonada y por último un multiplete a 0.89 ppm que integró para tres hidrógenos atribuibles al metilo terminal de la cadena.

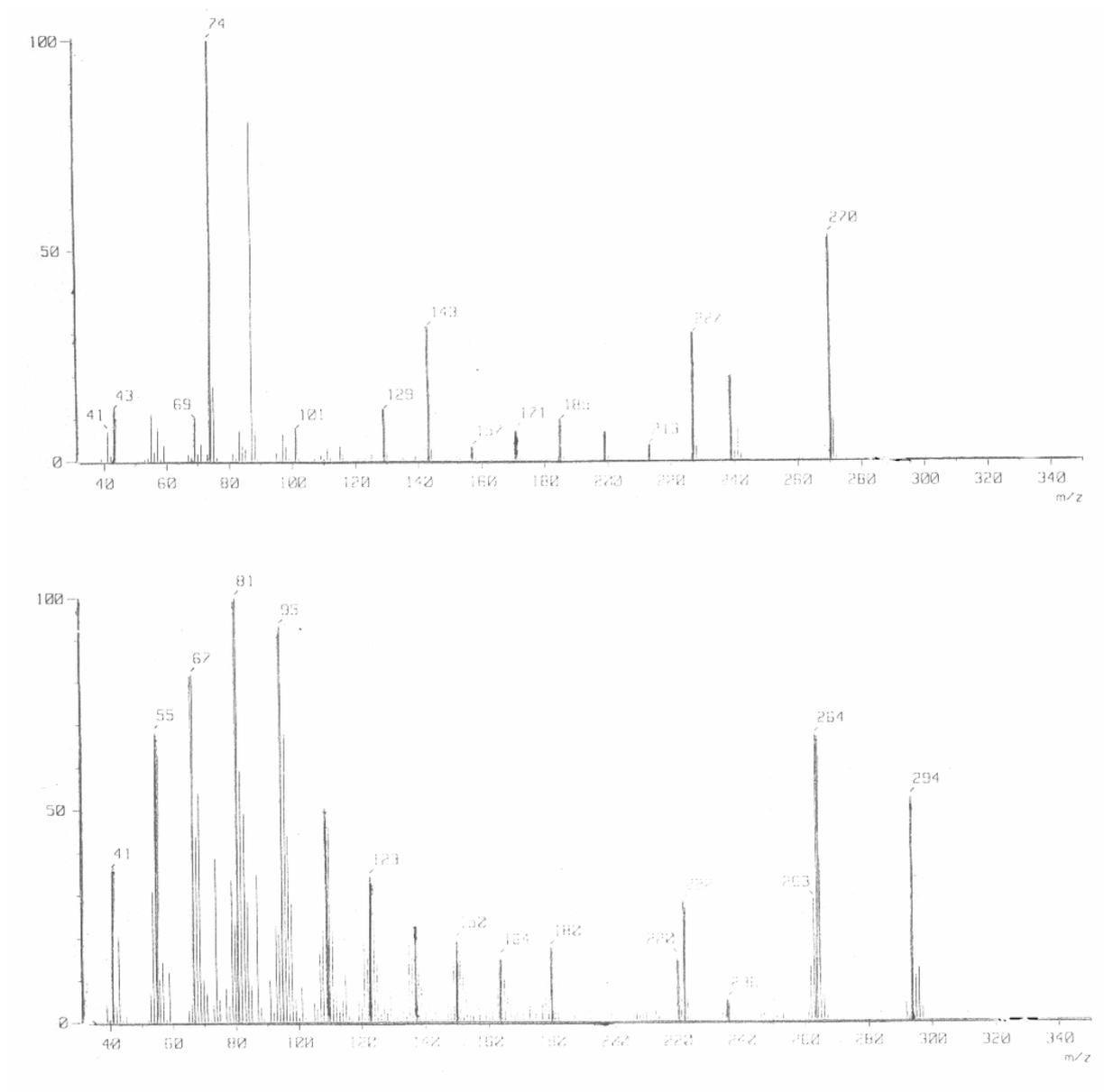
En los espectros de masas de impacto electrónico (Espectro 16) se observó el ión molecular de cada uno de los ésteres que integran la mezcla: a 326 m/z para el araquidato de metilo (15), a 354 m/z para el behenato de metilo (16), a 298 m/z para el estearato de metilo (17), a 410 m/z para el hexacosanoato de metilo (18), a 294 m/z para el linoleato de metilo (19) y a 270 m/z para el palmitato de metilo (20), con un tiempo de retención de 7.28, 8.22, 6.40, 11.85, 6.31 y 5.42 minutos, respectivamente.



