

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE  
*Quassia amara*, *Gnaphalium canescens* y *Guazuma ulmitolia*

TESIS  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE QUÍMICO BACTERIOLOGO  
PARASITOLOGO

PRESENTA  
MARIA PATRICIA PATENA GUERRERO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, NUEVO LEON

ABRIL 2002

TL  
RS431  
.A6  
P3  
2002  
c.1

2002

MARIA PATRICIA PATIENA CORDERO



1080124438

CON ETERNA GRATITUD  
PARA LA DRA. CATALINA

DE SU ALUMNA QUE LA  
APRECIA MUCHO.

PATY. P.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS  
EXTRACTOS DE *Quassia amara*, *Gnaphalium canescens* y *Guazuma  
ulmifolia***

**TESIS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE QUÍMICO  
BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO**

**PRESENTA**

**MARÍA PATRICIA PATENA GUERRERO**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L.**

**ABRIL 2002**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS  
EXTRACTOS DE *Quassia amara*, *Gnaphalium canescens* y *Guazuma ulmifolia*

TESIS  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO  
BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO  
PRESENTA

MARÍA PATRICIA PATENA GUERRERO

---

DRA. CATALINA RIVAS MORALES  
PRESIDENTE

---

DRA. AZUCENA ORANDAY C.  
SECRETARIO

---

DRA. JULIA VERDE STAR  
VOCAL

---

Q.B.P. LYLIA G. MIRANDA VELASQUEZ  
SUPLENTE

**ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS  
EXTRACTOS DE *Quassia amara*, *Gnaphalium canescens* y *Guazuma ulmifolia***

**PRESENTA**

**MARÍA PATRICIA PATENA GUERRERO**

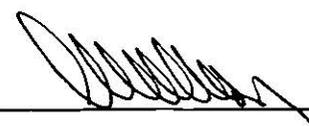
**ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN:**

El laboratorio de Química Analítica y el laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Catalina Rivas Morales y la Dra. Azucena Oranday Cárdenas.



---

**Directora de tesis**  
**Dra. Catalina Rivas Morales**



---

**Co-Directora de tesis**  
**Dra. Azucena Oranday Cárdenas**

**SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L.**

**ABRIL 2002**

## **DEDICATORIA**

### ***A Dios:***

*Por guiar mi camino y permitirme culminar mis metas. Gracias por enseñarme las cosas bellas de la vida y porque cuando he tropezado me has levantado. Y porque se que cada día al abrir los ojos estás conmigo.*

### **A mis padres:**

***Abraham Patena y Josefina Guerrero Vanegas***

*Por quererme y apoyarme siempre en mis decisiones, por ser mi mejor crítica, por que se que siempre estarán ahí cuando los necesite, por que se que están orgullosos de mí y esa es mi mejor recompensa. Y sobre todo por el gran ejemplo que me han dado. Los amo.*

### **A mis hermanos:**

***Omar y Julián***

*Por ser gran parte de mi felicidad, por que son un par de tremendos y por que me han impulsado a superarme para darles un buen ejemplo. Si muchas veces los he regañado, creo que ha sido por su bien. Los quiero y espero que siempre estemos unidos.*

### **A mi novio:**

***Oscar Rodríguez Álvarez***

*Por la dicha de haberte conocido, de que estés junto a mí y por enseñarme el verdadero amor. Porque siempre me has brindado tu ayuda, eres mi mejor amigo y eres la luz de mi camino. Te amo.*

***Mis logros son de ustedes, los amo.***

## **AGRADECIMIENTOS**

A la *Dra. Catalina Rivas Morales* por creer en mi, por las oportunidades que me ha brindado a lo largo de mi carrera. Gracias por los consejos y la paciencia que ha tenido y sobre todo por brindarme un poco de su amistad.

A la *Dra. Azucena Oranday Cárdenas* por sus grandes enseñanzas, su sincera amistad, por el tiempo que me ha brindado en la culminación de mi tesis y por tener una palabra de aliento siempre.

A la *Dra. Julia Verde Star* por su sincero apoyo en esta investigación, por la experiencia compartida y por su eterna alegría.

A la *Q.B.P. Lilia G. Miranda Velásquez* gracias por su apoyo y formar parte de mi comisión de tesis.

A la *M.C. Ma. del Consuelo González de la Rosa* por su valiosa cooperación en la identificación de las muestras botánicas estudiadas.

A *Oscar Rodríguez Á.* por su gran ayuda con el material fotográfico del presente trabajo

A mi tía *Irma* por ser como mi hermana y por que siempre me ha ayudado en todos los aspectos de mi vida. Te quiero mucho.

A mis abuelos, tíos y primos por la felicidad de tenerlos.

A las *Q.B.P. 's Yesenia Silva y Beatriz Padrón* por todos sus consejos y sin su ayuda esta investigación, no sería fácil y sobre todo por la gran amistad que me han brindado en este tiempo.

## Agradecimientos

---

A mi gran amiga *Gloria E. Espinosa* por los buenos y malos momentos que hemos pasado juntas. Por la paciencia que me ha tenido cuando soy demasiado terca.

A mis compañeros y amigos del laboratorio *Vicki* y *Gerardo* gracias por compartir alegrías, penas y triunfos juntos.

A mi amigo *Felipe* por su gran ayuda con los problemas de la PC. Cuando necesite un consejo ahí estaré.

A mis compañeros de generación y de karate, por que de alguna u otra manera me han permitido la dicha de conocerlos y aprender algo de cada uno.

A los maestros que a lo largo de mi vida han contribuido con mi enseñanza y han sembrado en mi la semilla de la superación, muchas gracias por todos sus conocimientos.

*No hay secretos para el éxito.  
Este se alcanza preparándose,  
trabajando arduamente y  
aprendiendo del fracaso.*

*C. Powell*

**AGRADECIMIENTO ESPECIAL**

Por otorgar el apoyo económico para la realización del presente trabajo a la U.A.N.L. en el programa de apoyo a la investigación científica y tecnológica (PAYCIT) con la clave CA 365-00.

## CONTENIDO

	Pagina
Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Índice	V
Lista de abreviaturas	VIII
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	X
Resumen	1
Abstract	2
1.- Introducción	3
2.- Antecedentes	5
2.1.- Generalidades	5
2.2.- Familia Simarubaceae	6
2.2.1.- <i>Quassia amara</i>	7
2.2.2.- Fitoquímica de <i>Quassia amara</i>	9
2.3.- Familia Asteraceae	14
2.3.1.- <i>Gnaphalium canescens</i>	15
2.3.2.- Fitoquímica de <i>Gnaphalium canescens</i>	18
2.4.- Familia Sterculiaceae	19
2.4.1.- <i>Guazuma ulmifolia</i>	19
2.4.2.- Fitoquímica de <i>Guazuma ulmifolia</i>	21
3.- Hipótesis.	24
4.- Objetivo general	24
4.1.- Objetivos específicos	24
5.- Materiales y Métodos	25
5.1.- Material vegetal	25
5.1.1.- Clasificación botánica de <i>Q. amara</i>	25
5.1.2.- Descripción botánica	25
5.1.3.- Distribución botánica	25

5.1.4.-Clasificación botánica de <i>G. canescens</i>	26
5.1.5.- Descripción botánica	26
5.1.6.- Distribución botánica	26
5.1.7.- Clasificación botánica de <i>G. ulmifolia</i>	27
5.1.8.- Descripción botánica	28
5.1.9.- Distribución botánica	28
5.2.- Preparación del material vegetal	32
5.3.- Extracción del material vegetal	32
5.4.- Evaluación de la actividad antimicrobiana	32
5.4.1.- Material biológico	32
5.4.2.- Activación de las cepas	33
5.4.3.- Cultivo de las bacterias	34
5.4.4.- Pruebas microbiológicas	34
5.5.- Aislamiento de los compuestos activos	34
5.5.1.- Métodos cromatograficos	34
5.5.1.1.- Cromatografía en capa delgada	34
5.5.1.2.- Agentes cromogenicos	35
5.6.- Localización de los compuestos activos	36
5.6.1.- Bioautografía	36
5.7.- Identificación de los compuestos activos	36
5.7.1.- Métodos químicos	36
5.7.2.- Métodos físicos	40
5.7.2.1.-Cromatografía de gases y espectrometría de masas	40
6.- Resultados	41
6.1.- Evaluación de la actividad antimicrobiana	41
6.2.- Aislamiento de los compuestos activos	45
6.3.- Localización de los compuestos activos	46
6.4.- Identificación de los compuestos activos	48
6.4.1.-Métodos químicos	48
6.4.2.- Métodos físicos	49
7.- Discusión	53

<b>8.- Conclusión</b>	57
<b>9.- Perspectivas</b>	59
<b>10.- Bibliografía</b>	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>CCD</b>	Cromatografía en Capa Delgada
<b>cm</b>	Centímetro
<b>DNFH</b>	Dinitrofenilhidracina
<b>er</b>	Enfermedades respiratorias
<b>y col.</b>	y colaboradores
<b>gr</b>	Gramos
<b>hrs.</b>	Horas
<b>IMSS</b>	Instituto Mexicano del Seguro Social
<b>L</b>	Litros
<b>m</b>	Metros
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min.</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros
<b>n</b>	Numero de repeticiones
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>Rf</b>	Relación de frentes
<b>smn</b>	sobre el nivel del mar
<b>sp</b>	Especie
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonias
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>µl</b>	Microlitro
<b>%</b>	Por ciento
<b>α</b>	Alfa
<b>β</b>	Beta

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura No.</b>	<b>Pagina</b>
1.- Estructuras de la familias Simarubaceae.	13
2.- Fórmula química de la Quasina.	23
3.- Fórmula química del Gnaphaliin.	23
4.- Distribución geográfica de <i>Q. amara</i> y <i>G. canescens</i> .	27
5.- Distribución geográfica de <i>G. ulmifolia</i> .	29
6.- Flor, hojas y corteza de <i>Q. amara</i> (Simarubaceae).	30
7.- Flores, hojas y tallo de <i>G. canescens</i> (Asteraceae).	30
8.- Hojas y frutos de <i>G. ulmifolia</i> (Sterculiaceae).	31
9.- Frutos de <i>G. ulmifolia</i> (Sterculiaceae).	31
10.- Efecto inhibitorio de los extractos hexánicos de <i>Q. amara</i> (A), <i>G. canescens</i> (B), <i>G. ulmifolia</i> (C) y del etanol sobre el crecimiento de <i>E. coli</i> .	44
11.- Efecto inhibitorio del cloranfenicol (A) y del extracto hexánico de <i>G. canescens</i> (B) sobre el crecimiento de <i>B. cereus</i> . A una concentración de 25mg/ml.	44
12.- Inhibición bacteriana de las fracciones separadas del extracto hexánico de <i>G. canescens</i> por el método bioautografico.	47
13.- Control negativo (etanol) por el método bioautografico.	47
14.- Cromatografía de gases para la fracción 4.	50
15.- Espectro de masas para el compuesto A.	51
16.- Espectro de masas para el compuesto B.	52

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla No.</b>		<b>Pagina</b>
1.-	Simarubólidos presentes en plantas de la familia Simarubaceae.	6
2.-	Compuestos presentes en <i>Q. amara</i> L. (Simaroubaceae).	12
3.-	Compuestos presentes en <i>G. ulmifolia</i> L. (Sterculiaceae).	22
4.-	Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Q. amara</i> .	41
5.-	Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>G. canescens</i> .	42
6.-	Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>G. ulmifolia</i> .	43
7.-	Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de <i>Q. amara</i> .	45
8.-	Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de <i>G. canescens</i> .	45
9.-	Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de <i>G. ulmifolia</i> .	46
10.-	Inhibición bacteriana por bioautografía.	46
11.-	Determinación de los grupos funcionales de los extractos de hexánicos de <i>Q. amara</i> , <i>G. canescens</i> y <i>G. ulmifolia</i> .	48
12.-	Determinación de los grupos funcionales de las fracciones activas de <i>G. canescens</i> .	49

## RESUMEN

En México existe una gran cantidad de plantas que poseen actividad biológica, muchas de las cuales no han sido estudiadas. Una de las ventajas del empleo de las plantas medicinales es que poseen un amplio rango de actividad antimicrobiana, debido a que contienen una gran cantidad de principios activos que las hacen tóxicas para los microorganismos. La importancia de este trabajo radica en aislar los principios activos presentes en *Quassia amara*, *Gnaphalium canescens* y *Guazuma ulmifolia* contribuyendo así a la quimiotaxonomía de sus familias y además determinar su actividad contra microorganismos de importancia médica. Las plantas secas se molieron y se colocaron en un matraz con solventes de polaridad creciente en un agitador por un periodo de 7 días a temperatura ambiente. Para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos se utilizó el método de difusión en placa, con etanol como control negativo y cloranfenicol (25mg/ml) como control positivo, se incubaron de 18-24 hrs. a 37°C; después de este periodo se midió el halo de inhibición. Se utilizó la cromatografía en capa delgada para la separación de los compuestos y el método bioautográfico para la localización de los compuestos activos. Además de métodos físicos y químicos para la identificación de los compuestos. Los resultados obtenidos fueron: los extractos de *Q. amara*, *G. canescens* y *G. ulmifolia* presentaron actividad contra los microorganismos estudiados en diferentes concentraciones. Y el extracto hexánico presentó mayor efecto inhibitorio en los tres casos. Solo el extracto hexánico de *G. canescens* presentó inhibición contra *B. cereus* por el método bioautográfico, en las bandas con Rf de 0.55, 0.65 y 0.68. Las pruebas químicas realizadas a las fracciones de *G. canescens* con actividad antimicrobiana dieron positivas a alcaloides, cumarinas, terpenos y saponinas. De la fracción activa se obtuvieron dos compuestos por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas, los cuales son ésteres de diferente peso molecular. Se proponen las siguientes estructuras:  $C_8H_{15}O_2$  y  $C_{10}H_{21}O_2$ .

notados, no!

**ABSTRACT**

In Mexico exists a great amount of plants that have biological activity, many of them have not been studied. One of the advantages of the use of the medicinal plants is that they have a wide rank of antimicrobial activity, because they contain a great amount of active principles that make them toxic for the microorganisms. The importance of this work is to isolate the active principles in *Quassia amara*, *Gnaphalium canescens* and *Guazuma ulmifolia* thus contributing to chemotaxonomy of their families and in addition determine their activity against microorganisms of medical importance. Dried plants were grinded and they were placed in flask with of increasing polarity solvents a shaker during 7 days at room temperature. In order to evaluate the extracts antimicrobial activity it was used the method of plate diffusion, the ethanol was the negative control and cloranfenicol (25mg/ml) was the positive control, they were incubated by 18-24 hrs. to 37 °C; after this period the inhibition halo was measured. It was thin layer chromatography to separate the compounds and the bioautografic method to locate the active compounds. In addition the physical and chemical methods to identify compounds. The obtained results were: the *Q. amara*, *G. canescens* and *G. ulmifolia* extracts show activity against the studied microorganisms at different concentrations. The hexanic extract showed greater inhibiting effect in the three cases. Only the of *G. canescens* hexanic extract presented inhibition against *B. cereus* by the bioautografic method, in the Rf of 0,55, 0,65 and 0.68 bands. The chemical tests made to the fractions of *G. canescens* with antimicrobial activity gave positive alkaloids, coumarines, terpenes and saponines. From the active fraction were obtained two compounds by gas chromatography connected to mass spectrometer, which are esters of different molecular weight. The following estructures are proposed: C<sub>8</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub> and C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>O<sub>2</sub>.

