

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EFECTO
ANTIMICROBIANO DE DOS ESPECIES DE PLANTAS
TOXICAS: *Schinus molle* y *Nerium oleander*.

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

PRESENTA
SONIA YESENIA SILVA BELMARES

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
DICIEMBRE DE 1999

TL

QK99

.M6

\$5

1999

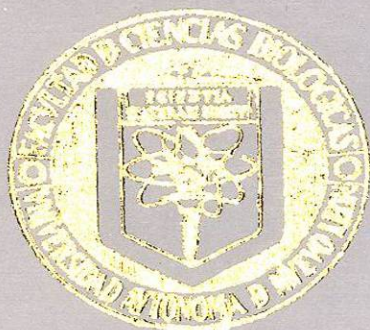
c.1



1080092537

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EFECTO
ANTIMICROBIANO DE DOS ESPECIES DE PLANTAS
TOXICAS: *Schinus molle* y *Nerium oleander*

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

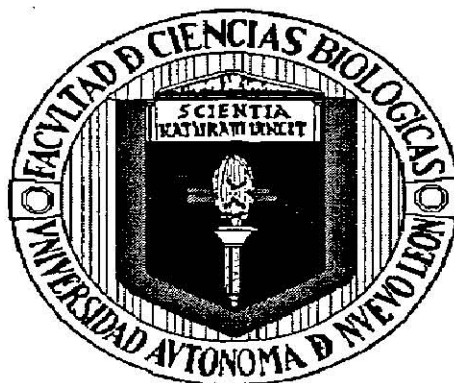
PRESENTA
SONIA YESENIA SILVA BELMARES

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.
DICIEMBRE DE 1999

TL
Q1299
-ME
SS
1999



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



**ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EFECTO ANTIMICROBIANO DE DOS
ESPECIES DE PLANTAS TÓXICAS: *Schinus molle* y *Nerium oleander*.**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO.**

PRESENTA

SONIA YESENIA SILVA BELMARES

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L.

DICIEMBRE DE 1999

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y EFECTO ANTIMICROBIANO DE DOS
ESPECIES DE PLANTAS TÓXICAS: *Schinus molle* y *Nerium oleander*.

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
BACTERIÓLOGO PARASITÓLOGO.

PRESENTA

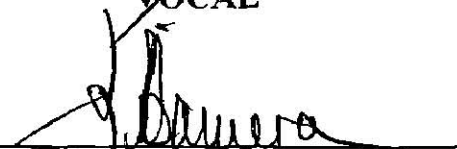
SONIA YESENIA SILVA BELMARES

COMISIÓN DE TESIS


DRA. MARÍA JULIA VERDE STAR
PRESIDENTE


Q.B.P. LYLIÁ GRACIELA MIRANDA VELÁSQUEZ
SECRETARIO


DRA. CATALINA RIVAS MORALES
VOCAL


M.C. FELIX BARRERA CANALES
SUPLENTE

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA N.L.

DICIEMBRE DE 1999

En primer lugar quiero agradecer a Jehová Dios, por que gracias a su amor ha permitido que sea lo que ahora soy; gracias Jesucristo por que me lo ha dado "todo" y a su Espíritu Santo por que sé que al confiar en él tengo una victoria cada mañana; gracias Señor por la culminación de mi carrera, gracias por darme la bendición de ser...

"Por que Jehová da la sabiduría y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia" " El principio de la sabiduría es el temor de Jehová"

Proverbios 2:6; 1:7

DEDICATORIA

A MIS PADRES

Reynalda Belmares y Bernardino Silva:

Gracias por la vida y cariño que me han brindado; por su esfuerzo, constancia; por sus sacrificios y desvelos por lograr alcanzar una de mis metas; pero sobre todo por la confianza que han depositado en mi a lo largo de todos estos años; Dios los bendiga.

A MIS HERMANOS

Ariana y Alejandro:

Por los momentos de alegría que hemos compartido; por su sinceridad y apoyo que me impulsó a seguir adelante; gracias por su sonrisa.

A MIS ABUELOS, TIOS Y PRIMOS

En especial a mi Tía *Francisca Silva, Asif latif, Rodolfo Silva y María Magdalena Mireles.*

Por su gran apoyo durante el transcurso de mi carrera; por el cariño que nos une como familia.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra Ma. Julia Verde Star gracias por todo su apoyo en la realización de esta investigación; por compartir sus conocimientos, tiempo y experiencia, para poder concluir una meta más en mi carrera profesional.

A la Dra. Catalina Rivas Morales gracias por su apoyo en todos los aspectos, por su paciencia para ayudarme a terminar esta investigación pero sobre todo por la amistad, la confianza y los consejos que me ha brindado; gracias por compartir sus conocimientos y impulsarme a seguir adelante en mi vida profesional.

A la Q.B.P. Lyliá Graciela Miranda Velázquez por formar parte de mi comisión de tesis; por el apoyo y la facilidad otorgada para realizar parte del trabajo de investigación en el departamento de bioquímica.

A la Dra. Azucena Oranday Cárdenas, por su experiencia, paciencia y conocimientos; por el tiempo que dedicó para ayudarme resolver los problemas que se presentaron durante la investigación; gracias por sus consejos y su gran apoyo.

A mis compañeros y amigos de generación: *Norma, Mirna, Myriam, Brenda, Betty, Lucía, Karina, Nancy, Erika, Claudia Olguín, Jehú, Eduardo, Victor, Hugo, Rubén*; por compartir los momentos de alegría durante la carrera, por sus ánimos para alentarme a dar un paso siempre adelante.

“A ti que coincidiste en mi camino y me ayudaste a cambiar de rumbo cuando estaba en un sentido equivocado; gracias por darme de tu tiempo; gracias por esa palabra sabia; gracias por la dicha de ser tu amiga”.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Mi más sincero agradecimiento 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) 1999 con apoyo parcial del proyecto No. CT-144-99

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
cm	Centímetro
g	Gramo
h	Hora
µL	Microlitro
m	Metro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
No.	Número
p.f.	Punto de Fusión
ppm	Partes por millón
Rf	Relación de Frentes
sp	Especie
UFC	Unidad formadora de colonias
NMR	Resonancia Magnética Nuclear
pH	Potencial de Hidrógeno
N	Número de Repeticiones
UV	Ultra Violeta

CONTENIDO

	PÁGINA
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
CONTENIDO.....	VII
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
RESUMEN.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 HIPÓTESIS.....	4
1.2 OBJETIVO GENERAL.....	4
1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
1.4 ANTECEDENTES.....	5
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	18
2.1.1 Clasificación botánica de <i>S. molle</i>	18
2.1.2 Descripción botánica.....	18
2.1.3 Distribución geográfica.....	19
2.1.4 Clasificación botánica de <i>N. oleander</i>	19
2.1.5 Descripción botánica.....	20
2.1.6 Distribución geográfica.....	20
2.2 Recolección de las plantas.....	22
2.2.1 Extracción del material vegetal.....	22
2.3 Pruebas de inhibición bacteriana.....	22
2.3.1 Material Biológico.....	23
2.3.2 Preparación de medios enriquecidos.....	23
2.4 Separación e identificación de las fracciones con efecto inhibitorio.....	25
2.4.1 Métodos cromatográficos.....	25
2.4.1.1 Cromatografía en capa delgada.....	25
2.4.1.2 Agentes cromogénicos.....	25
2.4.1.3 Bioautografía.....	26
2.4.2 Métodos químicos de identificación.....	26