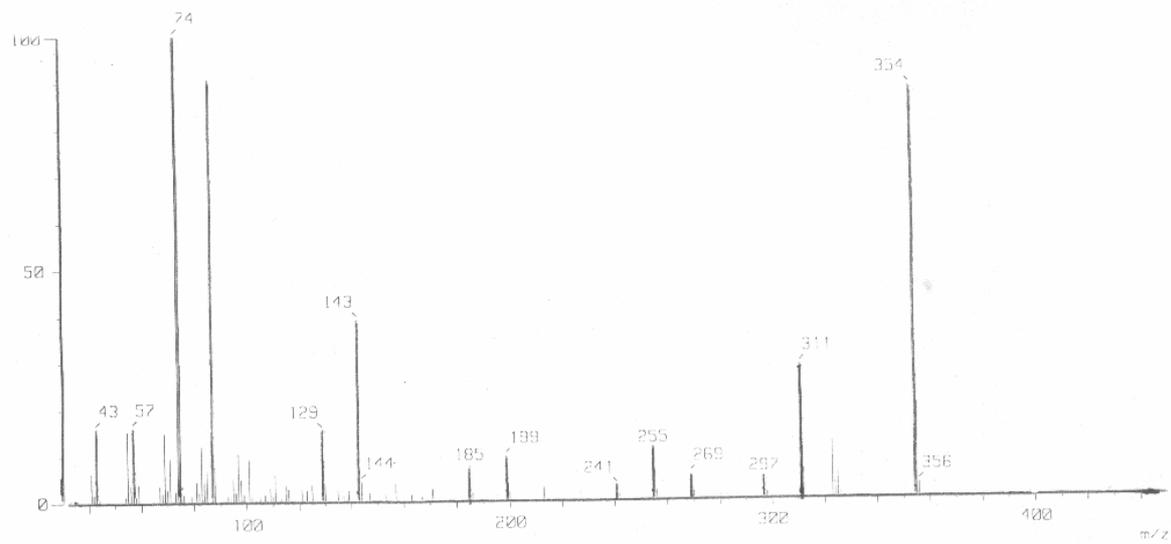
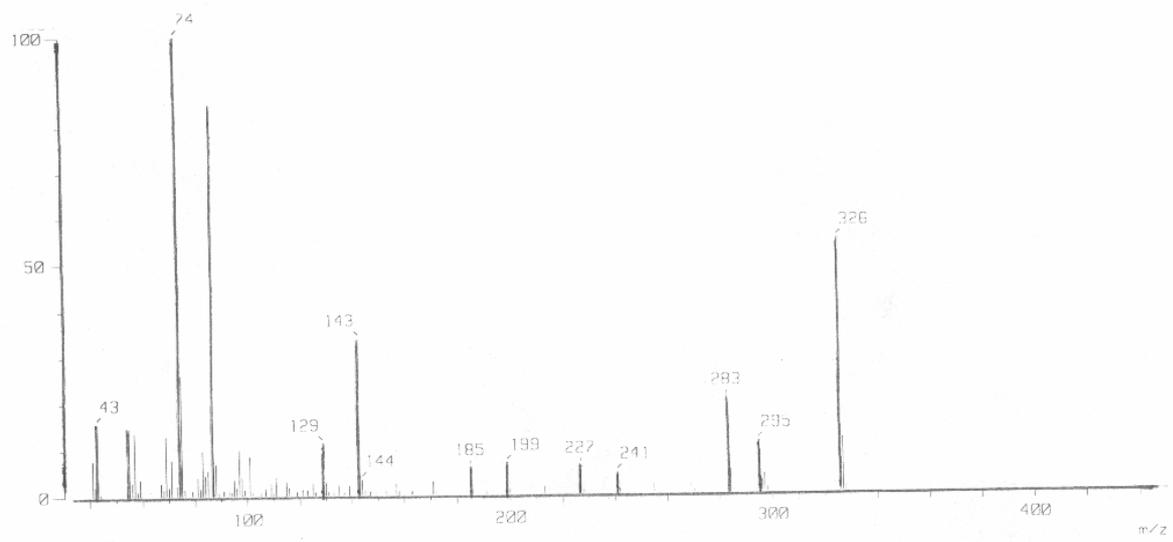