## 1.- INTRODUCCIÓN

Es indudable que en los últimos años ha surgido un renovado interés por las plantas medicinales que rodean nuestro entorno. El hombre hizo uso de las plantas medicinales desde el inicio de su historia en la Tierra. Ello le valió reconocer las diferentes plantas, así por medio del error y el acierto llegó a saber cuales le servían como alimento, como medicina, e incluso tener especial cuidado con aquellas que eran tóxicas.<sup>30,41,75</sup>

Se estima que más del 90 % de las especies vegetales no han sido aún exhaustivamente estudiadas. Por tal razón las enormes posibilidades que ofrecen las plantas medicinales para la atención de problemas de salud de las comunidades, nos enfrentan con el desafío de formular criterios que garanticen su empleo con seguridad y eficacia dentro del sistema de salud. Así como también conocer sus principios activos, usos, aplicaciones, efectos adversos e interacciones con otros fitomedicamentos o productos de síntesis.<sup>41,69,75</sup>

En la actualidad se ha observado que las bacterias, virus y parásitos son causantes de un gran número de enfermedades gastrointestinales a nivel mundial, además que estos microorganismos día con día están adquiriendo resistencia a los antibióticos.<sup>58,75</sup>

Las bacterias entéricas son un grupo al cual se le pone mucho énfasis, debido a que un gran número de cepas son patógenas para el hombre y los animales. Las bacterias entéricas gram-negativas son más comunes, que las gram-positivas.<sup>9</sup>

Una de las ventajas del empleo de las plantas medicinales es que poseen un amplio rango de actividad antimicrobiana, debido a que contienen una gran cantidad de principios activos que las hacen tóxicas para los microorganismos.<sup>62,68</sup>

Las plantas medicinales deben su acción a ciertos componentes denominados principios activos; los cuales son metabolitos secundarios (alcaloides, terpenoides, flavonoides, etc.) de las plantas, es decir, sustancias aparentemente poco importantes para la planta y que en muchos casos se consideran como desechos metabólicos.<sup>57,70</sup>

Debido a que la mayoría de los principios activos de las plantas son tóxicos a elevadas dosis, se recomienda desarrollar bioensayos. Ya que de esta manera podemos determinar su actividad biológica y contribuir con validez al uso de éstas como medicamentos.<sup>58</sup>

La búsqueda de productos naturales con actividad biológica, depende en gran parte del aislamiento y purificación de los metabolitos; así como nuevos métodos de espectroscopía, fitoquímica, farmacología y materias afines que han hecho importantes contribuciones a estas investigaciones.<sup>57,58</sup>

En la actualidad cerca del 50 % de los fármacos oficiales de patentes provienen de productos vegetales y el resto lo constituyen productos sintéticos, que en muchos casos, solo han sido sustituidos de drogas vegetales que se imitan en los laboratorios químicos para reducir su costo de producción.<sup>30</sup>

La importancia de este trabajo radica en aislar los principios activos presentes en *Quassia amara*, *Gnaphalium canescens* y *Guazuma ulmifolia* contribuyendo así a la quimiotaxonomía de sus familias y además determinar su actividad contra microorganismos de importancia médica.

## **2.- ANTECEDENTES**

### **2.1.- GENERALIDADES**

Desde la Edad Media ya se tenían conocimientos sobre el uso de las plantas, pero ellos se basaban en la teoría de las signaturas que propuso Paracelso. En la cual según el Creador había dejado señas que indicaban el uso de las plantas. Así, si una planta tenía hojas en forma de riñón ésta sería buena para problemas renales; si poseía un látex rojo sería indicación de que era buena para la sangre, etc.<sup>30</sup>

Los conceptos modernos de plantas medicinales comenzaron en Europa, en el siglo XVI, con la creación de los primeros herbarios. En América ya contaban con una antigua y vasta tradición herbolaria antes que los europeos descubrieran el Nuevo Mundo, la cual estaba fundamentada en el conocimiento empírico de las propiedades y las aplicaciones de las plantas medicinales.<sup>30,57</sup>

Los investigadores Mitcher, Allergrini y Pelecuer, en 1971, 1973 y 1976 respectivamente encontraron que un gran número de plantas presentaban efectos contra el crecimiento de diversas especies de bacterias. En ese tiempo se empezaron a buscar métodos de estandarización de la extracción de los compuestos antimicrobianos que pudieran tener las plantas.<sup>58</sup>

En 1991, March observó que el número de plantas encontrado con efectos inhibitorios sobre microorganismos crecía enormemente, además se dio cuenta que diversas fracciones extraídas de las plantas presentaban diferentes efectos dependiendo del tipo de solvente y tipo de separación usada.<sup>58</sup>

## 2.2.- FAMILIA SIMARUBACEAE

Son árboles o arbustos; generalmente con corteza, madera y semillas muy amargas. Consta de 32 géneros, 200 especies. Estos son árboles forestales de zonas áridas y subtropicales o tropicales de importancia farmacológica por los principios amargos que contienen las cortezas y las hojas.<sup>16,68</sup>

En el trópico mexicano merecen mención *Simarouba glauca* de fruto comestible, el pazak, pasaque o aceituno del estado de Chiapas y la península de Yucatán. *Quassia amara* “cuasia” de Sudamérica, *Alvaradoa amorphoides*, *Pricamnia*, *Bechia* y los arbolitos ornamentales de *Ailanthus*, de Asia; en las zonas áridas del norte del país se da la *Castela texana* (bisbirinda o chaparro amargoso), de propiedades medicinales y *Holacantha*, arbustos muy espinosos, desde Sonora hasta Coahuila. *Quassia amara* y varias especies de *Simarouba* han sido usadas localmente como antimaláricos, pero no tienen suficiente margen entre la dosis terapéutica y la tóxica. La familia Simarubaceae tiene un grupo distintivo de derivados diterpénicos, los simarubólidos.<sup>3,16,68</sup> Tabla No.1.

Tabla No.1. Simarubólidos presentes en plantas de la familia Simarubaceae.

PLANTA	SIMARUBOLIDOS
<i>Quassia amara</i>	Quasina y neoquasina
<i>Quassia glauca</i>	Glaucarubina y glaucarubinona
<i>Hannoa klaineana</i>	Klainenona y chaparrinona
<i>Perriera madagascariensis</i>	Glaucarubina y glaucarubinona
<i>Castela nicholsoni</i>	Chaparrina
<i>Brucea amarissima</i>	Bruceína A, B Y C
<i>Eurycoma longifolia</i>	Euricomalactona

### 2.2.1.- *Quassia amara*

La Cuasia (*Quassia amara*) es una planta que se utiliza muy poco, pertenece a la familia Simarubaceae y se le conoce como: amargo, bitterwood, guabo, hombre grande, corteza de jamaica, simaruba y madera de Surinam.<sup>66</sup>

Linneo le dio el calificativo de amara que en latín significa “amarga” y esa es la propiedad que caracteriza a los miembros de esta familia. Esta planta deriva su nombre de un habitante de Surinam llamado Quassi que a mediados del siglo XVIII adquirió fama tratando fiebres malignas.<sup>57,66</sup>

Antiguamente se decía que esta corteza mostraba una acción tónica, aperitiva, febrífuga, antihelmíntica, antidisentérica y antidiarreica. Además es una planta muy conocida por los principios amargos de la corteza del tallo usados por su propiedad tónica por los indígenas de Sur América y de Costa Rica contra fiebres palúdicas y para el dolor de estómago acompañado de cólico. Se menciona que su madera no es atacada por los insectos.<sup>41,7,74</sup>

En México se utiliza *Q. amara* y tiene los mismos efectos de la *Q. officinalis*. En donde se emplea la corteza que se vende comúnmente como fragmentos y se utiliza como: tónica, febrífuga, estomacal, antihelmíntica y para abrir el apetito. Además se ha utilizado durante mucho tiempo como saborizante amargo de refrescos y bebidas alcohólicas. Además constituye un plaguicida natural que no afecta al hombre ni a los animales domésticos.<sup>41,57,66</sup>

En los estados de Guanajuato, Puebla y Michoacán se utiliza para la bilis y contra *Ascaris lumbricoides*, en la atonía intestinal o en la convalecencia de afecciones febriles. La Sociedad Farmacéutica de México la reporta como antiséptico, aperitivo, catártico, tónico, eupéptico y contra la atonía vesical.<sup>65</sup>

Los investigadores de la India descubrieron la actividad larvicida de *Q. amara* contra varios tipos de insectos inclusive mosquitos. También los estudios clínicos han demostrado que la *Q. amara* es efectiva como un tratamiento para la infestación de cabeza (pediculosis). Otros investigadores han corroborado que el extracto acuoso de la planta facilita la cicatrización de las úlceras y la migración de células para la regeneración de los tejidos dañados.<sup>7, 27, 74</sup>

Un extracto etanólico preparado con savia de la planta y administrado a ratones por la vía intraperitoneal, mostró actividad frente a tumores del tipo Leuk-P388. Un extracto acuoso de hojas secas, provocó efectos tóxicos de tipo general sobre *Gambusia affinis* y sobre renacuajos de la especie *Bufo melanosticus*.<sup>65</sup>

La actividad antimicrobiana de *Q. glauca* ha sido demostrada contra las enterobacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* y *Shigella flexneri*). En 1756 se investigaron muestras de *Q. amara* en Estocolmo y en 1764 apareció la primera referencia como *Lignum quassie*, convirtiéndose en una medicina febrífuga, antidisentérica y tónica muy popular.<sup>13, 71, 72</sup>

Silen en 1988 menciona que el extracto de *Q. amara* presenta una importante actividad protectora de las lesiones gástricas inducidas por indometacina, etanol y estrés, que son modelos representativos de la enfermedad ulcerosa gástrica en el humano.<sup>7, 73, 74</sup>

Ninci en 1991 confirma la acción profiláctica y terapéutica de la *Q. amara* en la pediculosis humana.<sup>7</sup>

En 1996, Cáceres menciona que el extracto de *Q. amara* se comporta como un agente que de forma dependiente de la dosis, protege la mucosa gástrica contra estímulos inductores de lesiones, además de producir un efecto procinético intestinal.<sup>7, 72, 73</sup>

Los científicos de la Universidad de Texas demostraron en 1996 que un extracto acuoso de *Q. amara* tuvo propiedades antivirales *in vitro* contra células MT-2-linfoblastoides infectadas con HIV.<sup>71,72</sup>

En 1997 científicos en Nigeria documentaron que la *Q. amara* tiene efectos de antifertilidad *in vivo*. También realizaron estudios de toxicidad con ratas y ratones los cuales fueron negativos.<sup>71,72</sup>

En 1999 Gilbert trabajo con los extractos de dos plantas Nigerianas *Q. amara* y *Q. undulata*, demostrando sus propiedades antimaláricas significativas *in vivo*, utilizando las células de ratón parasitizadas con *Plasmodium berghei*.<sup>29</sup>

### **2.2.2.- FITOQUIMICA DE *Quassia amara***

Los simaroubolidanos se caracterizan por poseer un sabor amargo y un esqueleto *w* común, por llevar grupos lactónicos y presentar tres modificaciones con 19, 20 y 25 carbonos representadas por los esqueletos *x* (quasolidano), *y* (cedrolidano) y *z* (simaroudolidano). Este grupo de compuestos se ha aislado tanto de semillas, raíces, tallos, corteza y de sus frutos (Figura No.1). La abundancia de oxígenos es característica de estos compuesto, presentes como hidroxilos o carbonilos. Como se observa en la fórmula de la quasina de la *Q. amara* ( Figura No. 2).<sup>3</sup>

Se han aislado una gran cantidad de cuasinoides de plantas de la familia Simarubaceae, los cuales se han demostrado que tienen un amplio rango de actividad biológica como: antitumoral, antimalárica, antioxidante, insecticida, antiinflamatoria, amebicida y herbicida.<sup>36</sup>

Se ha encontrado que la madera que se obtiene de los tallos de *Q. amara* contiene compuestos como: los alcaloides derivados metil-hidroxilados de cantiona y cantindiona; el 1-metoxi-carbonil- $\beta$ -carbolina; los triterpenos paraína, el iso-compuesto

quasimarín, cuasin y cuatro isómeros, dos derivados hidroxilados y uno deshidrogenado y los esteroides  $\beta$ -sitostenona y  $\beta$ -sitoesterol.<sup>7,65</sup>

En las hojas, los pétalos de las flores y el duramen del tallo se han detectado el triterpeno cuasin y el monoterpene neocuasin, y en la savia los triterpenos quasimarín y similikalactona D. Además aceite volátil, extracto gomoso, pectina, fibra y sales minerales.<sup>65</sup>

Se ha identificado que los cuasinoídes son los responsables de la amargura y de la actividad farmacológica; muchos de ellos son amebicidas *in vitro e in vivo*. Los alcaloides no parecen contribuir al efecto antimalárico. Se ha reportado que el quasimarín tiene propiedades antileucémicas.<sup>41,66</sup>

Otros investigadores indican que el principio amargo de la cuasia es un alcaloide llamado cuasina, el cual se emplea medicinalmente para bajar la fiebre y estimular la secreción de bilis y de jugo gástrico.<sup>7, 65</sup>

El primer compuesto aislado de *Q. amara* fue el amarid 18-oxyquaxine por Casinovi en 1966. En 1976 Kupchana obtiene un cuasinoide de *Q. amara* que es el quasimarín y funciona contra la leucemia.<sup>18, 39</sup>

Una compañía japonesa patentó en 1986 varios cuasinoídes de *Q. amara* que se utilizaban como agentes contra úlceras. En el mismo año también E.U. aisló de la corteza otro compuesto fitoquímico llamado quasimarín que ha demostrado tener propiedades antineoplásicas, antileucémicas y antitumorales.<sup>71,72</sup>

En 1989, Barbetti obtiene dos alcaloides derivados del 1-6canthin (3-metil-4-metoxi-5-hidroxicanthin-2,6-dione y el 4-metoxi-5-hidroxicanthin-6-1-3-N-oxido) a partir de la corteza de *Q. amara*.<sup>8</sup>

Evans en 1991 demostró que el cuasin aislado de *Q. amara* era cinco veces más activo que el carbaryl, un agente larvicida sintético. Un año más tarde menciona que el cuasin funciona inhibiendo el desarrollo de la cutícula en las larvas de *Culex quinquefascietum*.<sup>24,25</sup>

Cabral en 1992 demostró que los cuasiniodes de *Q. guianensis* tenían actividad antimalárica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* y en 1993 aisló dos cuasinoideos el gutolactone y simalikalactone D, de la corteza de *Simaba guianensis* los cuales mostraban actividad antimalárica.<sup>12</sup>

Njar y col., en 1995 llevaron a cabo el fraccionamiento del extracto de *Q. amara* por cromatografía en donde obtuvieron el cuasin (1) y 2-methoxycanthin-6-one (2); Además demostraron que el compuesto 1 era el que provocaba la infertilidad en las células de rata *in vitro*.<sup>48</sup>

En 1996 Kitagawa y col., aislaron varios compuestos de los vástagos de la *Q. indica* los cuales mostraron propiedades citotóxicas y antiinflamatorias.<sup>12</sup>

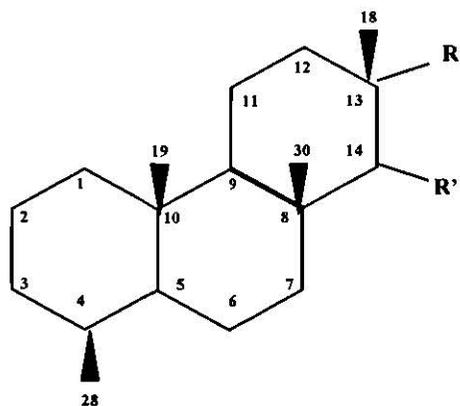
Raji en 1997 lleva a cabo un estudio *in vivo* con ratas en donde prueba los extractos de *Q. amara* y se da cuenta que uno de los compuestos (cuasin) de esta produce infertilidad.<sup>52</sup>

Akira Ozeki en 1998 encontró que los cuasinoideos de *Q. cedron* exhiben citotoxicidad *in vitro* con células de leucemia. En 1999 Apers y col., encontraron que la similikalactona obtenida de la corteza de la raíz de *Q. africana* era la responsable de la actividad antiviral.<sup>2,4</sup>

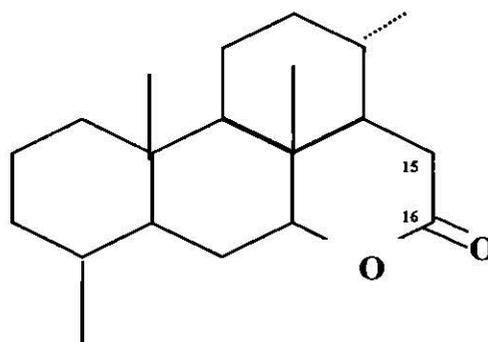
El Dr. Duke en 1992 realizó un estudio de los compuestos presentes en *Q. amara* L. (Simaroubaceae) y reportó la actividad que presenta cada uno de los compuestos aislados<sup>74</sup> (Tabla No.2).