2.4.2.1 Pruebas para grupos funcionales.....	26
2.5 Métodos espectroscópicos para la determinación de grupos funcionales.....	29
3: RESULTADOS.....	31
3.1 Actividad antimicrobiana.....	31
3.2 Separación de fracciones por métodos cromatográficos.....	33
3.3 Determinación de la fracción con actividad antimicrobiana por el método de bioautografía.....	35
3.4 Determinación de grupos funcionales por pruebas químicas.....	36
4. DISCUSIÓN.....	39
5. CONCLUSIONES.....	43
6. BIBLIOGRAFÍA.....	44

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>S. molle</i>	31
2. Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>N. oleander</i>	31
3. Inhibición bacteriana de los extractos que presentaron mayor actividad sobre todos los microorganismos estudiados en comparación con el efecto presentado por el cloranfenicol.....	33
4. Cromatografía en capa fina del extracto etéreo de <i>S. molle</i>	34
5. Cromatografía en capa fina del extracto acetónico de <i>S. molle</i>	34
6. Cromatografía en capa fina del extracto etéreo de <i>N. oleander</i>	34
7. Pruebas de inhibición bacteriana por bioautografía.....	36
8. Determinación de los grupos funcionales y metabolitos secundarios de las fracciones activas de <i>S. molle</i>	37
9. Determinación de los grupos funcionales y metabolitos secundarios del extracto en éter de <i>N. oleander</i>	37

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. <i>Schinus molle</i> ; (Anacardiaceae).....	21
2. <i>Nerium oleander</i> ; (Apocynaceae).....	21
3. Obtención de los extractos de <i>S.molle</i> y <i>N. oleander</i>	30
4. Efecto antimicrobiano de los extractos de <i>S. molle</i> ; (Anacardiaceae).....	32
5. Efecto antimicrobiano de los extractos de <i>N. oleander</i> ;(Apocynaceae).....	32
6. Inhibición bacteriana de las fracciones separadas de los extractos de <i>S.molle</i> y <i>N.oleander</i> pbioautografía.....	35
7. Espectro de infrarrojo de la fracción No. 3 del extracto etéreo de <i>S. molle</i>	38

RESUMEN

En la actualidad algunos microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales han adquirido resistencia contra una gran variedad de antibióticos. El objetivo de esta investigación es evaluar la actividad bactericida de dos plantas *Schinus molle* (Anacardiaceae) y *Nerium oleander* (Apocinaceae); aunque se consideran tóxicas antiguamente han sido usadas como medicinales; así como el aislamiento e identificación de sus metabolitos secundarios. Para la realización del estudio se llevó a cabo una recolección de las plantas en la Ciudad de Santa Catarina Nuevo León en Junio de 1998, mismas que se extrajeron con solventes de polaridad creciente (éter de petróleo, hexano, acetona y etanol) una vez obtenido el extracto se disolvió en etanol y se esterilizó por filtración, posteriormente se llevaron a cabo ensayos de actividad antimicrobiana "in vitro" sobre especies de bacterias que causan enfermedades gastrointestinales (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*) utilizando el método de difusión en placa; con una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC/mL sobre la superficie de un medio sólido C. Rivas (Dextrosa, peptona de colágeno, extracto de levadura). Los extractos obtenidos de *S. molle* y *N. oleander* presentaron mayor actividad sobre *E. aerogenes*. El extracto en acetona de *S. molle* presentó actividad moderada sobre *S. typhi* y *S. flexneri*; y el extracto en éter de petróleo de *N. oleander* mostró un efecto débil o moderado sobre todos los microorganismos en estudio. Por medio de bioautografías se determinaron 3 fracciones con actividad biológica en los extractos en éter y acetona de *S. molle* las cuales presentaron reacciones positivas para insaturaciones. Por otra parte vimos que la fracción 3 del extracto etéreo presentaba reacciones positivas para flavonoides, lo cual se corroboró con el espectro de infrarrojo. El extracto en éter de *N. oleander* solo presentó reacciones positivas para insaturaciones, en este extracto se separaron 5 fracciones pero ninguna presentó actividad antimicrobiana.

1. INTRODUCCIÓN.

Desde tiempo inmemorial el hombre ha recurrido a las plantas en busca de curación para sus enfermedades y alivio a sus malestares. Esa búsqueda lo ha hecho profundizar en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen. (15, 22, 29)

Las enfermedades gastrointestinales son muy frecuentes en la población del mundo, la mayoría de ellas son producidas por bacterias, virus o sustancias químicas. (8) Existe un gran número de plantas de uso terapéutico para este tipo de enfermedades, pero para evaluar su eficiencia y garantizar su inocuidad se necesitan programas de conservación, identificación, preparación de extractos, pruebas microbiológicas y bioensayos (22).

La importancia en el estudio de las plantas medicinales es realizar análisis químicos y determinar su actividad biológica para de esta manera contribuir con validez científica al uso de las mismas como tratamiento. (14, 22) La búsqueda de nuevos antimicrobianos se ha realizado en una diversidad de plantas, en todo el mundo y de ellas se han aislado una gran cantidad de compuestos activos por lo cual tratando de encontrar nuevas fuentes de metabolitos secundarios se seleccionaron *Schinus molle* y *Nerium oleander*, ya que son especies que se

encuentran ampliamente distribuidas como plantas ornamentales en el estado de Nuevo León. (6)

La investigación fitoquímica cubre un amplio campo de trabajo cuyos objetivos principales son: aislar principios activos, identificarlos, determinar su estructura y encontrar sus posibles aplicaciones. (5)

La finalidad del análisis fitoquímico, es el estudio de la composición química de todas las sustancias que existen en un vegetal, debido a que aun contando con las técnicas más modernas, no sería posible llegar a la identificación y al conteo de todos los constituyentes de una planta, se aíslan metabolitos secundarios como subproductos del metabolismo de los vegetales (22, 36, 52). La actividad biológica que presenta una planta, no siempre se debe a un principio activo en particular, si no a la acción sinérgica de todos los compuestos, aún cuando por si solos no presenten efectos terapéuticos. (28, 39)

La clasificación taxonómica presenta valiosa ayuda en el análisis fitoquímico, orientando al investigador acerca de las posibles sustancias existentes en determinada especie. (5) *Schinus molle* (también llamado pirul, árbol de Perú, árbol de pimienta, anacahuita, aguaribay, molle, pimientero, árbol llorón), pertenece a la familia Anacardiaceae perteneciente al orden Sapindales, contiene alrededor de 60 géneros y 400 especies (5), el género *Schinus* que son árboles y arbustos perennifolios, se utilizan en jardinería debido básicamente a la característica de sus hojas y por la sombra que aportan. Presenta numerosas ramas delgadas y colgantes. (6, 32, 41)

Nerium oleander. Pertenece a la familia de las Apocinaceas; es un género de arbustos perennifolios que se utilizan en jardinería por la calidad de sus flores. Tiene hojas parecidas a las del laurel. Las sustancias tóxicas que contiene, de efectos similares a la digitalina sobre el músculo cardíaco, se encuentran distribuidas en toda la planta. (6, 30, 51)

1.1 HIPÓTESIS.

Los metabolismos secundarios de *Schinus molle* y *Nerium oleander* presentan actividad contra microorganismos causantes de enfermedades gastrointestinales.