**Espectro14. IR de la mezcla de los metil ésteres de ácidos grasos**

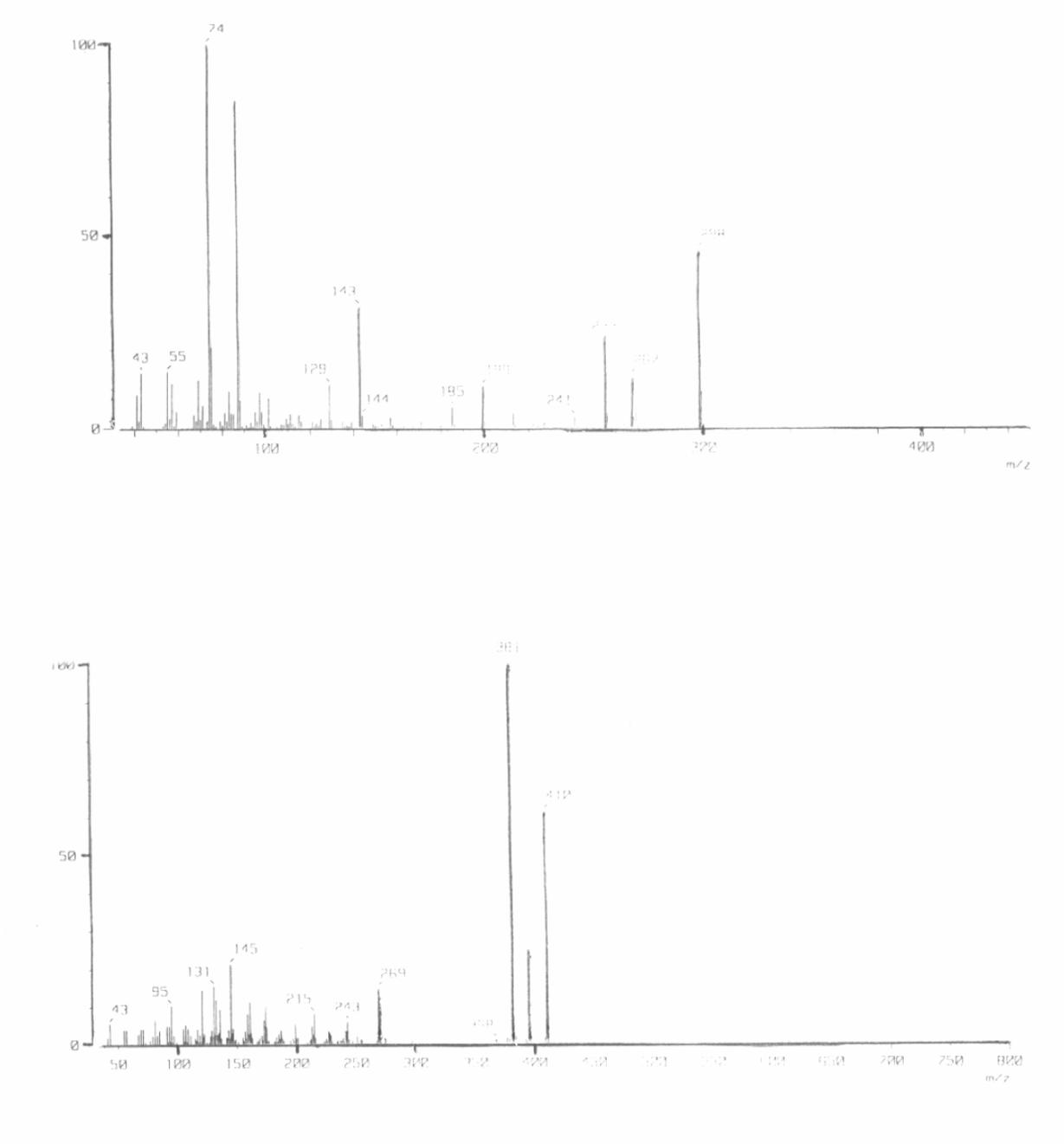




**Espetro 16. EMIE de la mezcla de los metil ésteres de ácidos grasos**



**Espectro 16. EMIE de la mezcla de los metil ésteres de ácidos grasos**



**Espectro 16. EMIE de la mezcla de los metil ésteres de ácidos grasos**

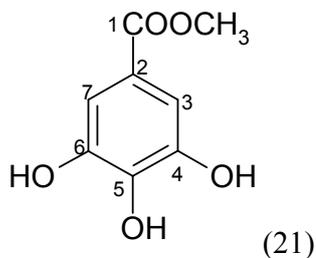
### A.I.2.7 Caracterización estructural del metil galato (21).

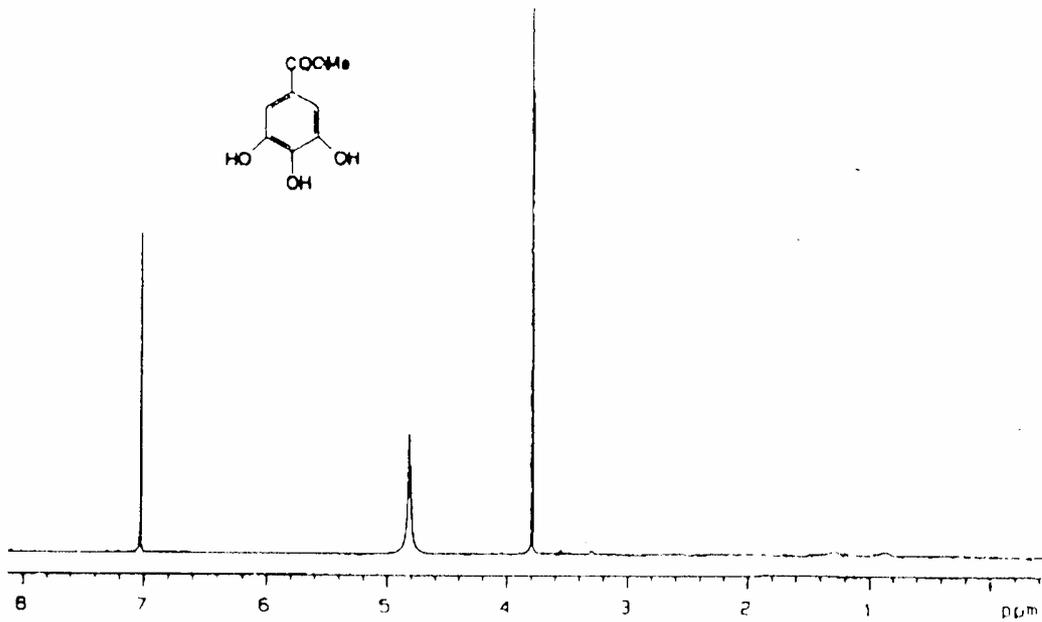
De la fracción terciaria FTI se obtuvo un sólido de color amarillo (0.1 g) que fue identificado como el metil galato al analizar sus espectros de IR, RMN y EM. El tanino reveló de color café con el agente cromógeno  $\text{CeSO}_4$ .

El espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (Espectro 17) muestra un singlete a 6.9 ppm característico para los hidrógenos aromáticos H3 y H7.

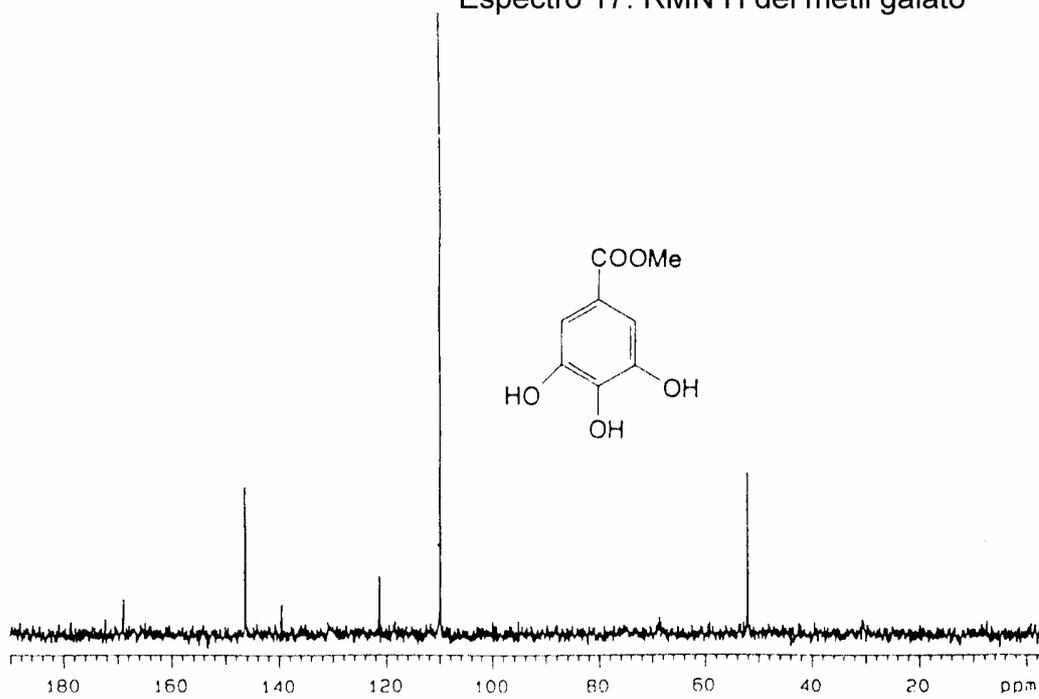
En el espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  (Espectro 18) las señales correspondientes para los carbonos C3 y C7 se observaron a 110 ppm. También se muestran señales a 120, 138, 146, 146 y 167 ppm correspondientes a los carbonos C2, C5, C4, C6 y C1, respectivamente.