Tabla No.2. Compuestos presentes en *Q. amara* L. (Simaroubaceae).

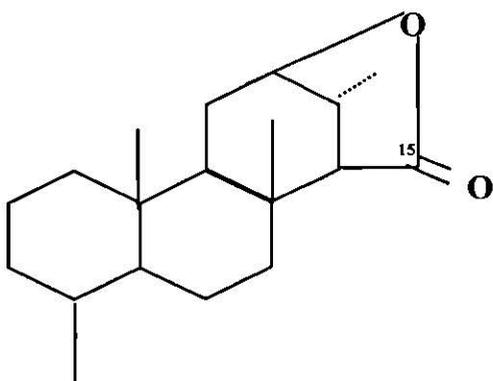
<b>COMPUESTO</b>	<b>PARTE</b>	<b>ACTIVIDAD</b>
18-HYDROXYCUASIN	Corteza	No reportada
ALCALOIDES	Corteza	No reportada
BETA-SITOSTENONE	Corteza	No reportada
CALCIO-TARTRATO	Raíz	No reportada
ISOCUASIN	Corteza	No reportada
NEOCUASIN	Corteza	No reportada
CUASINOL	Corteza	No reportada
CUASOL	Corteza	No reportada
POTASIO-ACETATO	Corteza	Condimento
CUASIN	Corteza	Amebicida, pesticida, insecticida, aperitivo y vomitivo.
ACIDO MALICO	Raíz	Bacteriostático, laxante y pesticida.
ACIDO GALICO	Raíz	Analgésico, antialergénico, antibacterial, antiespasmódico, antiinflamatorio, antitumoral, inmunomodulador, antiviral, pesticida, antioxidante y astringente.



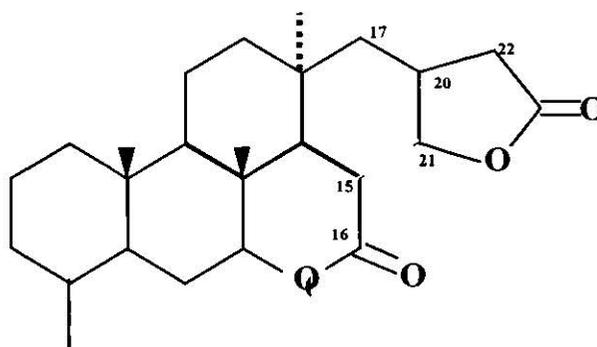
w (esqueleto común)



x (quasolidano)



y (cedrolidano)



z (simarolidano)

Figura No. 1. Estructuras de la familias Simarubaceae.

### **2.3.- FAMILIA ASTERACEAE**

Son hierbas o menos a menudo semiarborescentes, rara vez árboles pequeños o de talla mediana. Por su estructura floral y por su composición química, se considera la familia más evolucionada de todas las dicotiledóneas.<sup>16,55</sup>

La Familia Asteraceae (Compositae) es la más diversa y numerosa en el Neotrópico. El número exacto de su taxa no se ha precisado, últimamente los investigadores han reportado que la diversidad total a nivel mundial sería de 21,000-23,000 y de 1314 -1530 géneros. En México comprende alrededor de un 10-13% de la flora con aproximadamente 3000 taxones.<sup>16,55</sup>

La familia Asteraceae es una de las más numerosas del reino vegetal. Aunque un número reducido de ellas presenta utilidad agronómica, es una familia que comprende especies de gran importancia económica como malezas (géneros: *Bidens*, *Cirsium*, *Hypochaeris* y *Sonchus*), como plantas medicinales (*Matricaria chamomilla*, *Artemisia absinthium* y *Tussilago farfara*), como plantas ornamentales (géneros: *Aster*, *Bellis*, *Cosmos*, *Chrysanthemum*, *Gazania* y *Gerbera*), como plantas oleaginosas (*Carthamus tinctorius* y *Helianthus annuus*), y como plantas hortícolas.<sup>16,55</sup>

En la familia Asteraceae se han identificado una gran cantidad de metabolitos de tipo poliacetilénico e isoprenoide. A los cuales se les han encontrado propiedades de fitoalexinas (1970), citotóxicos (1994), compuestos alelopáticos (1986), estimulantes de la germinación de hongos (1977), nematocidas (1976) y antiinflamatorios (1994).<sup>16,55</sup>

Se han encontrado cerca de 700 poliiinos en plantas de la familia Asteraceae los cuales actúan contra bacterias, virus, hongos, nemátodos e insectos. También se han encontrado una gran cantidad de sesquiterpenlactonas en esta familia, las cuales se ha reportado que tienen actividad antimicrobiana y antifúngica.<sup>35</sup>

### **2.3.1.- *Gnaphalium canescens***

Esta especie es muy utilizada en varias regiones del centro y norte del país. Son varias las especies del género *Gnaphalium* que se conocen en México y a las cuales se les atribuyen las mismas propiedades medicinales, pero de distribución geográfica diferente. Fue introducida en América por los europeos y se encuentra particularmente en los terrenos secos, pedregosos y arenosos.<sup>16,57</sup>

El nombre del género procede del griego *gnaphalion*, una planta lanosa usada para rellenar cojines. Antiguamente se empleaba la raíz que se utilizaba para “purgar los humores flemáticos”. Después se empezó a utilizar las flores para curar la tos, la inflamación de garganta, las afecciones bronquiales y para apurar el parto.<sup>57</sup>

Dioscórides recomendaba su cocimiento para las rupturas, espasmos de nervios, las contusiones y tos. Andrés de Laguna: (1499-1568) utilizaba “Las hojas mojadas y puestas en forma de emplasto”, para mitigar todo género de dolor y principalmente el de las coyunturas. El cocimiento de las raíces y aplicadas con manteca de res, mitigan el dolor de las hemorroides y disminuyen su inflamación. Plinio reconocía su utilidad en casos de lesiones e irritaciones pulmonares.<sup>68,69</sup>

Hernández (1959) la reporta con el nombre náhuatl de Tzonpotónic. Y menciona que su cocimiento es útil para curar la tos, el empacho y los dolores del vientre. En el siglo XX, M. Martínez la reporta como: antirreumático, emoliente, antitusígeno, contra bronquitis y dolor de garganta. La Sociedad Farmacéutica de México la describe como antirreumático y emoliente.<sup>40,65</sup>

En un estudio comparativo que se hizo del gordolobo con dextrometorfan en 1985, sobre la duración e intensidad del síntoma de la tos, se encontró que el gordolobo fue capaz de disminuir la intensidad sin afectar la frecuencia; contrario a los resultados con el medicamento, concluyendo que el gordolobo permite mantener el mecanismo de defensa de la tos, pero con menos molestias.<sup>30</sup>

Se ha demostrado que *G. viscosum* muestra actividad antimicrobial, particularmente con bacterias que causan enfermedades respiratorias.<sup>65</sup>

Domínguez y Esquivel reportaron que *G. canescens* posee un diterpeno dicarbonílico.<sup>40</sup> (trabajo no publicado)

Cáceres en 1991 realizó un estudio de las 68 plantas más comúnmente utilizadas en Guatemala contra tres bacterias gram-positivas (*S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*) que causan infecciones respiratorias. Veintiocho de estos extractos (41,2%) inhibieron el crecimiento de una o más de las bacterias probadas. Las plantas de origen americano que exhibieron actividad antibacteriana fueron: *G. viscosum*, *Lippia alba*, *Lippia dulcis*, *Physalis philadelphica*, *Satureja brownei*, *Solanum nigrescens* y *Tagetes lucida*.<sup>13</sup>

En 1995 Kubo, encontró que *G. cheiranthifolium* era capaz de inhibir la enzima tirosinasa, la cual interviene en la muda de los insectos.<sup>37</sup>

Las plantas (*Abuta grandifolia*, *Cyperus articulatus*, *G. spicatum* y *Pothomorphe peltata*) usadas para el tratamiento de diversas infecciones por los grupos indígenas peruanos fueron evaluadas en 1995 con actividad antimicrobiana por el " método stroke " en placas de agar. Los organismos probados fueron: *S. aureus*, *E. coli*, *S. gallinarum*, *K. pneumoniae*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* y *M. gordonae*. Todas las plantas mostraron actividad antimicrobiana contra por lo menos uno de los organismos probados. *A. grandifolia* y *C. articulatus* inhibieron parcialmente el crecimiento de *P. aeruginosa*. *S. aureus* fue inhibida totalmente por *C. articulatus* y parcialmente por las demás.<sup>46</sup>

Macedo y col., en 1997 utilizaron los extractos etanólicos de 83 especies de plantas pertenecientes a la familia Asteraceae recogidas en Brasil, los cuales fueron probados contra los mosquitos de *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). El extracto de *Tagetes minuta* fue el más activo con un LC90 de 1,5 mg/l y LC50 de 1,0 mg/l. El extracto de *Eclipta paniculata* mostró también ser activo, con un LC90 de 17,2 mg/l y

LC50 de 3,3 mg/l. Los extractos de *Achyrocline satureoides*, *G. spicatum*, *Senecio brasiliensis*, *Trixis vauthieri*, *Tagetes patula* y *Vernonia ammophila* eran menos activos, matando más del 50% de las larvas solamente en la dosis más alta probada (100 mg/l).<sup>42</sup>

En 1999 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Hermosillo, Sonora, llevó a cabo un estudio en el que determinó cuales eran las plantas más utilizadas en la región encontrándose entre ellas el gordolobo (*Gnaphalium sp.*), eucalipto (*Eucalyptus sp.*, probablemente *E. globulus*), menta verde (*Mentha sp.*), y la manzanilla (*Matricaria chamomilla*).<sup>60</sup>

Villagomez en el 2001 llevo a cabo estudios sobre la actividad antibacteriana de los extractos hexánicos, metanólicos y del acetato de etilo de las flores, de las hojas y de los vástagos de *G. oxyphyllum var. oxyphyllum*, *G. liebmannii var. monticola* y *G. viscosum*. Los extractos hexánicos mostraron en todos los casos las inhibiciones más altas y el extracto de la flor del *G. oxyphyllum* fue el que exhibió la gama más amplia de actividad.<sup>64</sup>

Dieciocho extractos crudos, incluyendo seis hexánicos, seis clorofórmicos y seis metanólicos de seis diferentes especies de plantas usadas en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de infecciones respiratorias, fueron evaluados contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *E. coli*, y *C. albicans*. La concentración inhibitoria mínima fue determinada para cada extracto usando un análisis doble de la dilución. Los resultados mostraron que 16 extractos crudos (89%) exhibieron actividad antimicrobiana contra por lo menos uno de los microorganismos probados en las concentraciones de 5 mg/ml o menores. Los extractos de *G. oxyphyllum*, *G. americanum*, y *Crescentia alata* presentaron actividad antimicrobiana fuerte contra los patógenos probados.<sup>54</sup>

### 2.3.2.- FITOQUÍMICA *G. canescens*

El primer componente descubierto del gordolobo fue el mucílago. Poco después se encontraron saponinas y un poco de aceite esencial. No obstante, estos son los más importantes. El mucílago tiene propiedades suavizantes y emolientes, muy útiles para irritaciones del aparato digestivo, la piel y del aparato respiratorio. Las saponinas tienen acción expectorante y fluidificante de las secreciones bronquiales. Se han detectado flavonoides, glucósidos, compuestos poliacetilénicos y terpenos. Además contiene clorofila, varias sales minerales y ácido múxico.<sup>50,57,63</sup>

De *G. wrightii* se han aislado compuestos como sesquiterpenos, flavonoides y alqueninos. León aisló los siguientes metabolitos: estigmasterol,  $\beta$ -sitoesterol, ácido kaurenico, zoapatlina y 13-epi-esclareol de *G. liebmannii* var. *monticola*.<sup>37,64</sup>

En 1995 Kubo y col., aislaron por métodos espectroscópicos de un extracto metanólico de *G. cheiranthifolium* dos compuestos: el gnaphaliin y el 4 - $\beta$ -D-glucósido.<sup>37,64</sup>

Por métodos espectroscópicos ha sido identificada la estructura del gnaphaliin (5,7-dihidroxy-3,8-dimetoxiflavona), que es un flavonol encontrado en géneros de *Gnaphalium*<sup>21</sup> (Figura No. 3).

Los flavonoides: 5-hydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone (1), 5-hydroxy-3,6,7,8-tetramethoxyflavone (2), 5,6-dihydroxy-3, 7-dimethoxyflavone (3) y 4,4',6'-trihydroxy-2'-methoxychalcone (4), han sido aislados del genero *Gnaphalium* (Compositae). Los flavonoides 1, 2 y 3 fueron detectados en cantidades pequeñas en la planta por el análisis de HPLC, estos compuestos tienen actividad fuerte contra el insecto *Spodoptera litura*. Mientras que el flavonoide 4 fue detectado en una cantidad grande en la planta, pero este compuesto tenía solamente una actividad leve. Por lo tanto, estos compuestos naturales fueron considerados como uno de los sistemas defensivos de la planta contra insectos fitófagos junto con la superficie lanosa de la planta.<sup>47</sup>

Mondal señala en un estudio la composición de aminoácido libre del polen de 9 miembros de la familia Asteraceae con actividad alérgica entre los que se encuentran *G. indicum L.*, *Ageratum conyzoides L.*, *Blumea oxyodonta.*, *Eupatorium odoratum L.*, *Mikania scandens Willd.*, *Parthenium hysterophorus L.*, *Spilanthes acmella Murr.*, *Vernonia cinerea (L.) Lees.* y *Xanthium strumarium L.*<sup>45</sup>

## **2.4.- FAMILIA STERCULICEAE**

Son árboles o arbustos (a veces lianas o hierbas), con indumento estrellado o lepidotoandróforo. Son 65 géneros con 1000 especies. La familia es de distribución tropical y subtropical ampliamente representada en regiones cálidas y cálido templadas.<sup>16,70</sup>

Su importancia económica es incuestionable por el amplio beneficio que se obtiene del cacao, cultivo pantropical oriundo de México. El chocolate y los dulces preparados a base de la cocoa son de gusto universal, la planta *Theobroma cacao* ofrece caulifloria (flores nacidas en el tallo o tronco) y frutos grandes, rojos, a veces amarillos o anaranjados. Sus semillas son la fuente del cacao en polvo, que contiene teobromina y la manteca de cacao de uso medicinal. Otros géneros son: *Waltheria*, *Sterculia*, *Cola*, *Hermania*, *Ayenia*, y sobre todo la ampliamente conocida *Guazuma ulmifolia* (guácima) árbol de amplia distribución en México en selvas secundarias, a lo largo de ambos litorales.<sup>16,70</sup>

### **2.4.1.- *Guazuma ulmifolia***

La *G. ulmifolia* es una planta originaria de América de uso muy antiguo y se conoce con una gran variedad de nombres. La madera actualmente es usada para postes, carpintería en general, construcciones ligeras y como carbón. Es una importante fuente de forraje para el ganado en muchas áreas, particularmente durante la estación seca

cuando los pastos son escasos. Las semillas son comestibles, frescas ó cocidas y son utilizadas para tratar enfermedades. Parece ser que la terapéutica actual no ha tomado en consideración esta planta.<sup>65,68</sup>

Esta ha sido empleada en México desde hace muchos años por los mayas y los huastecos para tratar desordenes gastrointestinales y fiebres. Hernández la reporta en el siglo XVI como eficaz para cerrar llagas. A mediados del siglo XVIII, Osado en el libro del Judío relata: que cura la retención de orina. Otro uso que le dan es contra enfermedades gastrointestinales en el cual se emplean la corteza y hojas.<sup>65</sup>

La cocción de la parte aérea (hojas y frutos) la utilizan contra padecimientos renales, urinarios y como antidiabética. Otros padecimientos para la cual utilizan *G. ulmifolia* es para el dolor de abdomen, dolor de estómago, gastritis, enfermedades del hígado, “empacho” y para la bilis. Para la tos, ingieren el cocimiento de la raíz, fruto o corteza.<sup>64</sup>

También es utilizada para diversos trastornos ginecobstétricos por vía oral, como coagulante en casos de hemorragias, en menstruaciones irregulares, dolores menstruales, para estimular el parto, eliminar la placenta y para infecciones venéreas como la sífilis.<sup>65</sup>

Para el siglo XX, Maximino Martínez registra los siguientes usos: antipalúdico, antisifilítico, antitusígeno, aperitivo, astringente, para la dermatosis, elefantiasis, emoliente y como pectoral.<sup>65</sup>

Los extractos acuosos y alcohólicos de la corteza provocaron una ligera actividad relajante del músculo liso del duodeno de conejo. La tintura y el extracto etanólico acuoso de las hojas presentó actividad antibiótica contra *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis* y *S. dysenteriae* en estudios *in vitro*, y el extracto etanólico del mismo órgano ejerció una actividad citotóxica fuerte contra células del carcinoma humano CA-9KB, en estudios *in vitro*. Es efectiva contra *B. tabaci*.<sup>65</sup>

Desde el año 1987 se han realizado estudios de la efectividad de los extractos de hojas y corteza de *G. ulmifolia*, demostrando su efectividad *in vitro* sobre bacterias y hongos patógenos.