1.2 OBJETIVO GENERAL

Aislamiento, identificación y actividad biológica de los metabolitos secundarios de *S. molle* y *N. oleander*.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de *S. molle* y *N. oleander*
2. Separar las fracciones y evaluar su actividad antimicrobiana contra bacterias que provocan enfermedades gastrointestinales.
3. Identificar los grupos funcionales de las fracciones que presenten actividad biológica.

1.4 ANTECEDENTES.

La botánica desde la antigüedad ha estado íntimamente relacionada con el interés del hombre por la utilización de materiales vegetales como tratamiento de las enfermedades humanas. Las crónicas de los egipcios, los griegos y los romanos precristianos, mencionan especies vegetales que se utilizaban comúnmente como agentes medicinales; se dice que la ciencia botánica moderna empezó durante los siglos XV y XVII con los estudios y escritos de los herbolarios, quienes se dedicaron a la descripción e ilustración de miles de especies vegetales. Aunque el interés de las plantas era principalmente médico, los herbolarios eran observadores cuidadosos y en la actualidad, es todavía válida una gran proporción de las conclusiones botánicas derivadas de sus estudios. En la actualidad la química moderna ha producido una vasta colección de drogas sintéticas, que han reemplazado a muchas de las antiguas y bien establecidas drogas vegetales, pero otras, son sustancias todavía importantes en materia médica. (19, 48)

Mitcher, Allergrini y Pelecuer, en 1971, 1973, y 1976 respectivamente, encontraron un gran número de especies de plantas que presentan efectos contra el crecimiento de diversas especies de bacterias. En ese tiempo se empezaron a buscar métodos para la estandarización de la extracción de los compuestos antimicrobianos que pudieran tener las plantas. Por otra parte March en 1991 observó que el número de plantas encontrado con efectos inhibitorios sobre microorganismos crecía enormemente, durante ese año se encontró que diversas fracciones extraídas de las plantas presentaban diferentes efectos dependiendo del tipo de solvente y tipo de separación usada. (1, 31, 35, 38)

Baron 1991 menciona que los padecimientos digestivos son muy frecuentes por la ingestión de alimentos contaminados con diferentes microorganismos y que *Salmonella typhi* juega un papel muy importante en este tipo de infecciones ya que produce fiebre tifoidea; por lo cual se decidió incluirlo en el estudio entre otros de los microorganismos involucrados en este tipo de padecimientos.(2)

El *S. molle* (pirul) debió ser introducido a México durante los primeros años de la colonia por Francisco Hernández, botánico español que realizó aquí sus investigaciones entre 1570 y 1577; Molle es el nombre quechua del pirul, que Linneo conservó al designar científicamente la especie, con el que también lo conocieron los antiguos mexicanos. (42)

Todas las partes del árbol *S. molle* verdaderamente han sido usadas medicinalmente en los trópicos, incluyendo sus hojas, corteza, frutos, semillas, resina y oleoresina o bálsamo. Todas las partes de este árbol tiene gran contenido de aceite y aceites esenciales los cuales tienen una esencia aromática picante. Las hojas liberan el aceite al ser calentadas en agua. Esta planta tiene una gran historia de usos en el sur y centro de América y está reportado como analgésico, antibacterial, antidepresivo, antimicrobial, antifúngico, antiviral, antiespasmódico, astringente, balsámico, citotóxico, diurético, expectorante, hipotensivo, purgante, estomático, tónico. uterino, estimulante. (27, 45)

En la actualidad la gomorresina que exuda el tronco se emplea como purgante; aunque es un purgante drástico peligroso, la infusión de los frutos sin epicarpio y hojas, para tratar afecciones genitourinarias y venéreas como blenorragia (7, 32, 33). El pirul

tiene más amplias aplicaciones ya que se recomienda para padecimientos digestivos como cólicos, bilis, dolor de estómago y estreñimiento, también es útil para dolor de muelas, dientes con caries y cicatrización de heridas, en los que se aplica resina; además también la infusión de hojas se usa para evitar el dolor de encías y afirmar la dentadura. (33) Se utiliza también para las molestias del reumatismo, usando las ramas maceradas como papilla o hervidas para su aplicación local o remojadas en alcohol para frotar la parte afectada. Cuando se presentan afecciones como tos, gripa, asma y tuberculosis, se toma la infusión, la resina purga suavemente el agua y flema de los hidrópicos. En enfermedades como la gonorrea, así como en los casos de ojos irritados, conjuntivitis y cataratas, son usadas las hojas en cocimiento o el machacado de estas para lavados. La emulsión de la gomorresina se usa para las manchas de la córnea (32, 33). Por el tanino y el aceite esencial que contienen los frutos y las hojas se emplean como astringentes y antisépticos de vías genitourinarias y para curar heridas de la piel y boca. (42)

Dominguez X. A. en 1970 trabajó con los exudados gomosos del fruto del pirul que fue colectado en Monterrey N. L. La extracción de los compuestos fue realizada en éter de petróleo, éter etílico y etanol. A estas extracciones se les realizó cromatografía en sílica gel. En el extracto con éter de petróleo se determinó ácido lignocérico $C_{24}H_{48}O_2$ y $C_{29}H_{46}O_2$, se detectó también β - sitosterol eluído con benceno- $CHCl_3$ y quercetrina eluída con EtOH. (11)

El fruto puede contener un 5% de aceites esenciales y las hojas un 2% de los mismos. En pruebas de laboratorio se ha encontrado que el aceite esencial como el

extracto de las hojas muestran una muy fuerte acción antifúngica contra numerosos hongos al igual que en *Candida* in vitro, también se ha demostrado que el extracto de las hoja tiene actividad antibacteriana y antiviral contra algunos virus de plantas y han mostrado tener toxicidad contra células cancerosas. Varios grupos de investigaciones han conducido estudios de animales, y se ha encontrado que los extractos de fruto y de las hojas producen una actividad hipotensiva en perros y ratas, también una actividad estimulante. (4, 45)

Gundidza M en 1993, probó el aceite esencial de las hojas frescas aisladas de *S. molle* por hidrólisis para determinar la actividad antibacteriana usando el método de difusión y actividad antifúngica usando el micelio o el crecimiento de una sola célula para el método de inhibición. Los resultados obtenidos muestran que el aceite volátil exhibe actividad significativa contra los siguientes especies de bacterias: *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Leuconostoc cremoris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter calcoacetica*, *Escherichia coli*, *Benecka nitrigens*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcesens*, *Bacillus subtilis* y *Brochotrix thermosphacata* y con las especies fúngicas *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*, *Fusarium colmorum* y *Alternaria alternata*. (20)