El análisis de las señales de los espectros de RMN permitieron establecer que el compuesto 21 es el metil galato.





Espectro 17. RMN<sup>1</sup>H del metil galato

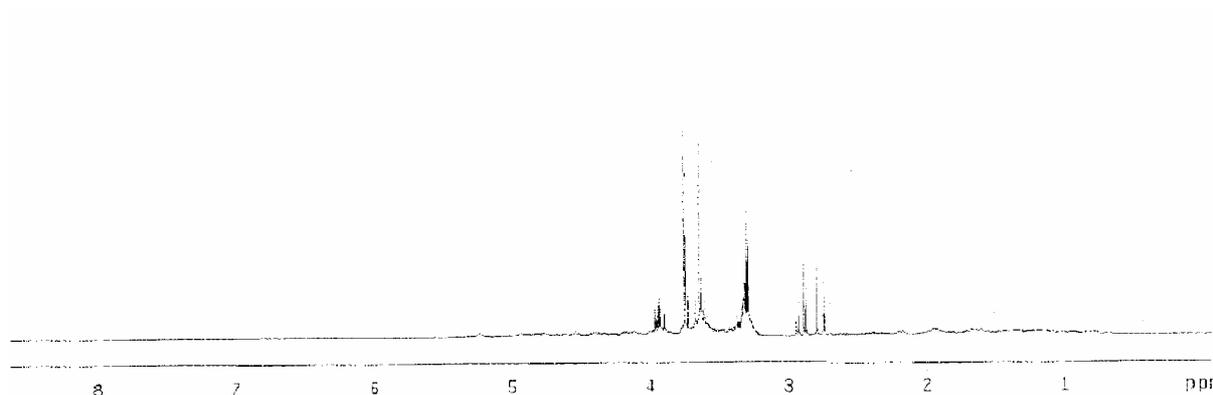
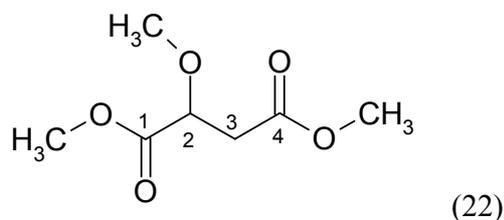


Espectro 18. RMN<sup>13</sup>C del metil galato

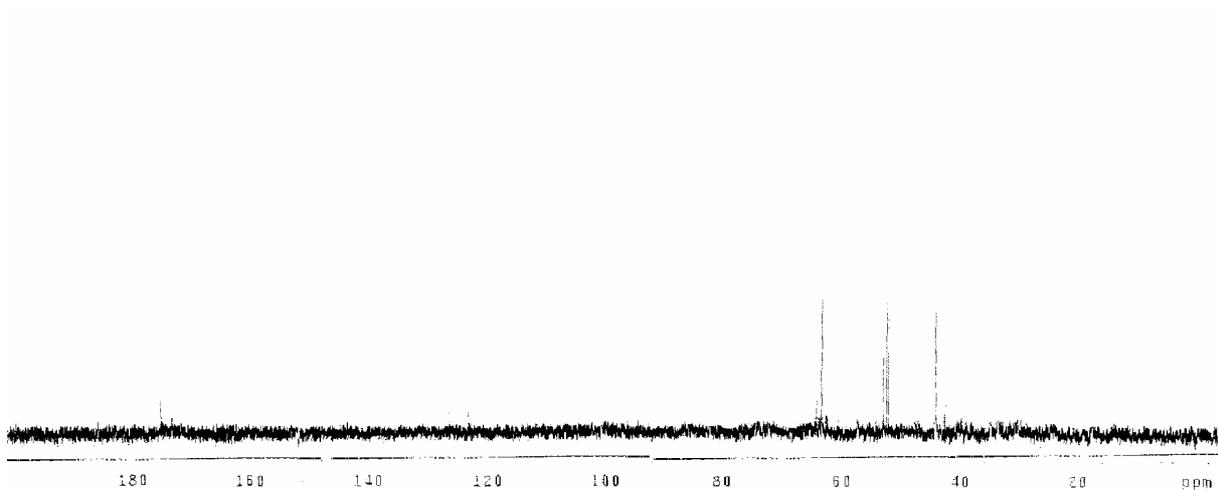
### A.I.2.8 Caracterización estructural del trimetil malato (22).

De la fracción terciaria FT1 se obtuvo un sólido de color café claro que fue identificado como trimetil malato, sus espectros de RMN<sup>1</sup>H, de RMN<sup>13</sup>C fueron similares a los espectros del 1,4-dimetil malato, observándose una señal adicional en el espectro de RMN<sup>1</sup>H (Espectro 19) a 3.64 ppm asignable para el metoxilo del C-2 y en el espectro de RMN<sup>13</sup>C (Espectro 20) a 53.0 ppm la señal asignable al carbono del metilo en el C-2.