Alarcón y col., en 1996 trabajaron, con 24 plantas usadas popularmente en México para el control de la diabetes mellitus, entre ellas *G. ulmifolia* en la cual se observó que disminuye perceptiblemente el pico hiperglucémico y/o el área bajo la curva de la tolerancia de la glucosa.<sup>3</sup>

En 1990 se llevó a cabo un estudio de 84 plantas comúnmente utilizadas en Guatemala contra desordenes gastrointestinales. Los resultados indicaron que 34 (40,48%) plantas inhiben una o más de las enterobacterias (*E. coli*, *S. enteritis*, *S. typhi*, *S. dysenteriae* y *S. flexneri*) utilizadas. La bacteria más inhibida fue *S. typhi* (33,73%) y la más resistente fue *E. coli* (7,35%). Las plantas de origen americano que exhibieron la mejor actividad antibacteriana fueron: *Byrsonima crassifolia*, *Diphysa robinoides*, *Gnaphalium stramineum*, *Guazuma ulmifolia*, *Psidium guajava*, *Sambucus mexicana*, *Simarouba glauca*, *Smilax lundelii*, *Spondias purpurea* y *Tagetes lucida*.<sup>13,14</sup>

Una de las más recientes investigaciones de *G. ulmifolia* es la presencia de antioxidantes en la corteza y la eficiencia que tienen contra la prostaglandina sintetasa la cual es una enzima por que interviene en el proceso de replicación de los patógenos.<sup>70,75</sup>

#### **2.4.2.- FITOQUÍMICA DE *Guazuma ulmifolia***

En la hoja de *G. ulmifolia* se ha identificado el alcaloide cafeína. En un segundo estudio con material mexicano, se describe la presencia de taninos y la ausencia de alcaloides, flavonoides y saponinas están presentes en la corteza de esta planta. En la tabla No. 3 se presentan algunos compuestos aislados de *G. ulmifolia* por el Dr. Duke en 1992.<sup>65</sup>

Tabla No. 3. Compuestos presentes en *G. ulmifolia* L. (Sterculiaceae).

<b>COMPUESTO</b>	<b>PARTE</b>	<b>ACTIVIDAD</b>
CAFEÍNA	Hojas	Analgésico, antihistamínico, herbicida, insecticida, diurético, estimulante, antiviral anticarcinogénico, vasodilatador, neurotóxico y antioxidante.
FRIEDELIN-3ALFA-ACETATO	Planta	No reportada
FRIEDELIN-3BETA-OL	Planta	No reportada
MUCÍLAGO	Fruto	Previene el cáncer

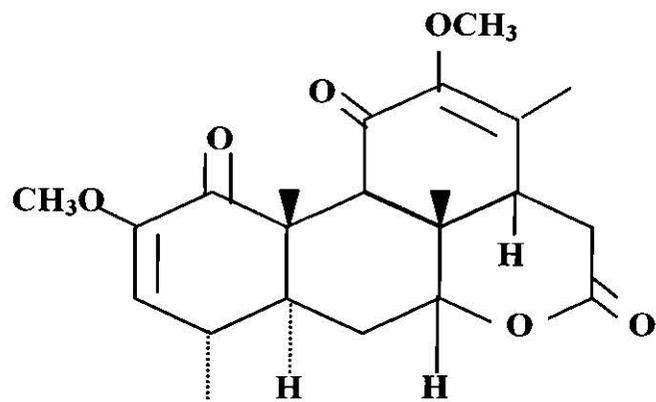


Figura No.2. Fórmula química de la Quasina.

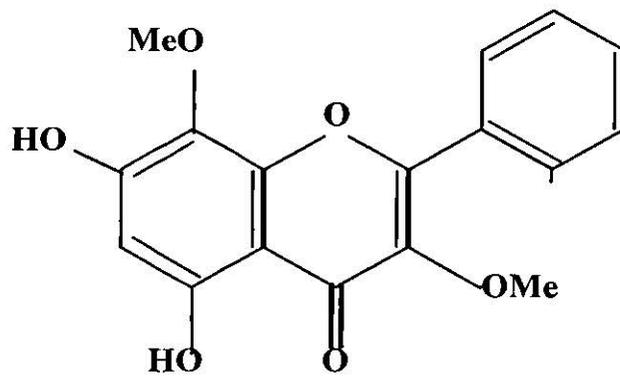


Figura No. 3. Fórmula química del Gnaphaliin

En base a los antecedentes mencionados y dada la importancia que representan las plantas medicinales para la atención de problemas de salud, se plantea lo siguiente:

### **3.- HIPÓTESIS**

Los principios activos de *Quassia amara*, *Gnaphalium canescens* y *Guazuma ulmifolia* presentan actividad biológica contra microorganismos causantes de enfermedades de importancia médica.

### **4.- OBJETIVO GENERAL**

Aislamiento e identificación de los principios activos de *Quassia amara* (cuasia), *Gnaphalium canescens* (gordolobo) y *Guazuma ulmifolia* (cuasima) con actividad contra microorganismos causantes de enfermedades de importancia médica.

#### **4.1.- OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Obtener los extractos de *Quassia amara* (cuasia), *Gnaphalium canescens* (gordolobo) y *Guazuma ulmifolia* (cuasima) con solventes de polaridad creciente.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de las plantas en estudio, sobre microorganismos de importancia médica.
3. Identificar los grupos funcionales presentes en los extractos de las plantas en estudio.
4. Determinar las fracciones con actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas.
5. Aislar, purificar e identificar los compuestos que presentan actividad biológica.

## **5.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1.- MATERIAL VEGETAL**

#### **5.1.1.- Clasificación botánica de *Quassia amara***

**Reino:** Plantae

**División:** Spermatophyta

**Clase:** Angiospermae

**Subclase:** Dicotiledónea

**Orden:** Geraniales

**Suborden:** Geraniineae

**Familia:** Simarubaceae

**Genero:** *Quassia*

**Especie:** *amara* L.

#### **5.1.2.- Descripción botánica**

Es un arbusto de dos o tres metros de altura. Las hojas son alternas, pecioladas, con tres o cinco hojuelas puntiagudas en las dos extremidades, oblongas, con nervios rojizos y salientes; el pecíolo es alado. Las flores son lacres. El fruto esta compuesto por cinco drupas separadas y negras y cada una contiene una nuez que, a su vez, encierra una semilla. La madera es blancuzca, se amarillenta al contacto con el aire (Figura No.6). La identificación de la planta fue realizada en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas con el número de herbario: 023511.

#### **5.1.3.- Distribución geográfica**

Es una planta Sudamericana, que es cultivada en Michoacán, Colima, Guerrero y Oaxaca (Figura No. 4). Esta planta habita en climas semisecos y templados entre los 1800 y los 2000m snm. Está presente en matorral xerófilo.

#### **5.1.4.- Clasificación botánica de *Gnaphalium canescens***

**Reino:** Plantae

**División:** Spermatophyta

**Clase:** Angiospermae

**Subclase:** Dicotiledónea

**Orden:** Asterales

**Suborden:** Asteridae

**Familia:** Asteraceae (Compositae)

**Genero:** *Gnaphalium*

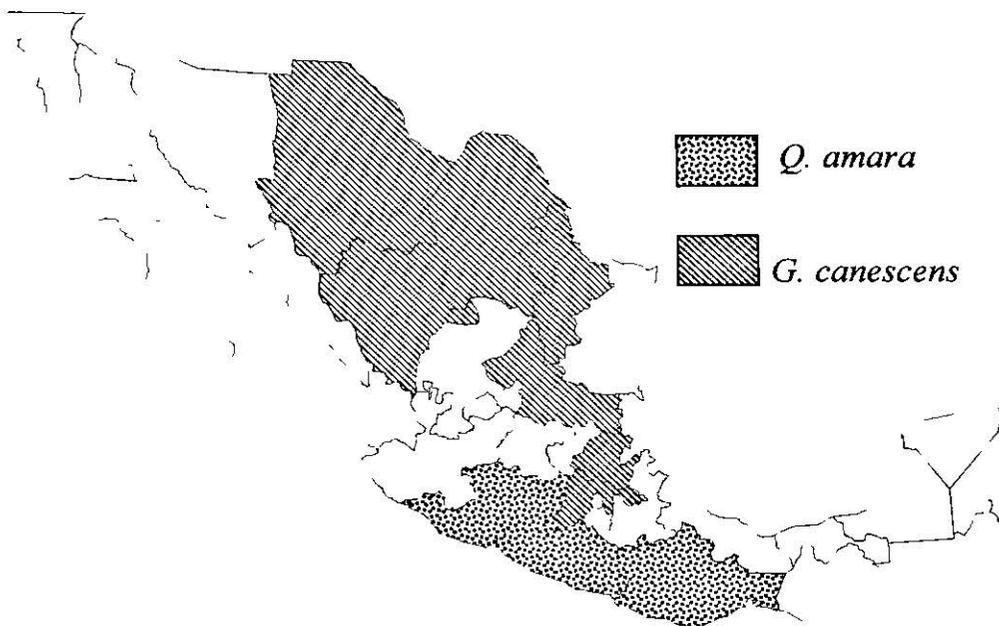
**Especie:** *canescens*

#### **5.1.5.- Descripción botánica**

Hierba perenne, ramificada, lanosa o glandulosa, de 20 a 80 cm de altura; hoja simple, alterna, verde o blanquecina, lineal-lanceolada, de 2 a 10 cm de largo, pubescente en ambas caras, ápice acuminado, entera, revoluta, base decurrente, sécil. Inflorescencia: cabezuela agrupada, cimoso-corimbosas; flor periférica femenina, numerosa de 2 o más series; flor del disco hermafrodita, ovario ínfero, 5 estambres; fruto aquenio oblongo, comprimido o redondo (Figura No. 7). La identificación de la planta fue realizada en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas con el número de herbario: 023509.

#### **5.1.6.- Distribución geográfica**

Planta nativa de México, se encuentra en Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Durango, San Luis Potosí, Hidalgo, Tlaxcala y el Valle de México (Figura No. 4). Crece silvestre en las montañas elevadas y hay 27 especies reportadas en el Valle de México.



**Figura No. 4. Distribución geográfica de *Q. amara* y *G. canescens*.**

#### **5.1.7.- Clasificación botánica de *Guazuma ulmifolia***

**Reino:** Plantae

**División:** Spermatophyta

**Clase:** Angiospermae

**Subclase:** Dicotiledónea

**Orden:** Malvales

**Suborden:** Malvinae

**Familia:** Sterculiaceae

**Genero:** *Guazuma*

**Especie:** *ulmifolia* L.

#### **5.1.8.- Descripción botánica**

La planta alcanza hasta 30 m de altura y entre 30-40 cm de diámetro y posee una copa de forma redonda. Las hojas, alternas de formas ovaladas ó lanceoladas tienen de 5-7 cm de largo y 2-5 cm de ancho, y poseen un margen finamente dentado. Las flores son marrón-amarillento y se forman en racimos en la base de las hojas. Las semillas son negras, redondas ó elípticas, de 1,5-3 cm de largo y son duras. Las cápsulas de las semillas contienen 5 celdas que se abren en el ápice y contienen muchas semillas de 3-5 mm diámetro (Figura 8 y 9). La identificación de la planta fue realizada en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas con el número de herbario: 023510

#### **5.1.9.- Distribución geográfica**

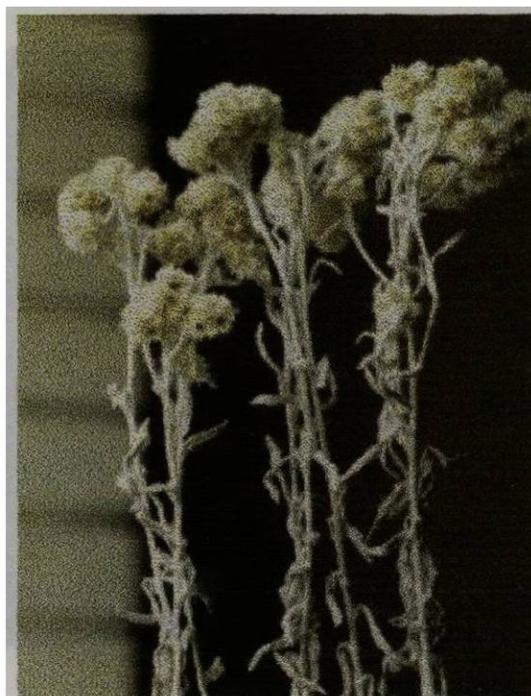
Es encontrada en México, América Central, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Paraguay, Argentina y Brasil (Figura No. 5). Ha sido cultivada en la India por cerca de 100 años. Ha sido recientemente introducida en Indonesia.



**Figura No. 5. Distribución geográfica de *G. ulmifolia***



**Figura No.6. Flor, hojas y corteza de *Quassia amara* (Simarubaceae)**



**Figura No.7. Flores, hojas y tallo de *Gnaphalium canescens* (Astereaceae)**



**Figura No.8. Hojas y frutos de *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae)**



**Figura No.9. Frutos de *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae)**

## **5.2.- PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

El material investigado fue: *Q. amara* (corteza) → de sudamericana?  
*G. canescens* (hojas, flores y tallo)  
*G. ulmifolia* (fruto)

Después de colectado el material se dejó secar a la sombra durante 8 días, posteriormente se trituro en un molino, cada planta por separado, para realizar la extracción.

## **5.3.- EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

La extracción de las tres plantas se llevó a cabo con solventes de polaridad creciente por la técnica de maceración a temperatura ambiente con agitación constante. Se colocó en un matraz 30 gr del material vegetal en 150 ml de hexano, se selló bien el matraz y se colocó en un agitador Dual Action Shaker Lab Line; por un periodo de 7 días; después se separó el solvente del extracto por medio de evaporación en la campana de extracción y se continuó la extracción con acetona y finalmente con metanol, siguiendo el mismo procedimiento que el primer solvente utilizado, de la misma manera para las tres plantas. Los extractos obtenidos se utilizan para realizar las pruebas microbiológicas.

## **5.4.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

### **5.4.1.- MATERIAL BIOLÓGICO**

En el presente estudio se seleccionaron 21 bacterias (gram-negativas y gram-positivas), de las cuales la mayoría son causantes de enfermedades gastrointestinales y solo unas de enfermedades respiratorias.

-Bacterias gram-negativas

- |                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| 1.- <i>Proteus vulgaris</i>       | 9.- <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>  |
| 2.- <i>Vibrio cholerae</i>        | 10.- <i>Serratia marcescens</i>         |
| 3.- <i>Salmonella typhimurium</i> | 11.- <i>Hafnia alvei</i>                |
| 4.- <i>Salmonella typhi</i>       | 12.- <i>Citrobacter freundii</i>        |
| 5.- <i>Shigella flexneri</i>      | 13.- <i>Klebsiella pneumoniae</i> (er)  |
| 6.- <i>Shigella sonnei</i>        | 14.- <i>Enterobacter aerogenes</i> (er) |
| 7.- <i>Escherichia coli</i>       | 15.- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (er) |
| 8.- <i>Klebsiella sp.</i>         | 16.- <i>Enterobacter cloacae</i>        |

-Bacterias gram-positivas

- |                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| 1.- <i>Staphylococcus aureus</i>  | 4.- <i>Listeria monocytogenes</i>      |
| 2.- <i>Streptococcus faecalis</i> | 5.- <i>Streptococcus pyogenes</i> (er) |
| 3.- <i>Bacillus cereus</i>        |  |

#### 5.4.2.- ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS

Se utilizó el medio líquido C. Rivas 8.5gr (dextrosa, peptona de colágena, extracto de levadura y sales) en 100ml de agua destilada para la activación de las cepas bacterianas. Para la preparación del medio se utilizó tubos de ensaye 18 X 100 a los cuales se les agregó 3ml del medio, se esterilizaron, posteriormente se tomó una azada de los microorganismos y se inocularon. Se incubaron por 18 - 24 hrs. a 37°C.