Sanchez García en 1995, encontró que los extractos alcohólicos y acuosos de 33 plantas incluyendo *S. molle* (pirul) inhibían con diferente intensidad el crecimiento de algunas bacterias que causan enfermedades gastrointestinales como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*

thyphimurium, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, *Clostridium perfringens*, *Proteus vulgaris*.(48)

Dikshit A, Naqvi A y Husain A en 1986, encontraron que el aceite esencial de *S. molle* exhibe una actividad fungistática máxima durante la cobertura de aceite esencial, contra algunos hongos comunes de almacén o patógenos de animales. Las concentraciones efectivas de aceite variaron de 200 a 900 ppm. La toxicidad del aceite persistió arriba de los 80° C y 90 días en almacén pero declinó cuando se esterilizó en autoclave; este resiste en gran escala la densidad del inóculo. El aceite exhibe un rango limitado de actividad, se encontró más actividad que el multifungin (una droga antifúngica). El aceite fue caracterizado por varias propiedades fisicoquímicas. Se encontró que contenía 50 constituyentes; al parecer ocurren algunos cambios en los constituyentes durante el almacenaje que afectan la potencia fungitóxica. (10)

Entre las sustancias aisladas en plantas de la familia Anacardiaceae, se encuentran:

El ácido anagigántico (I) de p.f. 81°C, encontrado en el *Anacardium giganteum*.(34)

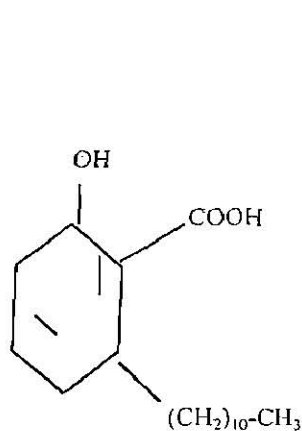
El ácido mangiferólico (II) de p.f. 181- 183 °C, encontrado en la especie *Mangifera indica*. (9)

El ácido o-metil – 4 gálico (III) de p.f. 240 –242 °C, encontrado en la especie *Pouprtia axilaris*. (34)

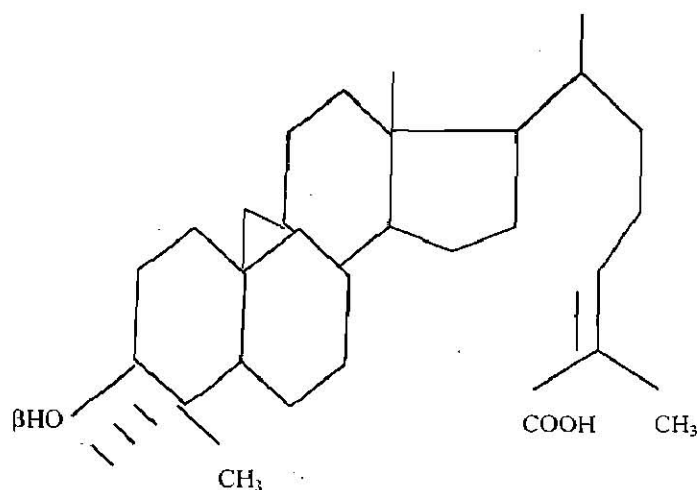
2 triterpenos: el Schinol (IV) y la Terebintona (V). Aislados del género *Schinus*, la especie *S. terebinthefolius*, perteneciente a la familia Anacardiaceae. (34,24)

El ácido lignocérico (VI) y un triterpeno (VII) : el Δ 12-3, 17 Lupanendiol o piruldiol, se aislaron del género *Schinus*, especie *S. molle* y de su aceite esencial se aislaron: β -felandreno (VIII), α -pineno (IX), carvacrol (X) y limoneno (XI) (7)

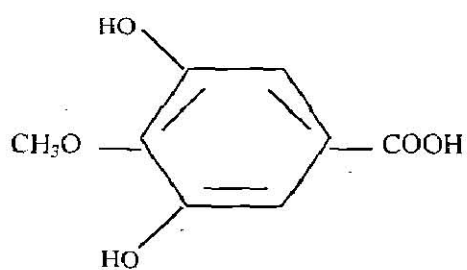
FORMULAS QUÍMICAS DE SUSTANCIAS AISLADAS DE *S. molle*