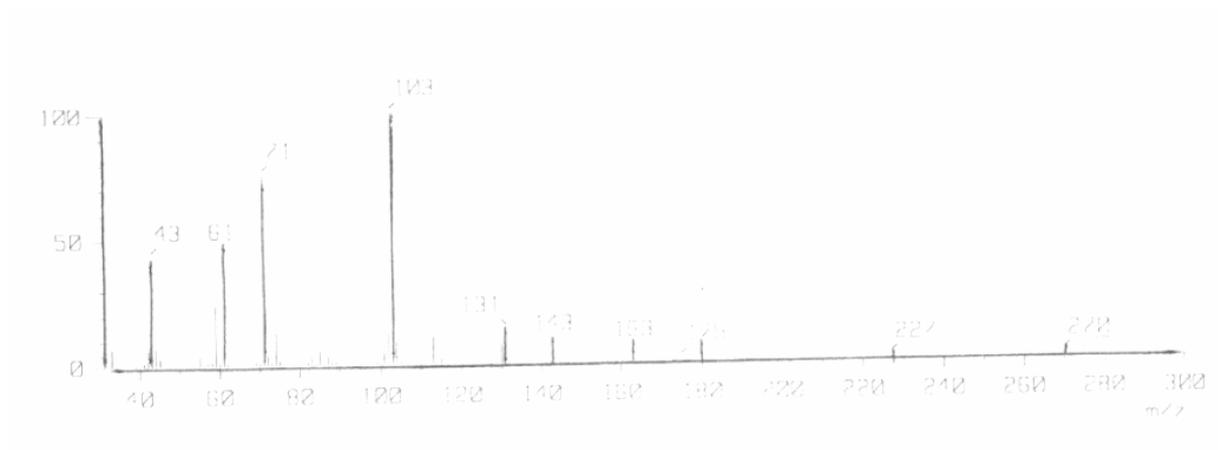
En el espectro de masas de impacto electrónico (Espectro 21) se observó el pico base a m/z 176 y su fórmula molecular se estableció como C<sub>7</sub>O<sub>5</sub>H<sub>11</sub>, por espectrometría de masas de impacto electrónico. Las evidencias mostradas permiten concluir que el compuesto es el trimetil malato.



Espectro 19. RMN<sup>1</sup>H del trimetil malato



**Espectro 20. RMN $^{13}\text{C}$  del trimetil malato**



**Espectro 21. EMIE del trimetil malato**

## **XV. ANEXO II**

# Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders<sup>☆</sup>

A.D. Alanís<sup>a,c</sup>, F. Calzada<sup>a,\*</sup>, J.A. Cervantes<sup>a</sup>, J. Torres<sup>b</sup>, G.M. Ceballos<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Investigación Médica en Farmacología de Productos Naturales, Hospital de Pediatría, 2° piso, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, CP 06725, México, D.F., México

<sup>b</sup> Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, 2° piso, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, CP 06725, México, D.F., México

<sup>c</sup> Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, Plan de Sn Luis 11340, México, D.F., México

Received 5 July 2004; accepted 10 February 2005

Available online 7 July 2005

## Abstract

Antibacterial properties of aqueous and methanolic extracts of 26 medicinal plants used in Mexico to treat gastrointestinal disorders were tested against eight different species of enteropathogens: two *Escherichia coli* species; two *Shigella sonnei* species; two *Shigella flexneri* species; and two *Salmonella* sp. species. The results showed that all crude extracts exhibited antibacterial activity, at least against one of the microorganisms tested, at concentrations of 8 mg/mL or lower. The extracts from *Caesalpinia pulcherrima*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Cocos nucifera*, *Geranium mexicanum* (aerial parts and roots), *Hippocratea excelsa*, and *Punica granatum* possessed strong antibacterial activity against most of the pathogens tested. In general, methanolic extracts were more active than aqueous extracts. Their activity was higher than chloramphenicol but did not exceed that of trimethoprim. *Shigella sonnei* species showed the highest susceptibility to both extracts. This is the first evaluation of these plants against bacterial pathogen isolates, which cause diarrhea and dysentery in Mexican population.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Medicinal plants; Methanolic extracts; Antibacterial properties

## 1. Introduction

The interest in the study of medicinal plants as a source of pharmacologically active compounds has increased worldwide. It is recognized that in some developing countries, plants are the main medicinal source to treat infectious diseases. In these countries living conditions are crowded and hygiene is poor; diarrhea and dysentery caused by bacterial enteropathogens are among the main causes of morbidity and mortality (WHO, 1996, 1998, 2002).

In Mexico, diarrhoea is a serious health problem and is the second cause of disease among all age groups (SS, 2003). Traditional Mexican medicine uses a wide variety of plants in the treatment of gastrointestinal disorders. Nevertheless, little is

known about the antibacterial activity against enterobacteria, which cause diarrhea and dysentery and the pharmacological effects of these plants. Therefore, there is a need to study the properties of medicinal plants to validate its use in traditional medicine (Lozoya et al., 1987; Aguilar et al., 1994). As part of our continuous research on biological properties of plants used in traditional Mexican medicine (Calzada et al., 1998a,b), in this paper we report in vitro antibacterial activity of 56 extracts from 26 plant species against 7 bacterial strains, which are a common cause of diarrhea and dysentery in Mexican population (Torres et al., 1995).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

The species selected for this study were reported to be used in traditional Mexican medicine to treat gastrointesti-

<sup>☆</sup> This work is taken in part from A.D. Alanís' Ph.D. thesis.

\* Corresponding author. Tel.: +525 627 6900x22410; fax: +525 761 0952.

E-mail address: [fercalber1@hotmail.com](mailto:fercalber1@hotmail.com) (F. Calzada).

nal disorders such as diarrhea and dysentery. Information on medicinal uses of these plants was obtained by personal contact with traditional healers and from literature (Aguilar et al., 1994). Plants were collected from different regions of Mexico. Voucher specimens were deposited at the IMSS, Herbarium, Instituto Mexicano del Seguro Social. Botanical names, voucher specimens, traditional usage, and plant parts used to obtain the extracts are summarized in Table 1.

## 2.2. Preparation of extracts

In each case, powdered air-dried plant material was extracted with water or methanol. The crude methanol extract was prepared by maceration of material (100 g) with methanol (300 mL, two times). The methanolic extract was first filtered and evaporated to dryness. Aqueous extract was obtained by decoction in distilled water for 30 min. The solution was filtered, evaporated and lyophilized.