### **5.4.3.- CULTIVO DE BACTERIAS**

Se utilizó el medio sólido C. Rivas 8.5gr en 100ml de agua destilada, se esterilizó y se adicionó sobre cajas petri en proporciones de 20ml, que se utilizaron en las pruebas microbiológicas.

### **5.4.4.- PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS**

Para evaluar la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos se utilizó el método de difusión en placa, colocando 100µl del inóculo con una micropipeta Eppendorf (estandarizado a  $1 \times 10^6$  UFC por el método turbidimétrico de Mac Farland) difundiendo homogéneamente con un asa Driblasky, luego se colocaron discos de papel filtro (previamente estériles) impregnados con 10µl del extracto, también se colocaron un control negativo (etanol) y un antibiótico como control positivo (cloranfenicol), la concentración utilizada fue de 25mg/ml. Después se incubaron durante 18-24 hrs. a 37°C. Al final de este periodo se midió el halo de inhibición formado en cada prueba.

## **5.5.- AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS**

### **5.5.1.- MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS**

#### **5.5.1.1.-CROMATOGRAFÍA EN CAPA DELGADA**

Este método fue usado para la identificación y localización de las bandas. Las placas cromatográficas se prepararon utilizando silica gel 7G "TLC Baker" mezclada con agua, en una proporción de 10gr de silica / 30ml de agua evitando la formación de burbujas de aire y luego se aplicó sobre las placas de vidrio (7.5cm de largo x 2.5cm de ancho) con una pipeta Pasteur. Las placas se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se activaron a 100°C por una hora en la estufa.

En la placa activada se colocó la muestra por medio de un capilar, la placa se introdujo a una cámara de vidrio de boca ancha con tapa móvil, que contenía la mezcla de eluentes (éter-benceno-acetona-metanol) en diferentes proporciones (9:9:2:2) necesarias para su corrimiento. Se permitió que la muestra corriera por capilaridad hasta una distancia de aproximadamente 1cm del extremo superior de la placa, se sacó de la cámara y se secó a temperatura ambiente para evaporar los eluentes. El mismo procedimiento fue hecho con el solvente (etanol) en el que están disueltos los extractos, como un control negativo.

Para calcular el Rf se midió la distancia del punto de aplicación de la muestra hasta la mitad de la mancha detectada y se dividió este valor por la distancia del punto de aplicación hasta el frente del eluyente. Se necesitaron agentes cromogénicos para revelar el cromatograma.

#### **5.5.1.2.- AGENTES CROMOGÉNICOS**

Son necesarios para observar el cromatograma y localizar los componentes que no son apreciables al visible, se usaron : luz ultravioleta, vapores de yodo y cloruro de cobalto.

**-Luz ultravioleta.** El cromatograma se expuso a la luz ultravioleta de onda larga proveniente de una lámpara UVGL de una longitud de 365nm, se registraron las bandas y se calculó el Rf de cada una.

**-Vapores de yodo.** La placa cromatográfica, se colocó en un frasco oscuro y cerrado con 10 gr de yodo resublimado, después de 10 min. se observaron las manchas de color café y se registraron.

**-Cloruro de cobalto.** Se roció el cromatograma con la solución de cloruro, se dejó evaporar el reactivo y se calentó en la estufa a 120 °C por 10 min. La muestra con saponinas desarrollaron manchas color violeta. Preparación del cloruro de cobalto: a 400 ml de agua destilada se le agregan 10gr de  $\text{CoCl}_2$  y 50 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado añadiéndolo poco a poco. Y se afora a 500 ml de agua destilada.

## **5.6.- LOCALIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS**

### **5.6.1.- BIOAUTOGRAFÍA**

Se llevó a cabo por el método bioautográfico, el cuál se apoya en los métodos de difusión en placa y cromatografía. En este trabajo se utilizó el método de Hamburger modificado por Verástegui. Se seleccionaron los cromatogramas de los extractos hexánicos de cada planta en los cuales las fracciones mostraron mayor separación, así como un control negativo con el cromatograma en el que la muestra es el solvente (etanol) en el que están disueltos los extractos. Después se colocaron en cajas petri, se esterilizaron con luz ultravioleta por 2 hrs. y luego se les colocó una tira de medio sólido C. Rivas de 6 cm largo x 1 cm de ancho, con un espesor de 0.3mm; a la cuál se le colocó 100µl del microorganismo en estudio con una micropipeta Eppendorf y se distribuyó homogéneamente.

Las condiciones de humedad se mantuvieron colocando dentro de la caja petri un fragmento de algodón húmedo con 5ml. de agua destilada estéril. También se colocó un cuadro de agar de 1cm x 1cm inoculado con el mismo microorganismo, como control negativo dentro de la misma caja petri. Se incubó a una temperatura de 37 °C por un periodo de 24 hrs. La zona de inhibición fue medida y correlacionada con el Rf previamente registrado, facilitando así la identificación y aislamiento del compuesto responsable del efecto antimicrobiano.

## **5.7.- IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS**

### **5.7.1.- MÉTODOS QUÍMICOS**

- **Prueba de Ignición.** Esta prueba se utiliza para diferenciar un compuesto orgánico de un inorgánico. Se coloca una pequeña cantidad de muestra en una asa de platino y se lleva a la flama, si quedan cenizas se concluye que el compuesto es inorgánico.

- **Prueba de Liebermann-Burchard.** La prueba es para triterpenos y compuestos esteroidales (esteroles y metilesteroles). Se disuelven 5 gotas de la muestra en cloroformo y luego se añaden unas gotas del reactivo, la prueba es positiva al observarse cambios de coloración, si después de 15min aparece un color amarillo indica la presencia de un C-14-metilo y una  $\Delta^7$  insaturación. El reactivo se preparará agregando una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1.0 ml. de anhídrido acético y 1.0 ml de cloroformo.

- **Prueba de Salkowski.** Similar a la de Liebermann-Burchard, 10 gotas de la muestra en 1.0 ml de cloroformo se ponen en contacto con 1 ml de ácido sulfúrico, cuando es positiva la prueba se desarrollan colores amarillo o rojo, para esteroles y metilesteroles.

- **Prueba de Shinoda.** Para compuestos de tipo flavonoide (flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles ó xantomonas); a 6 gotas de la muestra disuelta en etanol, se le agregó unas limaduras de magnesio y después unas gotas de HCl por las paredes. Se considera positiva con la aparición de colores naranja rojo, rosa, azul o violeta.

- **Prueba del Ácido Sulfúrico.** Para compuestos de tipo flavonoide, una pequeña cantidad de muestra se disuelve en ácido sulfúrico concentrado y si la prueba es positiva se observan coloraciones amarillo para flavonas y flavonoles; naranja-guinda para flavononas y rojo-azuloso para chalconas y auronas. También se pueden detectar quinonas con coloración roja- púrpura.

- **Prueba de Baljet.** Para sesquiterpenlactonas; se agregan 8 gotas de la muestra y unas 3-4 gotas del reactivo, la prueba es positiva si se forma una coloración naranja o roja oscura. Para preparar el reactivo se utilizan 2 soluciones que se mezclan en volúmenes iguales antes de usarse, la solución A: 1gr de ácido pícrico en 100 ml de etanol; solución B: 10 gr de hidróxido de sodio en 100 ml de agua destilada.

- **Prueba de Bromo en Tetracloruro de carbono ( $\text{Br}_2/\text{CCl}_4$ ).** Para insaturaciones, a 5 gotas de la muestra contenida en un tubo de ensaye se le agregan unas gotas de la

solución de bromo al 2 % en tetracloruro de carbono y si la coloración de la solución desaparece en un principio la prueba se considerará positiva.

- **Prueba del Permanganato de potasio:** Para instauraciones, se disuelven 5 gotas de la muestra en agua, acetona o metanol y se le agrega la solución de permanganato de potasio. La prueba será positiva si se produce la decoloración del reactivo, el cual se prepara con una solución de permanganato de potasio al 2 % en agua.

- **Prueba del Cloruro férrico.** Para oxhidrilos fenólicos, se disuelve una pequeña cantidad de muestra en etanol y se le añaden 2 gota de solución de cloruro férrico en agua al 12.5 %. La aparición de una coloración o precipitado rojo, azul, violeta o verde se considerará como positiva.

- **Prueba de la 2,4- Dinitrofenilhidracina.** Para grupo carbonilo. En un tubo de ensaye se disuelven 10 gotas de 2,4-dinitrofenilhidracina en 1 ml de etanol caliente, se agregan 10 gotas de la muestra, se calienta a baño María por 10 a 15 min., se deja en reposo y luego se enfría en baño de hielo, la aparición de un precipitado indicará la presencia de un grupo carbonilo.

- **Prueba de Molisch.** Para carbohidratos. En un tubo de ensaye se colocan 5 gotas de la muestra, se añaden 3 gotas del reactivo y se agita. Después se inclina el tubo y se depositan 2 ml de ácido sulfúrico concentrado por la pared. La prueba es positiva si se forma un anillo coloreado en la interfase. El reactivo se preparará disolviendo 1gr de  $\alpha$ -naftol en 100 ml de etanol al 95 %.

- **Prueba del Hidróxido de sodio al 10%.** Es para cumarinas, unas gotas de la muestra se hacen reaccionar con una solución de NaOH al 10% dando un color amarillo ó anaranjado que desaparece al agregar unas gotas de HCl, ésto indica la presencia de un anillo lactónico y se considera la prueba positiva.

- **Prueba del Bicarbonato de sodio.** Para saponinas; 5 gotas de la muestra disueltas en agua, se hacen reaccionar con 3 gotas de la solución de bicarbonato al 10% y la aparición de burbujas indica que la prueba es positiva.

- **Prueba del Ácido sulfúrico-Formaldehído.** Para grupos aromáticos; 5 gotas de la muestra se disuelven en un solvente no aromático y se le agregan unas gotas del reactivo, si se observa un cambio de coloración rojo-violeta, la prueba es positiva. El reactivo se prepara con 1ml de  $H_2SO_4$  y una gota de formaldehído.

- **Prueba de Dragendorff.** Modificación de Munier y Machelobuf, para alcaloides. El reactivo se rocía sobre los cromatogramas ya corridos de los extractos hexánicos y la prueba será positiva al observar en la placa coloraciones rojo o naranja, persistentes por algunas horas. El reactivo se prepara con dos soluciones: Solución 1 : Se disuelven 0.85 gr de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40ml de agua. Solución 2: Se disuelven 8 gr de yoduro de potasio en 20 ml de agua. El reactivo se preparará mezclando 5 ml de la solución 1, 4 ml de la solución 2 y 100 ml de agua, el reactivo es estable por un año.

- **Prueba del 2,2-difenil-1-picrilhidrazil.** Para antioxidantes, el revelador se rocía sobre la CCD ya corrida y se considera positiva al dar color amarillo sobre fondo violeta.

- **Prueba de la Vanillina.** Para terpenos, el reactivo se rocía sobre los cromatogramas ya corridos de los extractos y se coloca en la estufa a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 8 min. Es positiva al observar en la placa coloraciones rojas o azules. El reactivo se prepara con 4gr de vanillina en 100ml de  $H_2SO_4$ .

- **Prueba de Bortrager.** Para cumarinas y antraquinonas. El reactivo se rocía sobre la CCD ya corrida y se considera positiva al observar coloración en la placa. El reactivo se prepara con KOH al 10% en etanol.

## **5.7.2.- MÉTODOS FÍSICOS**

### **5.7.2.1.- Cromatografía de gases - acoplado a espectrometría de masas**

La unión del cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas, tienen una extensa utilización. Esta es la mejor compatibilidad entre dos instrumentos: el cromatógrafo de gases separa los componentes de la mezcla y libera a uno por uno para la identificación en el espectrómetro de masas. Esto permite la identificación de compuestos presentes en cantidades tan bajas de  $10^{-6}$  a  $10^{-10}$  gr.

## 6.- RESULTADOS

## 6.1.- EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los tres extractos obtenidos de la corteza de *Q. amara* demostraron tener efecto inhibitorio sobre los microorganismos probados. Pero el extracto que presentó mayor actividad antimicrobiana fue el hexánico sobre *S. typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus*, *E. aerogenes* y *K. pneumoniae*, de los cuales los últimos dos se asocian más a enfermedades respiratorias (Tabla No.4.). Se utilizó un antibiótico como control positivo (cloranfenicol), la concentración utilizada para todos los casos fue de 25mg/ml.

Tabla No.4. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Q. amara*.

MICROORGANISMO	EXTRACTOS			Control (+)
	Hexánico	Acetónico	Metanólico	
1.- <i>Salmonella typhimurium</i>	+++	++	++	++++
2.- <i>Shigella sonnei</i>	+	+	+	++++
3.- <i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	++++
4.- <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	+	++	++++
5.- <i>Enterobacter aerogenes</i>	+++	+	++	++++
6.- <i>Citrobacter freundii</i>	++	++	+++	++++
7.- <i>Escherichia coli</i>	+++	++	++	++++
8.- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	+++	+++	+++	++++
9.- <i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	++++
10.- <i>Serratia marcescens</i>	++	++	+++	++++
11.- <i>Salmonella typhi</i>	+	+	+	++++
12.- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	++	+++	+++
13.- <i>Klebsiella sp.</i>	+	+	+	++++
14.- <i>Bacillus cereus</i>	+++	++	++	++++
15.- <i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+++
16.- <i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	++++
17.- <i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+	+	++++
18.- <i>Streptococcus faecalis</i>	+	+	+	++++
19.- <i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	++++
20.- <i>Vibrio cholerae</i>	+	+	+	++++
21.- <i>Hafnia alvei</i>	+	+	+	++++

n = 3 + inhibición de 0-1cm ++ inhibición de 1-1.5 cm +++ inhibición de 1.5-2.0 cm ++++ inhibición > a 2 cm.

Los extractos de *G. canescens* también mostraron efecto inhibitorio sobre los microorganismos utilizados, en diferente proporción. Pero el extracto hexánico fue el más activo, ya que presentó un halo de inhibición mayor a 2 cm sobre *B. cereus*, como lo presenta el control positivo (cloranfenicol). Tabla No. 5.