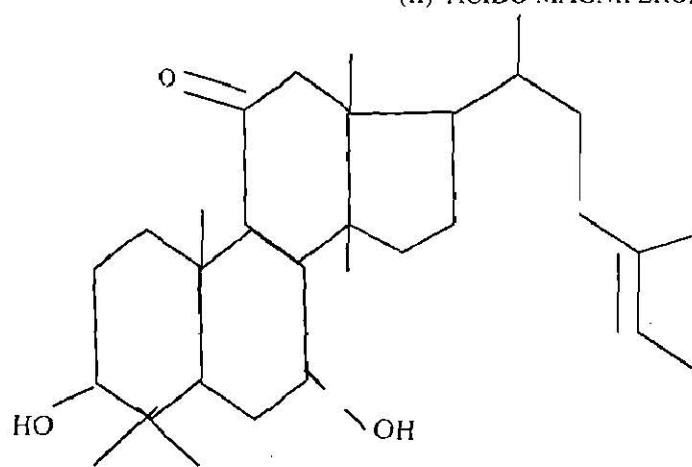
(I) ACIDO ANAGIGÁNTICO



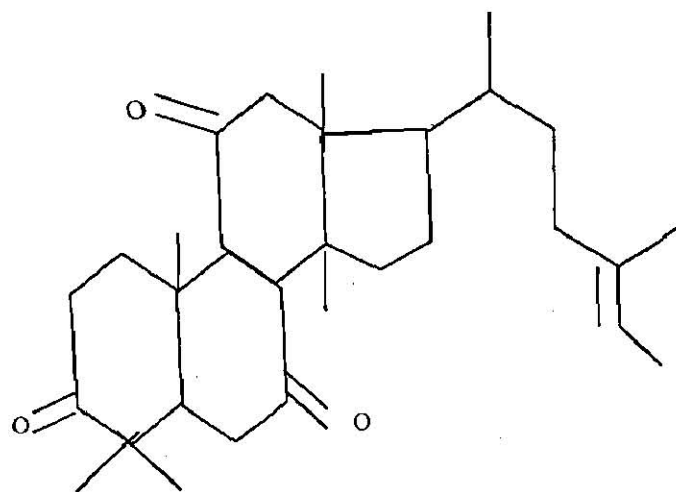
(II) ACIDO MAGNIFEROLICO



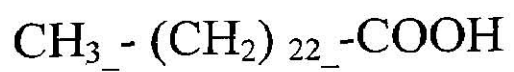
(III) ACIDO O-METILGALICO



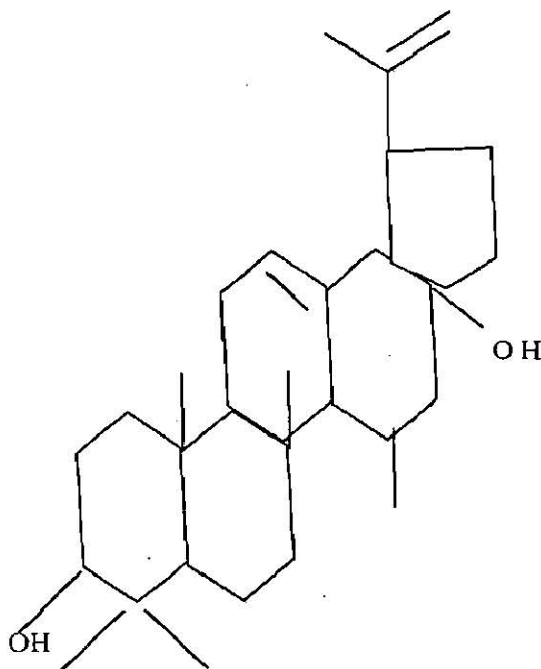
(IV) SCHINOL



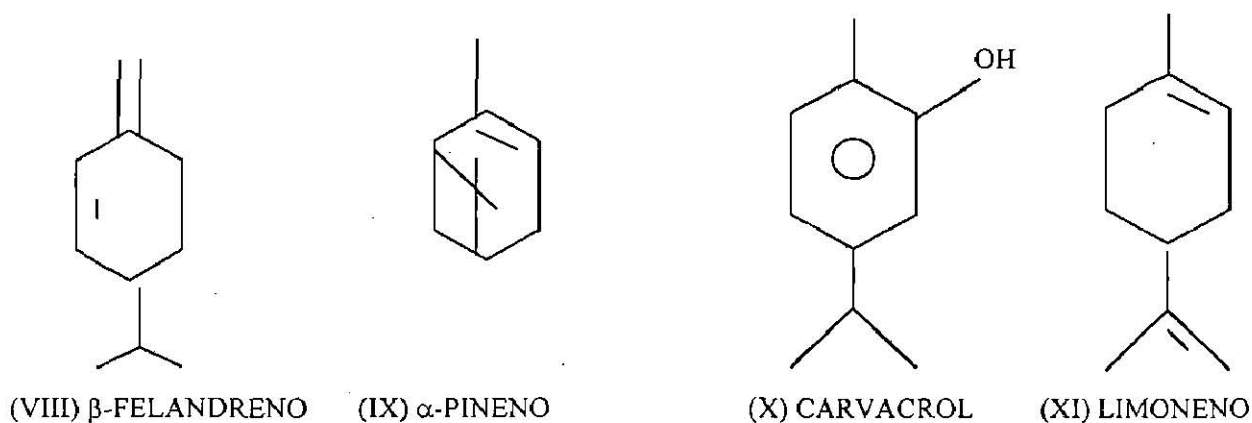
(V) TEREBINTONA



(VI) ACIDO LIGNOCERICO



(VII) TRITERPENO



De *S. molle* se han aislado una gran cantidad de sustancias químicas entre las cuales se encuentran α -amirina, ácido behénico, α -bergamont-trans eno, bourboneno, δ -cadineno, α -cadinol, δ -cadinol, t-cadinola-calacoreno, γ -calacoreno, iso-calamenediol, calameneno, calcio, campheno, car-3-eno, carvacrol, β -carifileno, ácido cerótico, α -copaeno, croweacin, α -cubebeno, para-cimeno, β -elemeno, elemol, ácido β -elemónico, α -eudesmol, β -eudesmol, γ -eudesmol, fisetina, ácido gálico, geraniol, butirato, germacreno d, β -guaieno, α -gurjuneno, ácido heptacosanoico, α -humileno, ácido lignocérico, limoneno, ácido linoleico, ácido dihidro-malvalico, ácido isomasticadienónico, ácido 3-epi-iso-masticadienónico, ácido masticadienónico, menth-cis 2-en-1-ol, a-muuroleno, γ -muuroleno, t-muurolol, mirceno, hexanoato de nerol, ácido octacosanoico, metil éster del ácido octanoico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido pentacosanoico, pentan 1-ol, 3-metil, peroxidasa, α -felandreno, β -felandreno, orto-etilfenol, pineno, α -pineno, β -pineno, piperina, trans-piperitol, ácido protocatécico,

quercitrina, iso-quercitrina, rafinosa, rutina, sabineno, β -sitosterol, β -spatuleno, tanino, α -terpineno, γ -terpineno, α -terpineol, terpinoleno, ácido tricosanoico, cianidina-3-o- α -1-galactósido, peonidina-3-o- β -d-glucósido.

Las hojas y los frutos contienen un glucósido no identificado; el látex de las hojas es usado en el tratamiento de amenorrea y dismenorrea. (18). La gomorresina ha sido estudiada y se ha encontrado que tiene un aceite esencial y una peroxidasa, la ceniza de la peroxidasa contiene fierro, calcio, y manganeso; el aceite esencial: felandreno, carvacrol y pineno (bactericida). (7)

El *S. molle* y el *S. terebinthifolius* son inhibidores de algunos virus y se han usado para preservar algunos productos alimenticios; en 1963 se hizo un estudio de varias plantas que inhiben virus en el que se incluyen estas 2 especies y se mencionan datos sobre los tipos de virus que inhiben (7). El *S. molle* se ha usado como pesticida (23); formando algunos compuestos clorados. Uno de los estudios más completos de *S. molle* han sido hechos por M. González en Argentina en 1931 y en 1946 (7,18); pero en ninguno se habla sobre estructuras químicas. En 1951 en Italia fueron estudiados los aceites esenciales por G. Ottolino (7), informando únicamente los rendimientos de ellos en diferentes épocas del año. Por otra parte existen estudios estructurales de *S. terebinthifolius* (7, 24) realizados en 1963 por Kaistha y Kier; donde se aislaron 2 triterpenos: el Schinol (32) y la Terebintona (37).

Carmona García F.J en 1970, aisló un compuesto SM-1 al cual le realizó una CCD que mostró una sola mancha al revelar con ácido sulfúrico y un Rf de 0.65 al ser

eluido con benceno-cloroformo (1:9 v/v); y se clasificó en sustancias ácidas.(7) Mientras que Bilbao Rodríguez M.R en 1971, encontró en un extracto etéreo de *S. molle* ácido lignocérico de fórmula $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{22}\text{-COOH}$, una hidroxiketona insaturada no conjugada extraída con metanol, un compuesto de p.f 135-136 ° C de núcleo esteroidal extraído con benceno que posee grupo oxhidrilo. En el extracto clorofórmico encontró, un compuesto de núcleo triterpénico de p.f 205- 220 ° C, con grupo oxhidrilo y grupo cetónico, PM 472 y un sólido blanco de p.f. 298-305 ° C, polinucleado que posee un grupo carbonilo de función aldchído. En el extracto acuoso identificó dextrosa.(5)

En lo que se refiere a *Nerium oleander*; esta planta pertenece a la familia Apocynaceae y también es conocido como adelfa, laurel rosa, aloendro, balandre, loedro, mataburros, nerio, oleandro. Se conocen 200 géneros, 2000 especies de la familia Apocynaceae. Se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales, con algunas pocas especies en regiones templadas. Los géneros más numerosos: *Tabernaemontana* (140), *Mandevilla* (115), *Rauwolfia* (100), fuente de drogas tranquilizantes. *Parsonia* (100) y *Aspidosperma* (80).