## 2.3. Bacterial strains

All bacterial strains used in this study were isolated from faeces of children; *Escherichia coli* was isolated from a case with watery diarrhea, whereas *Shigella* and *Salmonella* isolates were from cases with bloody diarrhea (Torres et al., 1995). *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as control.

## 2.4. Antibacterial testing

Antibacterial activity was measured using a dilution in agar technique (Lenette, 1985). Briefly, the aqueous and methanolic extracts for testing were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO, Merck) and serially diluted in melted Muller Hinton agar culture medium (MHA, Sigma) in Petri dishes (100 mm × 15 mm) to obtain the final concentrations: 1, 2, 4 and 8 mg/mL. The solvent did not exceed 1% concentration and did not affect the growth of any of the microorganisms employed. All bacterial strains were grown in Muller Hinton broth (MHB, Sigma) for 4 h at 37 °C. Bacterial suspensions with 0.5 McFarland standard turbidity equivalents to 10<sup>8</sup> CFU were prepared by dilution with MHB. The diluted inoculum was added to a Steer's replicator calibrated to deliver 10<sup>4</sup> CFU, and then Petri dishes were inoculated and incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, all dishes were observed for zones of growth inhibition, and the diameter of these zones was measured in millimeters with a ruler. Results were expressed as the percentage of inhibition of bacterial growth, determined by comparing it with normal bacterial growth in the control dish (growth on the control dish was considered as 100%). The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined as the lowest concentration that completely inhibited macroscopic growth of bacteria. Additionally, and for comparative purposes, chloramphenicol and

Table 1  
Botanical name, voucher specimen, traditional usage and used part

Botanical species (family)	Voucher	Common name	Used part	Traditional usage
<i>Allium sativum</i> L. (Liliaceae)	14396	Ajo	Ep	sa, dy
<i>Aloysia triphylla</i> Britton (Verbenaceae)	126110	Cedrón	A	sa, di
<i>Annona cherimola</i> Mill (Annonaceae)	14401	Chirimolla	S	di, dy, pa
<i>Artemisia absinthium</i> L. (Asteraceae)	12609	Ajenjo	A	sa, co, pa
<i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt (Asteraceae)	14409	Estafiate	A	sa, di, dy, co
<i>Bocconia frutescens</i> L. (Papaveraceae)	12618	Gordolobo	A	sa, dy
<i>Caesalpinia pulcherrima</i> L. (Leguminosae)	13591	Tabachín	A	sa, dy, co
<i>Carica papaya</i> L. (Caricaceae)	14397	Papaya	S	di, pa
<i>Chenopodium ambrosioides</i> L. (Chenopodiaceae)	14402 <sup>a</sup> /14395 <sup>a</sup>	Epazote	A	sa, di, pa
<i>Chenopodium murale</i> L. (Chenopodiaceae)	13592	Enechquelite	A	dy
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i> Larreat (Sterculiaceae)	14404	Flor de Manita	F	dy
<i>Chrysactinia mexicana</i> Gray (Asteraceae)	14407	San Nicolás	A	di
<i>Cocos nucifera</i> L. (Palmae)	14398	Coco	Ex	pa, dy
<i>Dichondra argentea</i> Humb & Bonpl (Convolvulaceae)	0103m	Oreja de Ratón	A	di
<i>Dorstenia contrajerva</i> L. (Moraceae)	14406	Contrahierba	A	sa, dy, co
<i>Geranium mexicanum</i> H.B.K. (Geraniaceae)	14405	Geranio	A/R	sa, di, dy
<i>Hippocratea excelsa</i> H.B.K. (Hippocrateaceae)	14394	Cancerina	R	sa, co
<i>Lippia alba</i> N.E.Br. (Verbenaceae)	14146	Mirto	A	di, sa
<i>Lygodium venustum</i> Sw (Schizaceae)	13270	Culebrina	A	di, dy
<i>Matricaria recutita</i> L. (Asteraceae)	14399	Manzanilla	A	sa, dy, di
<i>Ocimum basilicum</i> L. (Labiatae)	14393	Albahacar	A	sa, co
<i>Punica granatum</i> L. (Punicaceae)	14403	Granada	Ex	di, dy, pa
<i>Ruta chalepensis</i> L. (Rutaceae)	14400	Ruda	A	sa, co, pa
<i>Schinus molle</i> L. (Anacardiaceae)	14408	Pirul	A	sa
<i>Senna villosa</i> Mills (Leguminosae)	14410	Tsalché	A	co
<i>Thymus vulgaris</i> L. (Lamiaceae)	13594	Tomill	A	sa

Ep (bulb epidermis), A (aerial parts), S (seeds), F (flowers), Ex (fruit exocarp), R (roots); di (diarrhea), dy (dysentery), sa (stomach ache), pa (parasites), co (colic).

<sup>a</sup> Variety (red/green).

trimethoprim were included as references standards. Each assay was performed twice and repeated two times.

### 3. Results and discussion

A total of 56 aqueous and methanolic crude extracts, from 26 different plant species (24 genera in 20 families) used in Mexican traditional medicine to treat gastrointestinal disorders, were submitted for screening for antibacterial activity against eight bacterial species. The results of the antibacterial activity are shown in Tables 2 and 3. The plants differ significantly in their activity against the tested strains and the best antibacterial activity was observed at 8 mg/mL. From the 26 tested plants, both extracts from *Caesalpinia pulcherrima*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Cocos nucifera*, *Geranium mexicanum* (roots and aerial parts), *Hippocratea excelsa*, and *Punica granatum* were active against all microorganisms with percentage of inhibition ranging from 7.7 to 100%. Among these active extracts *Geranium mexicanum* (aerial parts) and *Punica granatum* exhibited a strong activity against both *Shigella flexneri* species with MIC values rang-

ing from 1 to 4 mg/mL. The highest antibacterial activity was observed with the methanolic extract from *Thymus vulgaris*, which showed 100% growth inhibition against all examined bacteria, except with *Shigella sonnei*-1 where growth inhibition was 66.7%. In contrast, the aqueous extract of this plant displayed strong activity only against the *Shigella flexneri*-1. Aqueous extract from *Lygodium venustum* was the least active, acting only against the *Escherichia coli* 0157:H7 strain with 26.7% of growth inhibition. The weakest activity was observed with the methanolic extract from *Allium sativum* against *Escherichia coli* 0157:H7 with 1.4% of growth inhibition. All plant extracts tested have antibacterial properties against at least one of the microorganisms tested. In general, methanolic extracts were more active than aqueous extracts.