**Tabla No.5. Actividad antimicrobiana de los extractos de *G. canescens*.**

MICROORGANISMO	EXTRACTOS			Control (+)
	Hexánico	Acetónico	Metanólico	
1.- <i>Salmonella typhimurium</i>	++	+++	++	++++
2.- <i>Shigella sonnei</i>	+	+	+	++++
3.- <i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	++++
4.- <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	+	+	++++
5.- <i>Enterobacter aerogenes</i>	++	++	++	++++
6.- <i>Citrobacter freundii</i>	+++	+++	++	++++
7.- <i>Escherichia coli</i>	++	++	+++	++++
8.- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	++	+++	++++
9.- <i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	++++
10.- <i>Serratia marcescens</i>	++	++	++	++++
11.- <i>Salmonella typhi</i>	+	+	+	++++
12.- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	++	++	+++
13.- <i>Klebsiella sp.</i>	+	+	+	++++
14.- <i>Bacillus cereus</i>	++++	+++	++	++++
15.- <i>Staphylococcus aureus</i>	++	+	+	+++
16.- <i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	++++
17.- <i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+	+	++++
18.- <i>Streptococcus faecalis</i>	+	+	+	++++
19.- <i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	++++
20.- <i>Vibrio cholerae</i>	+	+	+	++++
21.- <i>Hafnia alvei</i>	+	+	+	++++

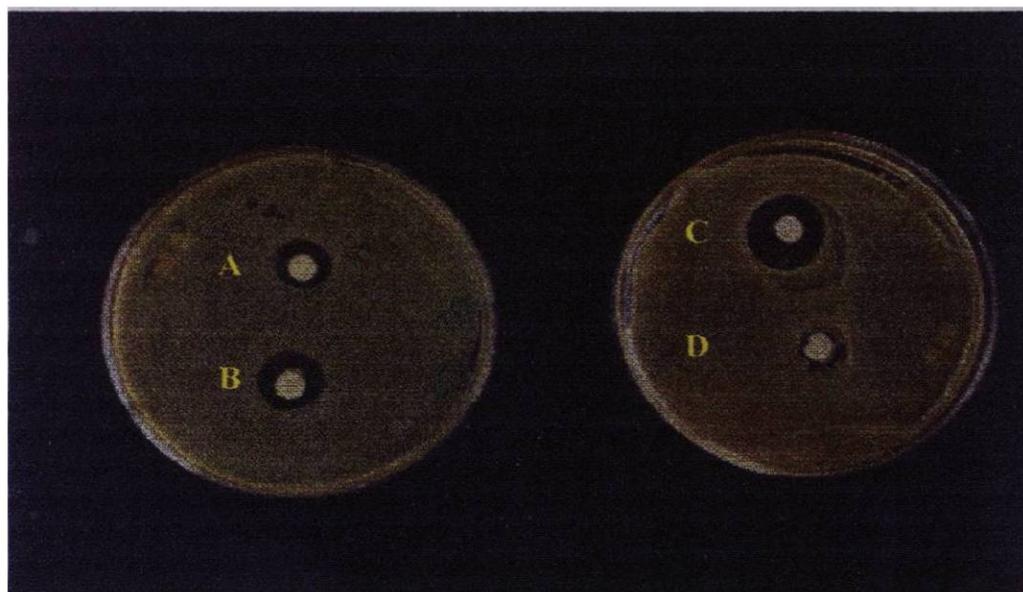
n = 3 + inhibición de 0-1 cm ++ inhibición de 1-1.5 cm +++ inhibición de 1.5-2.0 cm ++++ inhibición > a 2 cm.

El extracto hexánico obtenido del fruto de *G. ulmifolia* demostró ser el que mayor efecto inhibitorio presentó sobre los microorganismos estudiados. El extracto acetónico y metanólico también mostraron actividad antimicrobiana pero sobre un número menor de microorganismos. De los microorganismos más sensibles al extracto hexánico, solo *B. cereus* se asocia a enfermedades gastrointestinales (Tabla No. 6).

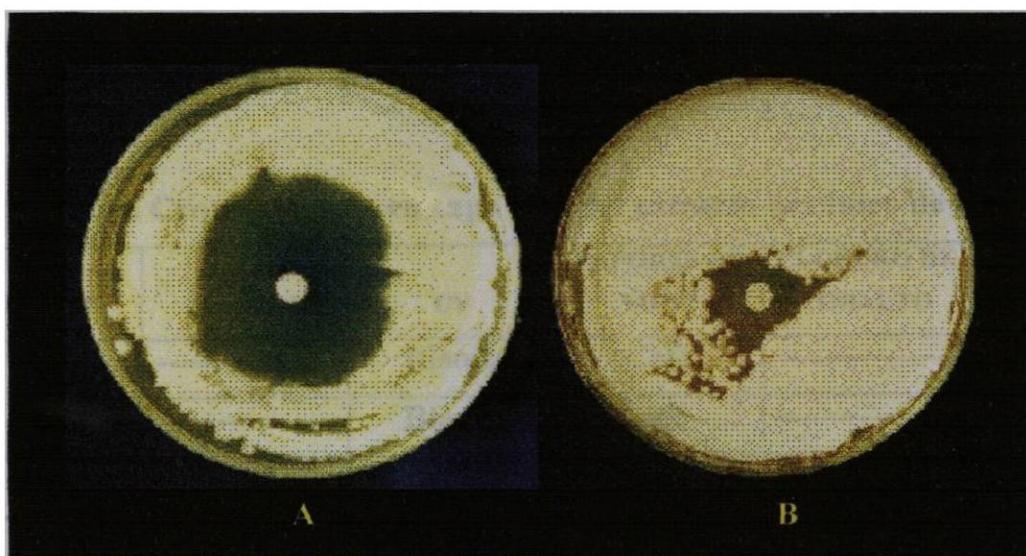
Tabla No. 6. Actividad antimicrobiana de los extractos de *G. ulmifolia*.

MICROORGANISMO	EXTRACTOS			Control (+)
	Hexánico	Acetónico	Metanólico	
1.- <i>Salmonella typhimurium</i>	++	++	++	++++
2.- <i>Shigella sonnei</i>	+	+	+	++++
3.- <i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	++++
4.- <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	+	++	+	++++
5.- <i>Enterobacter aerogenes</i>	+++	++	+++	++++
6.- <i>Citrobacter freundii</i>	++	++	++	++++
7.- <i>Escherichia coli</i>	++	++	++	++++
8.- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	+++	+++	++	++++
9.- <i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+	++++
10.- <i>Serratia marcescens</i>	++	++	++	++++
11.- <i>Salmonella typhi</i>	+	+	+	++++
12.- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	++	++	+++
13.- <i>Klebsiella sp.</i>	+	+	+	++++
14.- <i>Bacillus cereus</i>	+++	+++	++	++++
15.- <i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+++
16.- <i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+	++++
17.- <i>Streptococcus pyogenes</i>	+	+	+	++++
18.- <i>Streptococcus faecalis</i>	+	+	+	++++
19.- <i>Proteus vulgaris</i>	+	+	+	++++
20.- <i>Vibrio cholerae</i>	+	+	+	++++
21.- <i>Hafnia alvei</i>	+	+	+	++++

n = 3 + inhibición de 0-1cm ++ inhibición de 1-1.5 cm +++ inhibición de 1.5-2.0 cm ++++ inhibición > a 2 cm.



**Figura No. 10. Efecto inhibitorio de los extractos hexánicos de *Q. amara* (A), *G. canescens* (B), *G. ulmifolia* (C) y del etanol (D) sobre el crecimiento de *E. coli*.**



**Figura No.11. Efecto inhibitorio del cloranfenicol (A) y del extracto hexánico de *G. canescens* (B) sobre el crecimiento de *B. cereus*. A una concentración de 25mg/ml.**

## 6.2.- AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS

Para la separación de bandas en cromatografía en capa fina (CCD) se utilizaron 26 eluentes entre mezclas de solvente y solvente solos. El mejor eluyente fue una mezcla de éter de petróleo-benceno-acetona-metanol (9:9:2:2) para los tres extractos hexánicos, ya que son estos los que presentan mayor efecto inhibitorio sobre los microorganismos. No se realizó la CCD para los extractos acetónicos y metanólicos de las plantas por su baja actividad biológica. La revelación de las bandas se hizo al visible, con vapores de yodo, luz ultravioleta y cloruro de cobalto. Los resultados se muestran en las tablas número 7, 8 y 9.

**Tabla No.7. Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de *Q. amara*.**

BANDAS	VISIBLE	UV	VAPORES DE YODO	CLORURO DE COBALTO	Rf
1	-----	Blanca	Café oscuro	-----	0.28
2	-----	Azul	Café oscuro	-----	0.34
3	-----	Lila	Café	-----	0.50
4	Amarilla	Verde	Café	-----	0.61

**Tabla No. 8. Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de *G. canescens*.**

BANDAS	VISIBLE	UV	VAPORES DE YODO	CLORURO DE COBALTO	Rf
1	-----	Blanca	Café	-----	0.35
2	-----	Blanca	café	-----	0.44
3	-----	Morada	Café	-----	0.55
4	-----	-----	Café claro	Morada	0.65
5	Amarilla	Verde	Café claro	-----	0.68

**Tabla No. 9. Cromatografía en capa fina del extracto hexánico de *G. ulmifolia*.**

BANDAS	VISIBLE	UV	VAPORES DE YODO	CLORURO DE COBALTO	Rf
1	-----	Amarilla	Café	-----	0.29
2	-----	Lila	Café claro	Morada	0.41
3	-----	Café	Café	-----	0.50
4	Verde	Verde	Café claro	-----	0.69

### 6.3.- LOCALIZACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS

Se llevó a cabo por el método bioautografico y se utilizaron los tres microorganismo más sensibles a los extractos hexánicos. Como se observa en la tabla no.10, el único extracto que presentó inhibición fue el de *G. canescens* contra *B. cereus*; En las bandas con Rf de 0.55, 0.65 y 0.68. También se llevó a cabo un control negativo (etanol) para ver si mostraba inhibición con algún microorganismo.

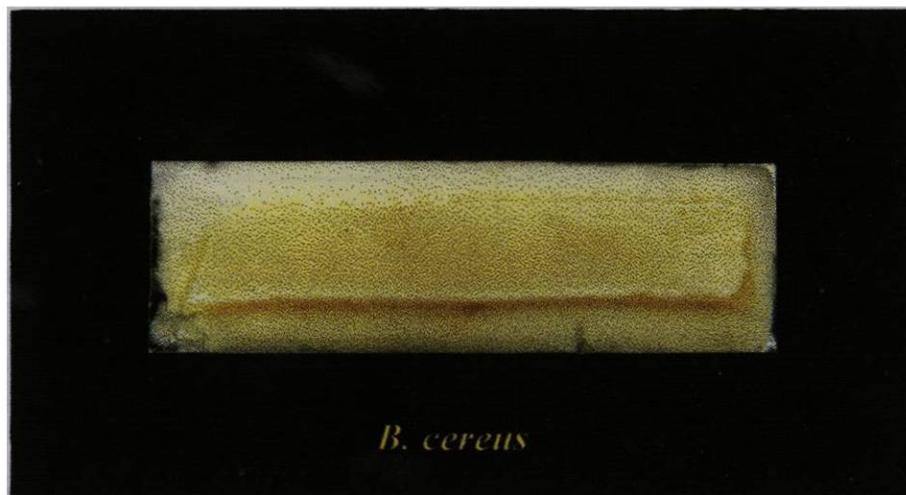
**Tabla No.10. Inhibición bacteriana por bioautografía.**

MICROORGANISMO	EXTRACTO HEXÁNICO DE			
	<i>Q. amara</i>	<i>G. canescens</i>	<i>G. ulmifolia</i>	Control (-)
<i>Bacillus cereus</i>	NI	SI	NI	NI
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NI	NI	NI	NI
<i>Escherichia coli</i>	NI	NI	NI	NI

n=3 NI = no inhibición SI = si inhibición



**Figura No. 12. Inhibición bacteriana de las fracciones separadas del extracto hexánico de *G. canescens* por el método bioautográfico.**



**Figura No. 13. Control negativo (etanol) por el método bioautográfico.**

## 6.4.- IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS

### 6.4.1.-Métodos químicos

Se llevaron a cabo pruebas químicas a los extractos hexánicos de las tres plantas, para observar los grupos funcionales que presenta cada una. Se puede observar en la Tabla No.11 la presencia de alcaloides, sesquiterpenlactonas, carbohidratos, terpenos y otros grupos funcionales más.

También se realizaron pruebas químicas a las fracciones con actividad antimicrobiana de *G. canescens* dando positiva para alcaloides, terpenos, saponinas y cumarinas (Tabla No. 12).

**Tabla No.11. Determinación de los grupos funcionales de los extractos de hexánicos de *Q. amara*, *G. canescens* y *G. ulmifolia*.**

PRUEBAS PARA GRUPOS FUNCIONALES	EXTRACTOS HEXÁNICOS		
	<i>Q. a</i>	<i>G. c</i>	<i>G. u</i>
Ignición (orgánico e inorgánico)	orgánico	orgánico	orgánico
Liebermann-Burchard (triterpenos)	-	-	-
Salkowski (esteroles)	+	+	+
Shinoda (flavonoides)	+	+	-
Ácido sulfúrico (flavonoides)	+	+	+
Baljet (sesquiterpenlactonas)	+	+	-
Dragendorff (alcaloides)	+	+	-
Br <sub>2</sub> /CCl <sub>4</sub> (insaturaciones)	-	-	-
KMnO <sub>4</sub> (insaturaciones)	+	+	+
FeCL <sub>3</sub> (oxidrilos fenólicos)	-	+	-
2-4DNFH (carbonilo)	+	+	-
Molisch (carbohidratos)	+	+	+
NaOH (cumarinas)	+	+	-
Bicarbonato de sodio (saponinas)	-	+	+
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Formaldehído (aromáticos)	+	+	+
2,2difetil-1-picirilhidrazil (antioxidantes)	baja	moderada	baja
Borntrager (cumarinas)	+	+	-
Vanillina (terpenos)	+	+	+

+ presente, - ausente

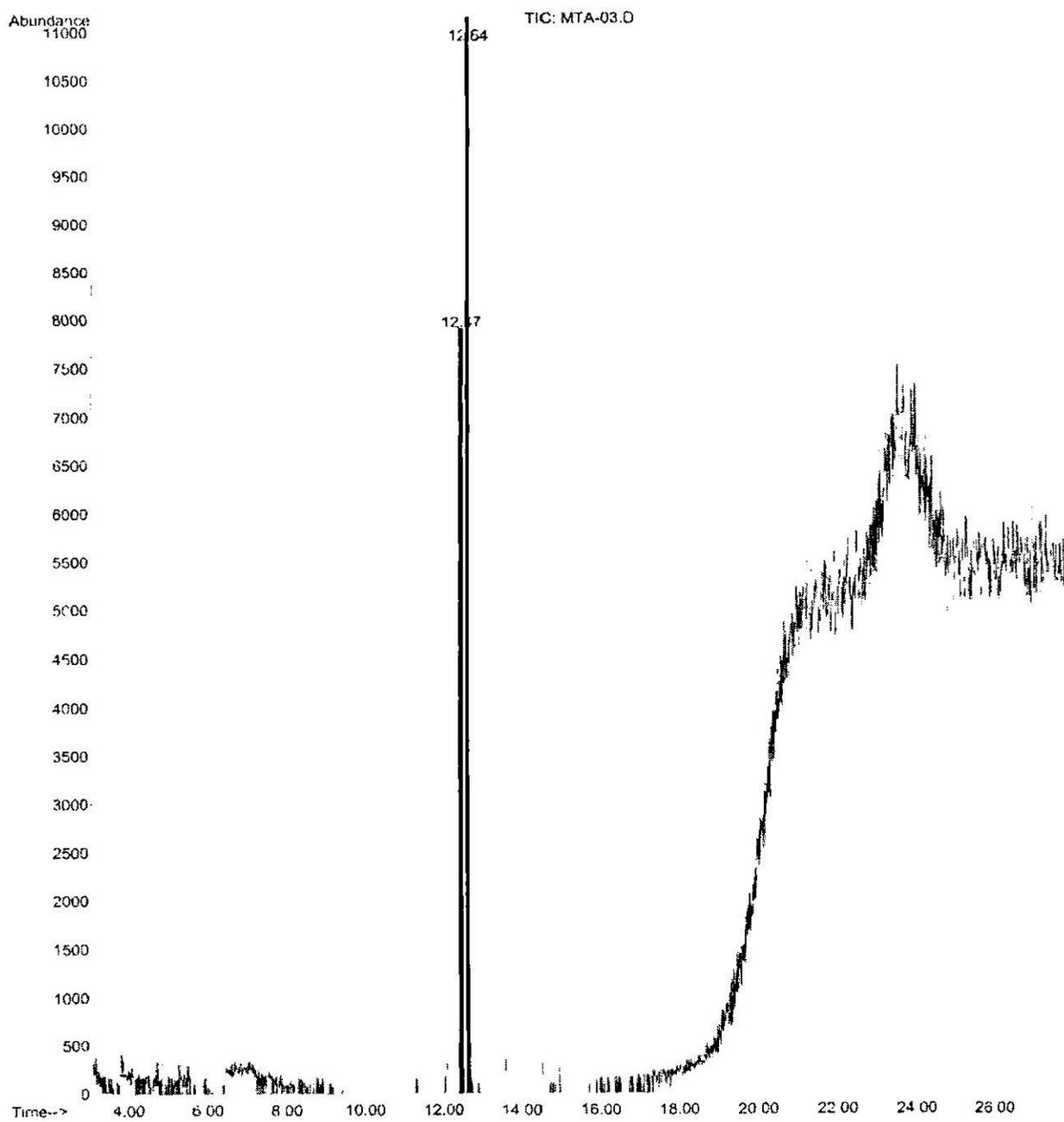
**Tabla No.12. Determinación de los grupos funcionales de las fracciones activas de *G. canescens***