Esta planta es sumamente utilizada como medicina tradicional por los árabes, la adelfa fue introducida a Europa como planta ornamental en el siglo XIX. La rosa laurel o adelfa es una de las especies ornamentales que más intoxicaciones ha causado. Desde hace muchos siglos se ha conocido la toxicidad de los extractos de sus hojas y flores, la cual se debe a los glucósidos cardiotónicos que contienen. (55) Se tienen testimonios de la implicación de esta planta en hechos históricos, así que impidieron ganar batallas a Alejandro Magno pues sus bestias de carga se envenenaron con adelfa, y que las tropas

francesas no pudieron acudir a tiempo para ayudar a sus fuerzas de Bailén y Rumberos debido a que se encontraban enfermas por ingestión de las aves asadas en espetones de adelfa. (42, 51)

Las raíces de esta planta son usadas en enfermedades de la piel y en afecciones inflamatorias en la India, se han aislado glicósidos de raíz y corteza de *N. odorum* y de semillas de *N. oleander*. Tatsuo Yamauchi; en 1971 encontró 2 acetofenonas en las raíces de *Nerium odorum* 2,4- dihidroxiacetofenona y 4-hidroxiacetofenona, las acetofenonas fueron obtenidas de los extractos en éter de la corteza de la raíz y del centro de la misma en cromatografía en columna con silica gel utilizando benceno acetona como eluente. (50)

Desde la antigüedad se empleaba la adelfa para preparar vinos contraveneno para mordeduras de serpiente o animales venenosos, un veneno expulsaba al otro pero resultaba mortal para el que carecía de algún veneno en su cuerpo. A causa de la gran toxicidad de la planta entera se desaconsejan los preparados domésticos. (16, 51) Las hojas del laurel rosa han sido la parte más estudiada por los químicos, así en 1918 Stroub, encontró que los extractos alcohólicos eran 2.5 veces más activos que los de las *Digitalis sp* logrando aislar y cristalizar un glicósido cardiotónico más activo que la digitalina al que llamó oleandrina. (55)

Las flores contienen un perfume casi narcotizante y presentan sustancias tóxicas de efectos similares a los de la digitalina sobre músculo cardíaco que se encuentran distribuidas en toda la planta; los principios activos incluyen glucósidos cardiacos

similares a los de esta sustancia, en Europa son usados como sustitutos de la misma. En cierta medida esto se debe a la disponibilidad de la planta. (51)

Otros glicósidos cardiacos que contiene son oleandrigenina que es obtenida por la hidrólisis con ácido clorhídrico (55) neriina, flavonas, rutina, tanino, resina (51), desoximetil pentosa, oleandrosa, folinerina que es una mezcla de glucósidos (55). Hasta la fecha, además de la oleandrina que es la más abundante, se han aislado otros 3 glucósidos denominados desacetiloleandrina, adinerina (45), y neriantina. Por hidrólisis de estos glucósidos se han obtenido 4 agliconas, oleandrigenina, 16,0- acetilgitoxigenina, gitoxigenina, adinergina, neriantogenina y tres carbohidratos, 1-oleandrosa d-diginosa y la d-glucosa. Villarreal M. C. menciona que Gajanon aisló de la corteza del laurel rosa una pequeña cantidad de aceite esencial, un aceite graso de propiedades parecidas al aceite de oliva, 2 glucósidos amorfos, una cera, taninos, y colorante rojo.(55)

Nerium oleander, es utilizado como ornamental, venenosa para el hombre y el ganado, utilizada en medicina y como insecticida. Las hojas de esta planta sobre todo son muy ricas en principios activos tóxicos de tipo digitalínico, por lo que debe evitarse su contacto y aunque sus flores sean muy atractivas, no deberían utilizarse como planta ornamental. (54) El principio nocivo de esta planta es un glicósido que provoca los siguientes síntomas: arritmia cardíaca, diarrea con sangre, fiebre y muerte. Toda la planta es sumamente venenosa, pero sobre todo las hojas son ricas en glicósido oleandrina, que suele ir acompañado de otros glucósidos secundarios. Las plantas silvestres son más tóxicas que las cultivadas, existen preparados comerciales de algunos de los glucósidos de Adelfa, tal como la folinerina. (38, 42, 51, 57)

Se han aislado dos triterpenoides de *N. oleander* y se determinaron sus estructuras como $3\beta, 27$ -dihidroxi-urs-18-en 13, 28-ólido y $3\beta, 22\alpha, 28$ trihidroxi-25 nor-lup-1, 20 (29)-dien-2-ona. La determinación de las estructuras se basó en métodos espectroscópicos incluyendo RMN unidimensional y bidimensional (3). De la planta fresca de *N. oleander* se aislaron nuevos triterpenoides como Kanerocina junto con ácido ursólico y oleanólico, estas estructuras se determinaron con métodos espectroscópicos y químicos como ácido 3α -hidroxi-urs-18,20-dien-28 oico (46). No se tienen reportes del efecto antimicrobiano de esta planta.

AI SLAM I EN T O DE UN FLA UCC I O N
DE S. NOU E
CON A CT I V I D A D B A C T E R I A L

EN UN TRABAJO ANTERIOR SE RE-
PARTO LA ACTIVIDAD DEL EXTRAHEX
DE S. - - - - - CONTRA S. - - - - -

ESTE FUE SEPARADO EN POR
MEDIO DE CROMATOGRAFICO Ed
Ed

~~6~~ FRACC, LAS CUALES FUERON
EVALUADAS MICROBIOLOGICAMENTE

POR EL METODO DE BIOAUTOGRAFIA
MODIFICADO (la cual muestra ^{señal} positivo en el
CON RF D. ~~93~~ EN UN DEP. PET (BENCLACET 9,9,9,2
MAS ACTIVA ~~CON UN PUNTO A~~
MOSTRO) ACT. SOBRE S. AEROB. Y B. CERUS

~~LA CORRESPONDIENTE A LA F. - - - - -~~
~~CON EL VALOR - - - - -~~

ESTA FRACCION FUE PURIFICADA

POR SUCCESIVAS CROMATOG. ~~6~~

SE LE REALIZO UNA PRUEBA ^{DIF} ~~6~~

PARA ESTE SU EFECTO ~~6~~

LA PUNTA DE SUCROSA ME-
SITO POSITIVA 10 ^{y para}
FLAVONOIDE
COAL SE CONFIRMÓ CON EL
ESPECTRO IR QUE DA BANDA
CONVESA A FLAVONOIDE

18, 44, 227, 228, 272.