*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Shigella sonnei*-1 species showed the highest sensitivity to most of the methanol extracts tested; whereas *Escherichia coli* 0157:H7 and the *Salmonella* sp.-2 strains were resistant to the activity of most of them. In the case of aqueous extracts, *Escherichia coli* 0157:H7 and *Shigella sonnei*-1 species showed the highest sensitivity.

Table 2  
Percentage of inhibition of bacterial growth by methanol plant extracts

Botanical species	Percentage of inhibition at 8 mg/mL							
	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Allium sativum</i>	24.4	1.4	35.2	17.5	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Aloysia triphylla</i>	21.2	0.0	5.7	0.0	11.1	28.6	17.6	0.0
<i>Annona cherimola</i>	8.8	0.0	15.0	3.8	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Artemisia absinthium</i>	51.5	33.3	39.6	28.6	33.3	46.4	29.4	25.0
<i>Artemisia ludoviciana</i>	46.0	12.8	33.3	28.6	33.3	63.6	25.0	12.5
<i>Bocconia frutescens</i>	54.1	34.3	59.3	54.6	40.8	37.3	15.4	21.6
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	39.4	33.3	47.2	33.3	100.0	40.5	28.6	25.0
<i>Carica papaya</i>	39.4	5.6	24.5	23.8	25.9	52.4	29.4	6.3
<i>Chenopodium ambrosoides</i> <sup>a</sup>	39.4	22.2	32.1	14.3	25.3	28.6	29.4	15.6
<i>Chenopodium ambrosoides</i> <sup>b</sup>	45.9	7.7	36.7	21.4	14.3	21.2	12.5	0.0
<i>Chenopodium murale</i>	40.5	2.6	26.7	14.3	0.0	15.2	12.5	0.0
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	56.8	59.0	73.3	71.4	42.9	51.5	50.0	50.0
<i>Chrysactinia mexicana</i>	45.9	0.0	33.3	21.4	28.6	100.0	0.0	0.0
<i>Cocos nucifera</i>	45.5	47.2	62.3	50.0	25.9	40.5	41.2	37.5
<i>Dichondra argentea</i>	15.2	0.0	9.4	0.0	0.0	16.7	5.9	0.0
<i>Dorstenia contrajerva</i>	35.3	0.0	33.3	36.5	14.3	36.1	6.3	0.0
<i>Geranium mexicanum</i> (AP)	56.8	69.2	60.0	57.1	100.0	100.0	25.0	25.0
<i>Geranium mexicanum</i> (R)	13.5	17.9	46.7	42.9	28.6	100.0	25.0	12.5
<i>Hippocratea excelsa</i>	51.5	55.6	66.0	57.1	33.3	46.4	52.9	56.3
<i>Lippia alba</i>	29.4	0.0	26.7	15.4	28.6	27.8	18.8	0.0
<i>Lygodium venustum</i>	45.9	28.2	13.3	7.1	28.6	39.4	12.5	12.5
<i>Matricaria recutita</i>	18.9	0.0	33.3	17.5	3.7	5.9	0.0	0.0
<i>Ocimum basilicum</i>	35.3	6.3	70.0	57.7	42.9	52.8	43.8	37.5
<i>Punica granatum</i>	56.8	59.0	70.0	64.3	100.0	100.0	51.5	50.0
<i>Ruta chalepensis</i>	21.2	0.0	17.0	0.0	0.0	28.6	0.0	0.0
<i>Schinus molle</i>	21.2	0.0	20.8	4.8	0.0	28.6	23.5	12.5
<i>Senna villosa</i>	26.7	0.0	16.0	0.0	16.7	0.0	0.0	0.0
<i>Thymus vulgaris</i>	100.0	100.0	66.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Chloramphenicol	14.6	10.0	11.9	25.5	12.9	8.8	5.4	0.0
Trimethoprim	100.0	100.0	51.7	29.2	100.0	100.0	100.0	100.0

Results are reported as mean ( $n=4$ ) and expressed as % inhibition. A: *Escherichia coli* ATCC 25922, B: *Escherichia coli* 0157:H7, C: *Shigella sonnei*-1, D: *Shigella sonnei*-2, E: *Shigella flexneri*-1, F: *Shigella flexneri*-2, G: *Salmonella* sp.-1, and H: *Salmonella* sp.-2. AP: aerial parts; R: roots.

<sup>a</sup> Variety(green).

<sup>b</sup> Variety(red).