PRUEBAS PARA GRUPOS FUNCIONALES	<i>G. canescens</i>		
	FRACCION # 3	FRACCION # 4	FRACCION # 5
Liebermann-Burchard (triterpenos)	-	-	-
Salkowski (esteroles)	-	-	-
Shinoda (flavonoide)	-	-	-
Ácido sulfúrico (flavonoides)	-	-	-
Baljet (sesquiterpenlactonas)	-	-	-
Dragendorff (alcaloides)	+	+	-
Br <sub>2</sub> /CCl <sub>4</sub> (insaturaciones)	-	-	-
KMnO <sub>4</sub> (insaturaciones)	-	-	-
FeCl <sub>3</sub> (oxidrilos fenólicos)	-	-	-
2-4DNFH (carbonilo)	-	-	-
Molisch (azúcares)	-	-	-
NaOH (cumarinas)	-	-	-
Bicarbonato de sodio (saponinas)	-	-	-
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Formaldehído (aromáticos)	-	-	-
Borntrager (cumarinas)	+	-	+
Vanillina (terpenos)	-	+	-
CoCl <sub>2</sub> (saponinas)	-	+	-

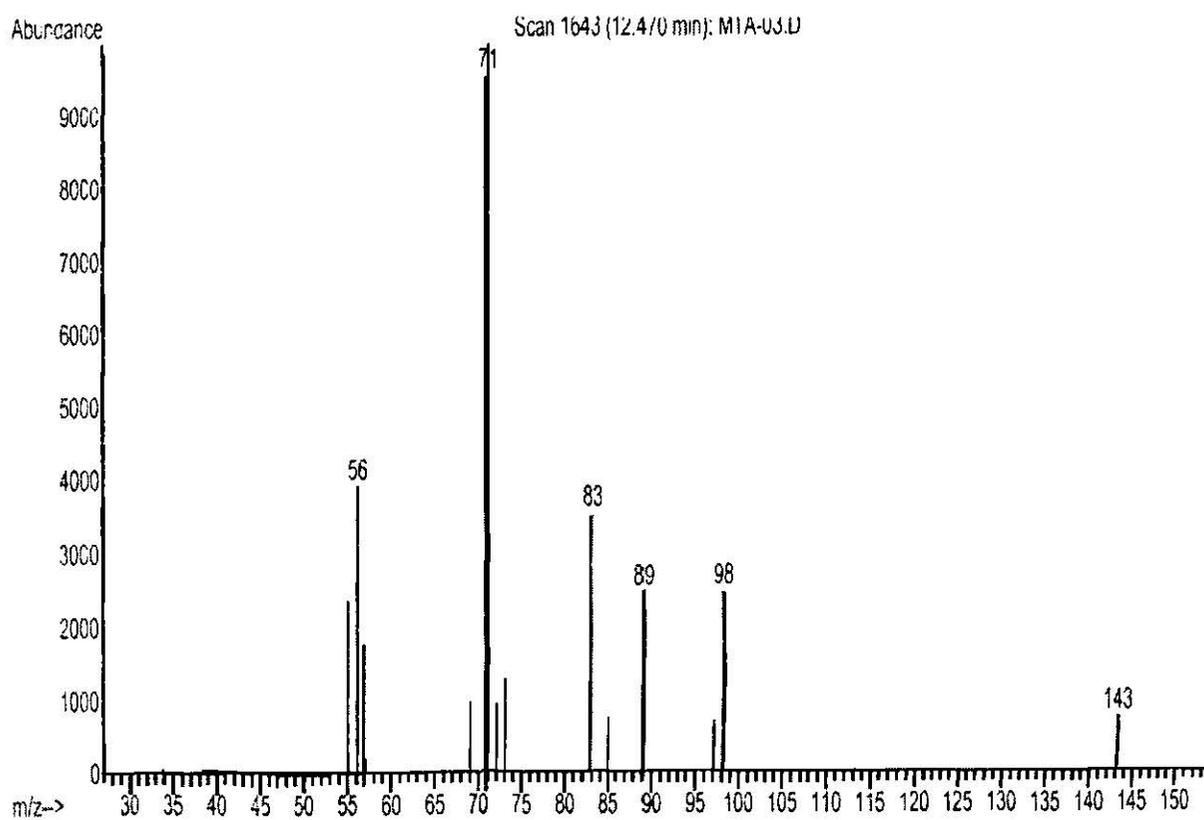
+ presente, - ausente

#### 6.4.2.- Métodos físicos

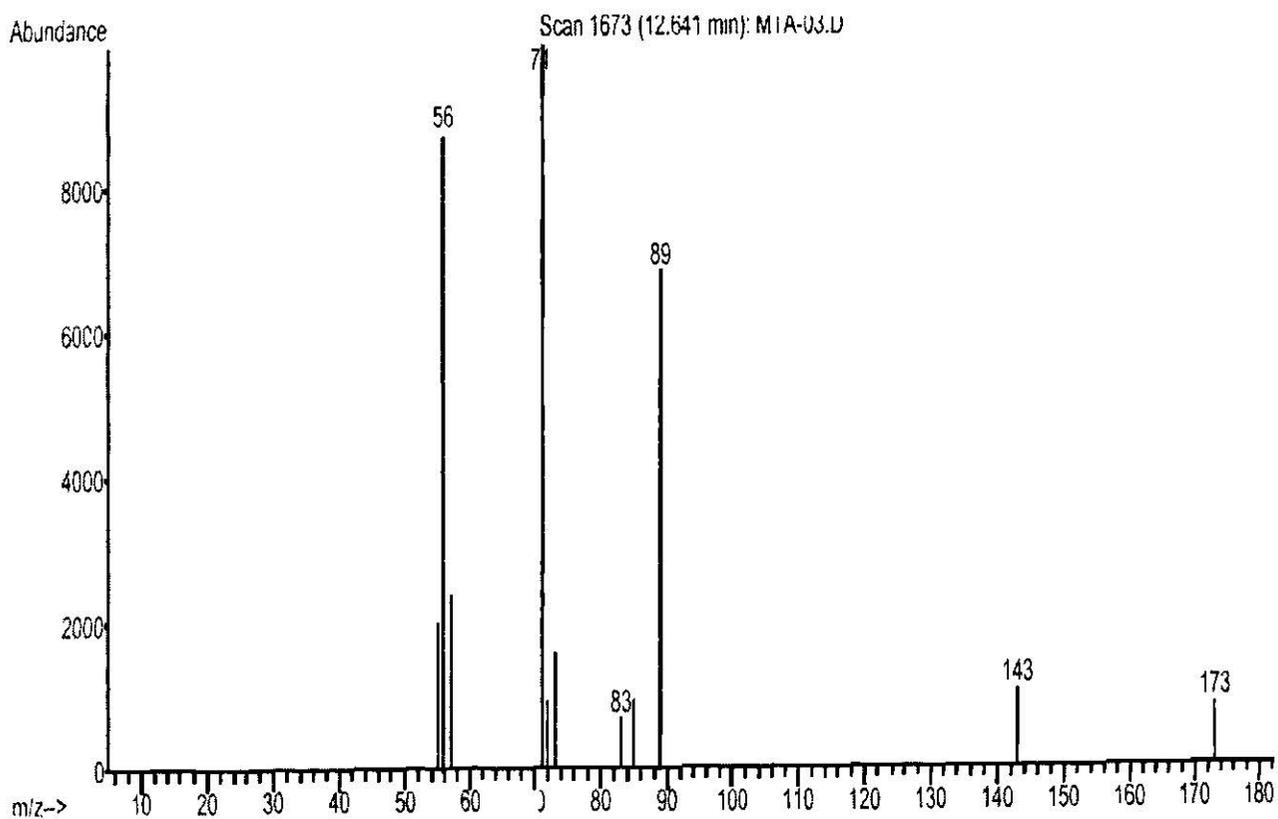
Las bandas que presentaron inhibición por el método bioautográfico fueron analizadas por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas, la fracción número 4 con R<sub>f</sub> de 0.65 presentó dos componentes eluidos a los 12.47 (A) min. y a los 12.64 (B) min. respectivamente, como se observa en la figura No.14. El espectro de masas para el compuesto A presenta un peso molecular a m/e = 143 y el compuesto B a un m/e = 173, ambos componentes resultan muy parecidos en los picos obtenidos. El pico base de ambos fue de 71, correspondiente a los ésteres. Figuras No.15 y 16.



**Figura No. 14. Cromatografía de gases para la fracción 4.**



**Figura No. 15. Espectro de masas para el compuesto A.**



**Figura No. 16. Espectro de masas para el compuesto B.**

## 7.- DISCUSIÓN

En el uso popular se recomienda a la *Q. amara* para tratar dolores estomacales y algunos autores la mencionan como medicina antidisentérica; En esta investigación se encontró que los extractos de *Q. amara* mostraron una baja actividad contra las bacterias, en su mayoría entericas. Tal vez los extractos de la *Q. amara* no sean efectivos contra bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales, pero si protegen la mucosa gástrica como lo menciona Cáceres.

En México se conocen varias especies del género *Gnaphalium*, con las mismas propiedades medicinales. Autores como Hernández y Martínez reportan al *G. canescens* como emoliente, antirreumático, para el dolor del vientre y de garganta. Algunos investigadores como Villagomez y Rojas han hecho estudios sobre la actividad antibacteriana de los extractos de *G. viscosum*, *G. spicatum*, *G. oxyphyllum* var. *oxyphyllum*, *G. liebmannii* var. *monticola* y *G. americanum*. Ellos han probado sus extractos en concentraciones de 5 mg/ml o menores contra microorganismos gram positivos y gram negativos como: *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y han observado que los extractos exhibieron una actividad antimicrobiana fuerte contra por lo menos uno de los patógenos probados.

Esto concuerda con nuestra investigación ya que los tres extractos de *G. canescens* presentaron actividad antimicrobiana pero en diferente concentración, los microorganismos mas fuertemente inhibidos fueron *S. typhimurium*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *B. cereus* con una concentración de 25mg/mL. Este ultimo microorganismo fue el más fuertemente inhibido, con el extracto hexánico y mostró un halo de inhibición mayor a 2 cm, como el control positivo. Estos resultados también concuerdan con los de Villagomez en el 2001, ya que sus extractos hexánicos mostraron en todos los casos inhibiciones. Esta inhibición es muy importante ya que *B. cereus* es un productor de enterotoxinas que contaminan los alimentos y su mecanismos de acción no se limita a las alteraciones situadas exclusivamente sobre la permeabilidad intestinal.

También podemos darnos cuenta que los extractos *G. canescens* presentaron mayor inhibición sobre microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales y el uso popular la utiliza mayormente para padecimientos respiratorios.

A *G. ulmifolia* se le ha puesto muy poco interés en cuanto a estudios en general. En el uso popular generalmente se emplea la corteza y las hojas para tratar enfermedades gastrointestinales y la parte aérea (frutos y hojas) para padecimientos renales, urinarios, antidiabéticos y la tos. Cáceres en 1990 llevó a cabo un estudio de algunas plantas utilizadas en Guatemala contra desordenes gastrointestinales entre ellas *G. ulmifolia* y sus resultados indicaron que esta planta se encontró dentro de las que inhibieron una o más de las enterobacterias (*E. coli*, *S. enteritidis*, *S. typhi*, *S. dysenteriae* y *S. flexneri*) utilizadas. Él no menciona que parte de la planta utilizó para su estudio. Esto debido a que nuestros resultado no concuerdan con los de él. En esta investigación se utilizaron los fruto de *G. ulmifolia* y la actividad contra bacterias entéricas fue muy poca. Los extractos hexánicos que presentaron mayor efecto inhibitorio contra microorganismos asociados a enfermedades respiratorias como *E. aerógenes* y *K. pneumoniae*.

En los tres casos se observó que el solvente de menor polaridad (hexánico) fue el más activo contra los microorganismos probados, quizás sea el que más compuestos extrae de la planta, los cuales pueden actuar de manera antagonista y como coadyuvantes; y por lo tanto producir mayor actividad antimicrobiana.

Las presencia de saponinas solo fue detectada en *G. canescens* y *G. ulmifolia* mediante un revelador que es el cloruro de cobalto, esto debido a que las saponinas y sus agliconas insaturadas ó con varios hidroxilos, no absorben al UV; aunque los insaturados dan una señal entre 205-210nm.

Solo el extracto hexánico de *G. canescens* dio positiva a la prueba de inhibición por bioautografía contra *B. cereus*, mientras que *E. coli* y *K. pneumoniae* no fueron inhibidos. También se llevó a cabo un control negativo para descartar que el etanol o la silica eran causantes de la inhibición y se observó que no producía inhibición.

Entre los grupos funcionales presentes en la fracción con Rf de 0.55 se encuentran alcaloides y cumarinas. La fracción con Rf 0.65 fue la que presentó mayor número de grupos funcionales entre ellos terpenos, saponinas y alcaloides. La fracción con Rf de 0.68 solo presentó cumarinas. Tal vez los terpenos sean los causantes de la actividad biológica, ya que la literatura (55) los ha reportado como citotóxicos.

Las fracciones separadas de los extractos hexánicos de *Q. amara* y *G. ulmifolia* en cromatograma no mostraron actividad antimicrobiana por el método bioautográfico, debido posiblemente a la acción sinérgica de todos sus componentes. Al menos en la concentración utilizada.

Duke menciona que el ácido málico y gálico son responsables de la actividad antibacteriana y se encuentran presentes en la raíz de *Q. amara*. En este estudio se utilizó la corteza y tal vez sea esta la principal razón de la baja actividad antimicrobiana, el mismo autor la reporta como amebicida, condimento, aperitiva, etc.

Kengo menciona que los cuasinoides de las plantas de la familia Simarubaceae, poseen actividad antioxidante y con las pruebas químicas que se realizaron se observó que la *Q. amara* posee una muy baja actividad antioxidante. Otros investigadores como Duke y Domínguez mencionan que en la corteza se pueden encontrar alcaloides y diterpenos, lo cual concuerda con las pruebas químicas realizadas, la de Dragendorff y de la vanillina fueron positivas.

Hudson menciona que algunos miembros de la familia Asteraceae poseen sesquiterpenlactonas con actividad antimicrobiana, en este trabajo se encontró la presencia de las sesquiterpenlactonas en el extracto hexánico de *G. canescens*, pero no fueron los responsables de la actividad biológica.

Mongelli menciona que del género *Gnaphalium* se han aislado flavonoides, esto se confirmó con las pruebas químicas de Shinoda y del ácido sulfúrico. La presencia de saponinas y terpenos también coincidieron con la literatura (30,57).

Los grupos funcionales presentes en el fruto de *G. ulmifolia* fueron muy pocos, tal vez por eso se le da muy poca importancia al estudio de este fruto y se le pone más énfasis a las hojas y corteza, que han sido reportadas por algunos autores.

Al observar los resultados de las pruebas químicas para insaturaciones de los extractos hexánicos, se puede notar que la prueba del permanganato de potasio si da positiva, mientras que la bromo en tetracloruro de carbono no, tal vez la principal diferencia se deba a la poca estabilidad que presenta el segundo reactivo.

En las pruebas químicas realizadas a las fracciones con actividad antimicrobiana del extracto hexánico, se observo que la prueba de Borntrager dio positiva y la de hidróxido de sodio negativa, siendo ambas para detectar la presencia de cumarinas. La diferencia sería que en la primera es más fácil detectar y en la segunda la cantidad de cumarina presente en la fracción es muy baja. Cabe mencionar que para establecer con certeza un grupo funcional es necesario realizar estudios espectroscópicos.

Al observar los espectros de masas podemos decir que los compuestos son muy parecidos, ya que muestran picos muy similares, pero se diferencian en su peso molecular, el compuesto A tiene un ion molecular de 143 y el compuesto B un  $m/e = 173$  con estos datos y pico base a  $m/e = 71$ , además otro pico característico con un peso molecular de 56 podemos decir que se trata de un ester en ambos casos, ya que son las características que muestra los ésteres.<sup>59</sup> Con los datos obtenidos podríamos decir que la estructura para el compuesto A es  $C_8H_{15}O_2$  y para el compuesto B es  $C_{10}H_{21}O_2$ . Los cuales son casi iguales solo que el compuesto B posee dos metilos más, siendo su peso molecular mayor y el compuesto A posee un pico con un  $m/e = 98$  debido a la perdida de un  $CH_3CH_2O$ .