276, 361, 362, 363, 392

405, 421, 456, 470, 471

227
272
276
361
421
456
470

ECIE. Sch 314 7 - BIOATOCRO

TABLA 8

DET DE GPOI FUNCION

FRACC ACT 5. MOLLE

~~FRACC 3 + ACT~~

- FRACC 3 + ACT

ESPECTRO

edor de 60

rosas, del

uelo, de

os y me

cm de largo

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

2.1.1 Clasificación botánica de *Schinus molle* (Pirul).

REINO. Plantae

DIVISION. Spermatophyta

SUBCLASE. Monocotyledonea

CLASE. Angiospermae

ORDEN. Sapindales

SUBORDEN. Anacardiinae

FAMILIA. Anacardiaceae

GENERO. *Schinus*

ESPECIE. *Schinus molle*

2.1.2 Descripción botánica.

S. molle de la familia Anacardiaceae perteneciente al orden Sapindales, contiene alrededor de 60 géneros y 400 especies (6), es un árbol de 15 m. de alto, ramas numerosas, delgadas y colgantes como de 3 m. de largo, desarrollándose desde el nivel del suelo; hojas con pecíolos de 2-3 cm de largo arregladas imparipinadamente, largos gruesos y membranosos; hojuelas de 15-40 mm, sésiles, lanceoladas o linerlanceoladas, de 6 cm de largo, cuneadas u obtusas en la base, acumunadas o raramente agudas en el ápice, la punta usualmente curveada, entera o casi entera, ligeramente café arriba ; panículas blanco-amarillas, con tricoma simple; pétalos angostamente ovados; truncados y glabros de 12 mm de largo. (6, 41, 57) (figura 1).

Presenta flores unisexuales muy pequeñas agrupadas en panículas axilares; cáliz de 4-5 piezas, corola de 4-5 pétalos de color amarillo verdoso en las flores masculinas y blanco verdoso en las femeninas; 10 estambres; un estilo trífido. El fruto es una drupa pequeña, carnosa que va secando al madurar y contiene una sola semilla. Florece de marzo a mayo y se multiplica mediante semillas en primavera o bien a través de los esquejes semimaduros obtenidos en verano. (6)(42)

2.1.3 Distribución geográfica.

Nativo de Sudamérica y se ha hecho silvestre en la Meseta Central (3), está naturalizado en nuestro país. Es un árbol procedente del Perú.

Hábitat : matorrales xerófilos, pastizales se cultiva como árbol de sombra en plazas, jardines y orillas de caminos. (42)

2.1.4 Clasificación botánica de *Nerium oleander* (adelfa)

REINO: Plantae

DIVISION: Spermatophyta

SUBCLASE: Monocotyledonea

CLASE: Angiospermae

ORDEN: Contortae

SUBORDEN: Gentianineae

FAMILIA: Apocynaceae

GENERO: *Nerium*

ESPECIE: *Nerium oleander*

2.1.5 Descripción botánica:

Nerium oleander pertenece a un género de arbustos perennifolios que se utiliza en jardinería por la calidad de sus flores. Este arbusto también es llamado adelfa, puede alcanzar más de 6 m. de altura, tiene hojas parecidas a las del laurel e inflorescencias cimosas formadas por flores de 5 pétalos, generalmente de color rosa. La rosa laurel es un arbusto breñoso; desarrollo vertical, con hojas coriáceas de color verde oscuro. Desde primavera a otoño aparecen grupos terminales de flores rosadas, blancas, rojas, albaricoque, o amarillas, generalmente con los pedúnculos de color rojo. (6, 42) (figura2)

Normalmente consta de muchos arbutillos apretados aunque ocasionalmente forma una sola vara rameada en la parte alta, la corteza en las ramas jóvenes es lisa y de color verde pero sus ramas viejas y troncos son grises con rugosidades asemejando lentejillas pequeñas. (55) Las vainas son largas, angostas, cilíndricas, y están dispuestas por pares. Dentro de la vaina se encuentran numerosas semillas cubiertas de un abundante vello café. (55)

2.1.6 Distribución geográfica.

El laurel rosa es un arbusto originario de la región mediterránea (56) y se encuentra también en Macaronesia; es una planta típica de los bordes de arroyos, ríos y cursos de agua intermitentes de las zonas más térmicas de la provincia. (57) En México se cultiva como planta de ornato. (33)



Figura 1. *Schinus molle*; (Anacardiaceae)



Figura 2. *Nerium oleander*; (Apocynaceae)

2.2 RECOLECCION DE LAS PLANTAS.

La recolección de ambas plantas *Schinus molle* y *Nerium oleander* se llevó a cabo en los alrededores de Santa Catarina, Nuevo León en Junio de 1998. Se recolectaron las hojas de ambas plantas y se trabajó los extractos de las mismas. Cada planta se identificó en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas con los números 023490 (*S. molle*) y 023491 (*N. oleander*).

2.2.1 EXTRACCION DEL MATERIAL VEGETAL.

La extracción de ambas plantas se llevó a cabo una vez que el material se secó. Las hojas secas, se trituraron en una licuadora, posteriormente se tomaron 30 g de cada planta a los que se le adicionó 150 mL de solvente (22, 52). Los principios activos del material seco y molido se extrajeron con solventes de polaridad creciente por 7 días con agitación constante. Se obtuvieron extractos en: éter de petróleo, hexano, acetona y etanol como se muestra en la Figura 3. Para las pruebas microbiológicas el extracto obtenido se disolvió a una concentración de 333.3 mg / mL en etanol y se esterilizó por filtración en filtros de membrana de 0.25 μm . (54)

2.3 PRUEBAS DE INHIBICION BACTERIANA.

Los métodos empleados para el ensayo microbiológico se realizaron en el Departamento de Bioquímica; en el laboratorio de Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas por el método de difusión en placa que reporta Koneman. (26)

2.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

Para el presente estudio se seleccionaron 6 bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales: *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*. Proporcionadas por el departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, de la U.A.N.L.

2.3.2 PREPARACION DE MEDIOS ENRIQUECIDOS.

1) Para activación de bacterias:

Se usó medio caldo C. Rivas 8.5gr en 100mL de agua destilada. Este medio de cultivo contiene glucosa, peptona de colágeno, extracto de levadura, NaCl, CaCO₃ ajustados a pH 7 y fue diseñado por Rivas Morales C. en 1998, para la producción de biomasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 a escala piloto para la obtención de proteasas caseínolíticas. Este medio de cultivo se utilizó en la investigación ya que presenta los nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi*, *Shigella disenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae*; *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* como lo reporta Velázquez González C C.(44, 55)

Para la preparación del medio se utilizaron tubos de ensayo 18 X 150 a los que se les agregaron 5 mL del medio a cada uno, se esterilizaron, se inocularon con las diferentes cepas en estudio con una asa cada tubo previamente identificado, se tomaron

medidas asépticas, como encender mechero, evitar corrientes de aire, etc. Se incubaron de 12-18 h a 37°C. (44, 52)

2) Para cultivo de bacterias:

Se utilizó el medio sólido C. Rivas ; 8.5g en 100 mL de agua destilada, se esterilizó y se adicionó sobre cajas petri en proporciones de 20 mL, que se utilizaron en las pruebas de inhibición "in vitro" para los microorganismos mencionados en el punto 2.3.1. (44, 52)

3) Pruebas in vitro:

El uso de discos de papel filtro aumenta más la cantidad de antibióticos o extractos que se pueden probar simultáneamente en pruebas de susceptibilidad; según Koneman. (26) El método de difusión en placa se realizó colocando 10 µL de cada uno de los extractos obtenido en discos de papel filtro Whatman No. 1 sobre una placa sólida de medio C. Rivas, previamente inoculada con 100 µL de una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC, se probaron también en un disco 10 µL el solvente utilizado para disolver el extracto como control negativo (etanol) y 10 µL de un antibiótico como control positivo (cloranfenicol). Se incubó a 37°C por 24h; después de este período se midieron los halos de inhibición en mm para cada prueba.