Table 3  
Percentage of inhibition of bacterial growth by aqueous plant extracts

Botanical species	Percentage of inhibition at 8 mg/mL							
	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Allium sativum</i>	0.0	20.0	20.0	24.4	8.3	0.0	0.0	0.0
<i>Aloysia triphylla</i>	0.0	6.7	24.0	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Annona cherimola</i>	0.0	6.7	8.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Artemisia absinthium</i>	0.0	20.0	28.0	11.1	16.7	12.0	0.0	0.0
<i>Artemisia ludoviciana</i>	0.0	20.0	4.0	0.0	16.7	0.0	3.7	0.0
<i>Bocconia frutescens</i>	0.0	26.7	24.0	11.1	8.3	0.0	3.7	0.0
<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	30.8	46.6	68.0	64.4	33.3	36.0	40.7	28.0
<i>Carica papaya</i>	0.0	20.0	4.0	2.2	0.0	4.0	0.0	0.0
<i>Chenopodium ambrosoides</i> <sup>a</sup>	0.0	13.3	20.0	15.6	0.0	4.0	0.0	0.0
<i>Chenopodium ambrosoides</i> <sup>b</sup>	0.0	33.3	20.0	11.1	8.3	20.0	0.0	0.0
<i>Chenopodium murale</i>	0.0	11.1	12.0	2.2	16.7	4.0	0.0	0.0
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	38.5	60.0	76.0	73.3	50.0	52.0	55.6	52.0
<i>Chrysactinia mexicana</i>	0.0	20.0	100.0	11.1	100.0	100.0	0.0	18.5
<i>Cocos nucifera</i>	38.5	46.7	60.0	55.6	33.3	36.0	33.3	20.0
<i>Dichondra argentea</i>	0.0	13.3	12.0	2.2	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Dorstenia contrajerva</i>	0.0	26.7	12.0	0.0	0.0	0.0	3.7	4.0
<i>Geranium mexicanum</i> (AP)	7.7	33.3	52.0	46.7	100.0	100.0	25.9	28.0
<i>Geranium mexicanum</i> (R)	53.8	60.0	76.0	73.3	100.0	100.0	55.6	52.0
<i>Hippocratea excelsa</i>	23.1	46.7	60.0	55.6	33.3	36.0	33.3	28.0
<i>Lippia alba</i>	0.0	20.0	48.0	24.4	16.7	12.0	3.7	0.0
<i>Lygodium venustum</i>	0.0	26.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Matricaria recutita</i>	6.9	32.4	14.8	1.0	11.1	5.9	0.0	5.9
<i>Ocimum basilicum</i>	0.0	33.3	36.0	24.4	33.3	36.0	18.5	12.0
<i>Punica granatum</i>	38.5	46.7	68.0	64.4	100.0	100.0	48.1	36.0
<i>Ruta chalepensis</i>	0.0	33.3	12.0	0.0	0.0	4.0	2.2	0.0
<i>Schinus molle</i>	7.7	46.7	40.0	28.9	33.3	20.0	11.1	4.0
<i>Senna villosa</i>	0.0	20.0	28.0	11.1	16.7	4.0	0.0	0.0
<i>Thymus vulgaris</i>	7.7	33.3	44.0	11.1	100.0	0.0	3.7	0.0
Chloramphenicol	10.0	14.6	11.9	25.5	12.9	8.8	5.4	0.0
Trimethoprim	100.0	100.0	51.7	29.2	100.0	100.0	100.0	100.0

Results are reported as mean ( $n=4$ ) and expressed as % inhibition. A: *Escherichia coli* ATCC 25922, B: *Escherichia coli* 0157:H7, C: *Shigella sonnei*-1, D: *Shigella sonnei*-2, E: *Shigella flexneri*-1, F: *Shigella flexneri*-2, G: *Salmonella* sp.-1, and H: *Salmonella* sp.-2. AP: Aerial parts; R: roots.

<sup>a</sup> Variety(green).

<sup>b</sup> Variety(red).

Regarding the efficiency of the antibiotics, all strains tested were resistant to the activity of chloramphenicol; the two *Escherichia coli* species, the two *Shigella flexneri* species and the two *Salmonella* sp. species were sensitive to trimethoprim, whereas the two *Shigella sonnei* species were resistant. Thus, the activity of some plant extracts was superior to that of the chloramphenicol. The activity of methanol extracts from *Thymus vulgaris* was better than trimethoprim.

#### 4. Conclusions

From this study we can conclude that *Caesalpinia pulcherrima*, *Chiranthodendron pentadactylon*, *Cocos nucifera*, *Geranium mexicanum* (roots and aerial parts), *Hippocratea excelsa*, and *Punica granatum* are plants with significant activity against enteropathogens and offer an alternative method to treat drug resistant enteric infections. This is the first evaluation of these plants against bacterial pathogen isolates, which cause diarrhea and dysentery in Mexican population.

The results of this study validate the use of these plants in Mexican traditional medicine in the treatment of gastroin-

testinal disorders such as dysentery and diarrhea and suggest that at least part of their action is due to their antibacterial property. Bioassay-directed fractionations of the active crude extracts, to isolate and identify the compounds responsible of the antibacterial activity, are in process.

#### Acknowledgements

We thank Silvia González and Margarita Carmolonga for helping with this study. The authors thank M.C. Abigaíl Aguilar from the IMSS-Herbarium for the identification of plants species. Part of this work was financed by grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (grant: 38030M).

#### References

- Aguilar, A., Camacho, J.R., Chino, S., 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica, 1st ed. IMSS, México.
- Calzada, F., Meckes, M., Cedillo-Rivera, R., 1998a. Screening of Mexican medicinal plants for antiprotozoal activity. *Pharmaceutical Biology* 36, 305–309.

- Calzada, F., Alanís, A.D., Meckes, M., 1998b. In vitro susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to some medicinal plants used by the people of southern Mexico. *Phytotherapy Research* 12, 70–72.
- Lennette, E.H., 1985. *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd ed. American Society for Microbiology, pp. 463–467.
- Lozoya, X., Aguilar, A., Camacho, J.R., 1987. Encuesta sobre el uso actual de plantas en la medicina tradicional mexicana. *Revista Medica del IMSS* 25, 283–291.
- Secretaría de Salud (SS), 2003. *Manual de Vigilancia Epidemiológica*, DGE, México. <http://www.ssa.gob.mx/epide/2003/sem49/cua4.1.html>.
- Torres, J., González-Arroyo, S., Pérez, R., Muñoz, O., 1995. Inappropriate treatment in children with bloody diarrhea: clinical and microbiological studies. *Archives Medical Research* 26, 23–29.
- World Health Organization (WHO), 1998. *The World Health Report. Life in the 21st Century: Vision for all. 2. Measuring Health*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, pp. 39–60.
- World Health Organization (WHO), 1996. Scientific Working Group, Resistance to antimicrobial agents. *Bulletin of the World Health Organization* 71, 335–336.
- World Health Organization (WHO), 2002. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. Organización Mundial de la Salud de Ginebra 1–9, 57.