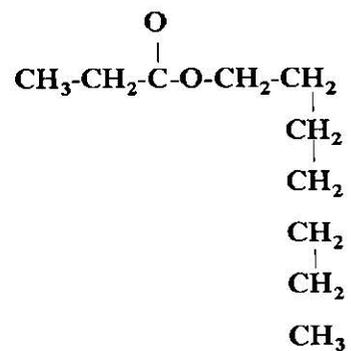
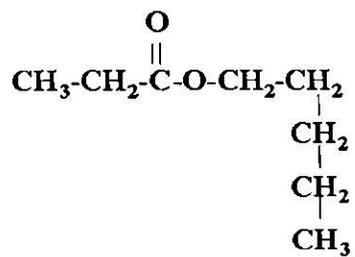
## 8.- CONCLUSIONES

- Los extractos de *Q. amara*, *G. canescens* y *G. ulmifolia* presentaron actividad contra los microorganismos estudiados en diferentes proporciones.
- El extracto hexánico de *Q. amara* presentó mayor actividad sobre *S. typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus*, *E. aerogenes* y *K. pneumoniae*.
- El extracto hexánico de *G. canescens* presentó efecto inhibitorio sobre *C. freundii* y *B. cereus*.
- El extracto hexánico de *G. ulmifolia* presentó actividad antimicrobiana sobre *B. cereus*, *E. aerógenes* y *K. pneumoniae*.
- Solo el extracto hexánico de *G. canescens* presentó inhibición contra *B. cereus* por el método bioautográfico, en las bandas con Rf de 0.55, 0.65 y 0.68.
- Las pruebas químicas realizadas a los extractos hexánicos de las plantas mostraron la presencia de alcaloides, sesquiterpenlactonas, carbohidratos, terpenos y otros grupos funcionales más.
- Las pruebas químicas realizadas a las fracciones de *G. canescens* con actividad antimicrobiana dieron positivas a alcaloides, cumarinas, terpenos y saponinas.
- Se obtuvieron dos compuestos por cromatografía de gases acoplado a espectrómetro de masas, los cuales son ésteres con peso molecular de 143 y 173.

## Conclusiones

---

➤ Se proponen las siguientes estructuras:



## **9.- PERSPECTIVAS**

Determinar la estructura de los compuestos presentes en *G. canescens*, mediante métodos espectroscópicos (resonancia magnética nuclear, infrarrojo y ultravioleta) y evaluar su toxicidad. Con el fin de observar que tan factible sería utilizarlo en el ser humano y después llevar a cabo su síntesis en laboratorios.

## 10.- BIBLIOGRAFÍA

1. Ajaiyeoba, Abalogu, Krebs, Oduola. 1999. *In vivo* antimalarial activities of *Quassia amara* and *Quassia undulata* plant extracts in mice. J Ethnopharmacol, Nov 30; 67(3) pp:321-5.
2. Akira O. 1998. Cytotoxic Quassinoids from *Simaba cedron*. J. Nat. Prod. Vol 61, pp:776-780.
3. Alarcón-Aguilara, Ramos, Pérez-Gutiérrez, Contreras, Weber. 1998. Study of the anti-hyperglycemic effect of plants used as antidiabetics. J. Ethnopharmacol. Jun;61(2)pp:101-110.
4. Apers, Cimanga, Longanga, Foriers, Berghe, Vlietinck. 1999. Antiviral activity of Quassinoids from *Quassia africana* Baill. 6<sup>to</sup> International Congress of Ethnopharmacology of the International Society for Ethnopharmacology(ISE).P2A/104.
5. Arellano MC, Carranco JM, Hernández-Partida. 1993. Chemical composition of 6 unconventional plants from Oaxaca State, Mexico, as potential resources for animal feed. Arch Latinoam Nutr. Sep;43 (3) pp: 264-268.
6. Aritomi M, Kawasaki T. 1974. Dehydro-para-asebotin, a new chalcone glucoside in the flowers of *Gnaphalium affine* D. Don. Chem Pharm Bull (Tokyo). Aug;22(8) pp: 1800-1805.
7. Badilla, Miranda, Mora, Vargas. Actividad gastrointestinal del extracto acuoso bruto de *Quassia amara* (Simarubaceae). Instituto de Investigaciones Farmacéuticas (INIFAR), San José, Costa Rica.
8. Barbetti, Grandolini, Fardella, Chiappini, Mastalia. 1990. New Canthin-6-one Alkaloids from *Quasia amara*. Planta Medica. Vol 56 pp:216-217.
9. Brock. 1991. Microbiología, 6ta. Edición, Ed Prentice Hall, México. pp: 437, 820-850.
10. Buschmann, Spring. 1997. Sesquiterpene Lactones of Three *Heliomeris* Species (Heliantheae; Asteraceae). Vol.46, No.5, pp: 969-972.

11. Caballero-George, Vanderney, Solis, Shahat, Gupta. 2001. Biological screening of selected medicinal Panamanian plants by radioligand-binding techniques. *Phytomedicine*. Jan;8(1) pp:59-70.
12. Cabral A., 1993. A new antimarial Quassinoid from *Simaba guianensis*. Vol 56, No.11, pp:1954-1961.
13. Cáceres, Álvarez, Ovando, Samayoa. 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *J Ethnopharmacol*. Feb;31(2) pp:193-208.
14. Cáceres, Cano, Samayoa, Aguilar. 1990. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *J Ethnopharmacol*. Aug;30(1) pp:55-73.
15. Cannell. *Methods in Biotechnology, Vol. 4: Natural Products Isolation*. Ed. Humana Press, Totowa, NJ. pp: 209-241.
16. Cano y Cano, G.; J.S. Marroquín. 1994. *Taxonomía de Plantas Superiores*, 1era. Edición Ed. Trillas, México, pp : 201-203, 270-271, 305-307.
17. Carr, King, Powell, Robinson. 1999. Chromosome numbers in Compositae. XVIII. *Am J Bot*. Jul;86(7) pp:1003.
18. Casinovi, Ceccherelli, Grandolini. 1966. A new amarid 18-oxyquaxine, isolated from *Quassia amara*. *Ann Ist Super Sanita*;2(2) pp:414-416.
19. Charles, Carter, Winston. 1993. Quassinoids from *Quassia Multiflora*: Structural Assignments by 2D NMR Spectroscopy. *Journal of Natural Products*. January, Vol 56. No. 1, pp: 130-133.
20. Cuadra P, Fajardo V, Muñoz O, Arrieta A, Urzua A. 1994. Determination of the effect of 8-O-(2-methyl-2-butenoyl)-5,7-dihydroxy-3-methoxyflavone from *Gnaphalium robustum* on growth of *Escherichia coli* K-12 by optical density and electrical conductance measurements. *Planta Med*. Dec; 60 (6) pp: 598-9.
21. Cuadra, Harboret, Waterman. 1997. Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation. *Phytochemistry*, Vol. 45. No. 7, pp: 1377-1383.
22. Domínguez X. A. 1973, *Métodos de Investigación Fitoquímica*, 1era. edición, Ed. Limusa, México, pp:15,84 - 97, 141, 175-195.

23. Domínguez, X.A. , 1982, Química Orgánica Experimental, Ed. Limusa, México pp:79-106.
24. Evans DA, Kaleysa RR.1992. Effect of quassin on the metabolism of catecholamines in different life cycle stages of *Culex quinquefasciatus*. Indian J Biochem Biophys. Aug;29 (4) pp: 360-3.
25. Evans DA, Raj RK. 1991.Larvicidal efficacy of Quassin against *Culex quinquefasciatus*. Indian J Med Res. Sep;93 pp:324-327.
26. Fernando, Gadek , Crayn, Quinn. 1993. Rosid affinities of Surianaceae: molecular evidence. Mol Phylogenet Evol. Dec;2(4) pp:344-350.
27. García, González, Pazos. 1997, Pharmacologic activity of the aqueous wood extract from *Quassia amara* (Simarubaceae) on albino rats and mice. Rev Biol Trop. Mar; pp:44 -50.
28. García, Verde, Heredia. 2001. Traditional uses and scientific Knowledge of medicinal plants from México and Central America. J of herbs, spices & medicinal plants; Vol 8(2/3) pp:33,66,77.
29. Gilbert, Teixeira, Carvalho, De Paula, Ferreira, Almeida, Machado, Cascon. 1999. Activities of the Pharmaceutical, insecticidal and insect repellent plants. An Acad Bras Cienc.; 71(2) pp:265-71.
30. González Ferrara.1998.Plantas medicinales del noroeste de México. 1er. edición, México.pp: 5-8, 51.
31. Hamburger, M.O. 1987. Adirect Broautographic TCL assay compounds possessing antibacterial activity, J. of Natural Products, Vol 50. pp:19-22.
32. Hansel R, Ohlendorf D.1969. On B-ring unsubstituted flavone from *Gnaphalium obtusifolium*. Tetrahedron Lett. 1969 Feb;6. pp:431-2.
33. Hor M, Rimpler H, Heinrich M.1995.Inhibition of intestinal chloride secretion by proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia*. Planta Med. Jun;61(3) pp:208-212.
34. Huajuca G. E., 1996. Contribución al Estudio Fitoquímico y la Determinación de la Acción Antimicrobiana de *Senecio candidissimus*k. Tesis F.C.B., U.A.N.L. pp: 1-126.

35. Hudson, Graham, Lam, Towers. 1991. Ultraviolet-Dependent Biological Activities of Selected Polyines of the Asteraceae. *Planta Medica*, Vol 57, pp: 69-73.
36. Kengo K, Narihiko F, Tomoni H, Okano M. 1996. Two new Quassinoids, Ailantinols A and B, and related compounds from *Ailanthus altissima*. *J. Nat. Prod.* Vol. 56, pp: 683-686.
37. Kubo I, Yokokawa Y, Kinst-Hori I. 1995. Tyrosinase inhibitors from Bolivian medicinal plants. *J Nat Prod.* May;58(5):739-43.
38. Kuklinski C. 2000. *Farmacognosia*. Ed. Omega, Barcelona, España. pp: 2-5, 42-47, 51-53, 147-151, 167-183.
39. Kupchan SM, Streelman DR. 1976. Quassamarin, a new antileukemic quassinoid from *Quassia amara*. *J Org Chem.* Oct 15;41(21) pp:3481-2.
40. Linares, Flores, Bye. 1988. *Selección de plantas medicinales de México*. 1era. edición, Ed. Limusa, México. pp:48-49.
41. Luna Álvaro. 1987. *Enciclopedia Medica Naturista*, Tomo 1. Editores Mexicanos Unidos, pp:145-146.
42. Macedo, Consoli, Grandi, Mendes, Queiroz, Zani. 1997. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Jul-Aug;92(4) pp:565-70.
43. Martínez Maximino. 1979. *Catalogo de Nombres Vulgares y Científicos de Planta Mexicanas*. Fondo de la Cultura Económica, México. D.F. pp:239, 373-374, 387.
44. Martínez M. 1989. *Las plantas medicinales de México*, 6ta. edición, Ed. Botas. pp:92-93, 157-158.
45. Mondal AK, Parui S, Mandal S. 1998. Analysis of the free amino acid content in pollen of nine Asteraceae species of known allergenic activity. *Ann Agric Environ Med*;5(1) pp:17-20.
46. Mongelli, Desmarchelier, Coussio, Ciccía. 1995. Antimicrobial activity and interaction with DNA of medicinal plants from the Peruvian Amazon region. *Rev Argent Microbiol.* Oct-Dec; 27 (4) pp: 199-203.

47. Morimoto M, Kumeda S, Komai K. 2000. Insect antifeedant flavonoids from *Gnaphalium affine* D. Don. J Agric Food Chem. May; 48(5) pp:1888-1891.
48. Njar, Alao, Okogun, Raji, Bolarinwa, Nduka. 1995. Antifertility activity of *Quassia amara*: quassin inhibits the steroidogenesis in rat Leydig cells in vitro. Planta Med. Apr; 61(2) pp:180-200.
49. Ohlendorf D, Schwarz R, Hansel R. 1971. 3,5,7-trihydroxy-6,8-dimethoxyflavone from *Gnaphalium obtusifolium*. Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges. Mar; 304(3) pp:213-215.
50. Pahlow M. 1979, El Gran Libro de las Plantas Medicinales, 1era. Edición, Ed. Everest, México, pp:198-200.
51. Pietta. 2000. Flavonoids as antioxidants. J. Nat. Prod. Vol. 63, pp: 1035-1042.
52. Raji Y, Bolarinwa AF. 1997. Antifertility activity of *Quassia amara* in male rats - *in vivo* study. Life Sci. ; 61(11) pp:1067-74.
53. Rivas-Morales, C. 1998. Diseño de un Medio de Cultivo para la Producción de Biomasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 a Escala Piloto para la Obtención de Proteasas Caseínolíticas. Tesis Doctorado Especialidad Microbiología Médica, Facultad de Medicina UANL. Monterrey, Nuevo León, México
54. Rojas, Levaro, Tortoriello, Navarro. 2001. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. J Ethnopharmacol. Jan; 74 (1) pp : 97-101.
55. Sagastegui, A. & M.O. Dillon. 1995. VI Congreso Nacional de Botánica, Abst. pp: 149-150.
56. Sánchez. S. 1980. La flora del valle de México, 6ta. Edición, Ed. Herrera México, pp:465-466.
57. Selecciones Readers Digest. 1987. 1era. edición, Ed. Monte Albán, México, pp:59, 200-201.
58. Silva Belmares Sonia. 1999. Análisis Fitoquímico y Efecto Antimicrobiano de dos especies de plantas tóxicas: *Schinus molle* y *Neri oleander* . Tesis F.C.B., U.A.N.L.. pp: 1-29.
59. Silverstein, Bassler, Morrill. 1991. Spectrometric Identification of organic compounds. 5ta. edición, Ed. Wiley, Singapore. pp: 3-44.

60. Taddei-Bringas, Santillana-Macedo, Romero-Cancio, Romero-Tellez. 1999. Acceptance and use of medicinal plants in family medicine. *Salud Publica Mex.* May-Jun;41(3) pp:216-20.
61. Thomson W. 1980. *Las Plantas Medicinales*, 1era. Edición, Ed. Blume, España, pp:109-110. 175.
62. Vander. 1985. *Plantas medicinales* 1era. Edición, Ed Vander , Barcelona, pp: 56-57
63. Villacis R.L. 1978. *Plantas medicinales de México* 1er. Edición, Ed. Época, México, pp:53-54.
64. Villagomez-Ibarra, Sánchez, Espejo, Zuñiga, Estrada, Torres. 2001. Antimicrobial activity of three Mexican *Gnaphalium* species. *Fitoterapia*; Aug; 72(6) pp:692-4.
65. Villamar, Cano Asseleih, Rodarte. 1994. *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana*, 1era. Edición. Editorial INI. pp:548-549, 678-681,717-718.
66. Wren. 1989. *Enciclopedia de medicina herbolaria y preparados botánicos*, 1era. Edición, Ed. Grijalbo. pp: 224-225
67. \_\_\_\_ Los productos de las plantas: Una visión integral. Centro de investigaciones en química aplicada. U.A.C.
68. <http://www.geocites.com/yerba2001/fichas.html>
69. <http://mexicodesconocido.com.mx/hierbas/2038.htm>
70. [http://members.xoom.com/\\_XMCM/fito2000/enfermedad/abscesos.htm](http://members.xoom.com/_XMCM/fito2000/enfermedad/abscesos.htm)
71. [http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/images/qua\\_ama.jpg](http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/images/qua_ama.jpg) Laflor
72. [http://www.mobot.org/MOBOT/research/library/kohler/1761\\_056.jpg](http://www.mobot.org/MOBOT/research/library/kohler/1761_056.jpg)
73. <http://www.ots.ac.cr/rbt/revistas/46-2/badilla.htm>
74. <http://www.ots.ac.cr/rbt/revistas/44-3y45-1/garcia.htm>
75. <http://www.plantasmedicinales.org/etno/may2001/1.htm>