Los extractos que presentaron mayor actividad microbiana se utilizaron en las pruebas cromatograficas y químicas para la separación e identificación, de las fracciones activas.

2.4 SEPARACIÓN E IDENTIFICACION DE LAS FRACCIONES CON EFECTO INHIBITORIO

La separación de las fracciones se realizó por cromatografía en capa fina. Para la identificación se usaron reacciones para determinar grupos funcionales. (22, 43, 52)

2.4.1 Métodos cromatográficos

2.4.1.1 Cromatografía en capa delgada.

Este método se realizó para la separación y purificación de compuestos. Las placas cromatográficas se prepararon en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L., utilizando sílica gel J.T Baker 7G mezclada con agua en una proporción de 10 g sílica / 40 mL de H₂O aplicándola sobre las placas de vidrio, se secaron después por un periodo de una hora en la estufa de 100 °C. En la placa seca se colocó la muestra por medio de un capilar, la placa se introdujo a una cámara de vidrio de boca ancha que contenía el eluyente y una tapa móvil de aluminio para así mantener saturados los vapores del eluyente. (22)

Para calcular el R_f se midió la distancia del punto de aplicación de la muestra hasta la mitad de la mancha detectada y se dividió el valor entre la distancia del punto de aplicación y el frente del eluyente.

2.4.1.2 Agentes cromogénicos

Para observar el cromatograma y localizar sus componentes, que no son apreciables al visible se usaron: Luz ultravioleta y vapores de yodo.

2.4.1.3 Bioautografía

Se utilizó la técnica de Hamburger modificada por Verástegui en 1998; se seleccionó la cromatografía en la que las fracciones mostraran mayor separación. En una caja petri se colocó el cromatograma desarrollado esterilizado con luz ultravioleta y sobre él se colocó una tira de medio sólido C. Rivas de 1x 6 cm, con un espesor de 0.3 mm. Posteriormente se añadieron 150 μL de la dilución 1×10^{-6} UFC del microorganismo sobre la tira de agar y se distribuyó homogéneamente. Las condiciones de humedad se mantuvieron colocando dentro de una caja petri un fragmento de algodón húmedo con 4 ó 5 mL de agua destilada estéril. Se utilizó como control negativo un cuadro de agar inoculado con el mismo microorganismo pero separado del cromatograma. Se incubó el tiempo y la temperatura adecuada para cada microorganismo en estudio. La zona de inhibición de los microorganismos en la tira de agar se midió y se correlacionó con el registro previo de las fracciones separadas cromatográficamente facilitando así el aislamiento y la identificación del compuesto responsable del efecto antimicrobiano. (21, 53)

2.4.2 Métodos químicos de identificación

2.4.2.1 Pruebas para grupos funcionales

Prueba de Liebermann-Burchard:

La prueba es para triterpenos y compuestos esteroídales. Se disuelven 1.5 mg de muestra en cloroformo y luego se añaden unas gotas del reactivo, observándose cambios de

coloración, el reactivo se prepara agregando una gota de ácido sulfúrico a una mezcla de 1.0 mL de anhídrido acético y 1.0 mL de cloroformo. (13, 22)

Prueba de Salkowski:

Similar a la de Liebermann-Burchard, la muestra (1-2 mg) en 1.0 mL de cloroformo se pone en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico, desarrolla colores amarillo o rojo, para esteroides y metilesteroides. (12, 13, 22)

Prueba de Shinoda:

Para compuestos de tipo flavonoide; 1.0 mg de la muestra disuelta en etanol y unas limaduras de magnesio se le aplica calor (60 °C) y después unas gotas de HCl por las paredes. Se considera positiva con la aparición de colores naranja, rojo, rosa, azul o violeta. (12, 13, 22)

Prueba de Acido Sulfúrico:

Para flavonoides una pequeña cantidad de muestra se disuelve en ácido sulfúrico concentrado y se observan coloraciones amarillo para flavonas y flavonoles, naranja-guinda para flavonas; rojo-azuloso, para chalconas. También detecta quinonas con coloración roja- púrpura. (12, 13, 22)

Prueba de Baljet:

Para sesquiterpenlactonas, se utilizan 2 soluciones que se mezclan en iguales volúmenes antes de usarse, la solución A, un gramo de ácido pícrico en 100 mL de etanol; solución B, 10 g de hidróxido de sodio en 100 mL de agua. Para la prueba se ponen 10 mg de

compuesto y unas 3-4 gotas de reactivo, siendo positiva si se forma una coloración naranja o roja oscura. (12, 13, 22)

Prueba de Dragendorff:

Modificación de Munier y Machelobuf . Para alcaloides.

Solución A : Se disuelven en 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua.

Solución B: Se disuelven 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua

El reactivo se prepara mezclando 5 mL de A, 4 mL de B y 100 mL de agua, el reactivo es estable por un año, la prueba es positiva para alcaloides al dar la placa coloraciones rojo o naranja, persistentes por 24 h. (12, 13, 22)

Prueba de bromo en tetracloruro de carbono:

Para insaturaciones, a 2 mg de la muestra contenida en un tubo de ensaye se le agrega una solución de bromo al 2 % en tetracloruro de carbono; si la coloración de la solución desaparecen en un principio la prueba se considera positiva. (12, 13, 23)

Prueba del permanganato de Potasio:

Para dobles enlaces, se prepara una solución de permanganato de potasio al 2 % en agua, se disuelven 0.2 mg de muestra en agua, acetona, o metanol y se toma en capilar agregándole la solución de permanganato de potasio. La prueba es positiva si hay decoloración del reactivo. (12, 13, 22)

Prueba de cloruro férrico:

Se disuelve una pequeña cantidad de muestra en etanol y se añade una gota de solución de cloruro férrico en agua (2.5 %). La aparición de una coloración o precipitado rojo, azul, violeta o verde se considera positiva. (12, 13, 22)

Prueba de 2,4- Dinitrofenilhidracina:

Para grupo carbonilo. En un tubo de ensaye se disuelve 50 mg de 2,4-dinitrofenilhidracina en 1 mL de etanol caliente. Se agregan 50 mg del compuesto carbonílico y se calienta a baño María por 10 a 15 minutos. Se deja en reposo y luego se enfría en baño de hielo, la aparición de un precipitado indica la presencia de un grupo carbonilo. (2, 13, 22)

Prueba de Molisch:

Para azúcares. En un tubo de ensaye colocar la muestra, añadir el reactivo de Molisch, 3 gotas, y agitar. Luego, inclinar el tubo y depositar por la pared 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. Es positivo cuando se forma un anillo coloreado en la interfase. El reactivo se prepara disolviendo 1 g de α -naftol en 100 mL de etanol al 95 %. (12, 13, 22)

2.5 Métodos espectroscópicos para la determinación de grupos funcionales

La determinación de los grupos funcionales de las fracciones que presentaron efecto inhibitorio sobre los microorganismos en estudio; se llevó a cabo en el ITESM en un espectrofotómetro de Infrarrojo.

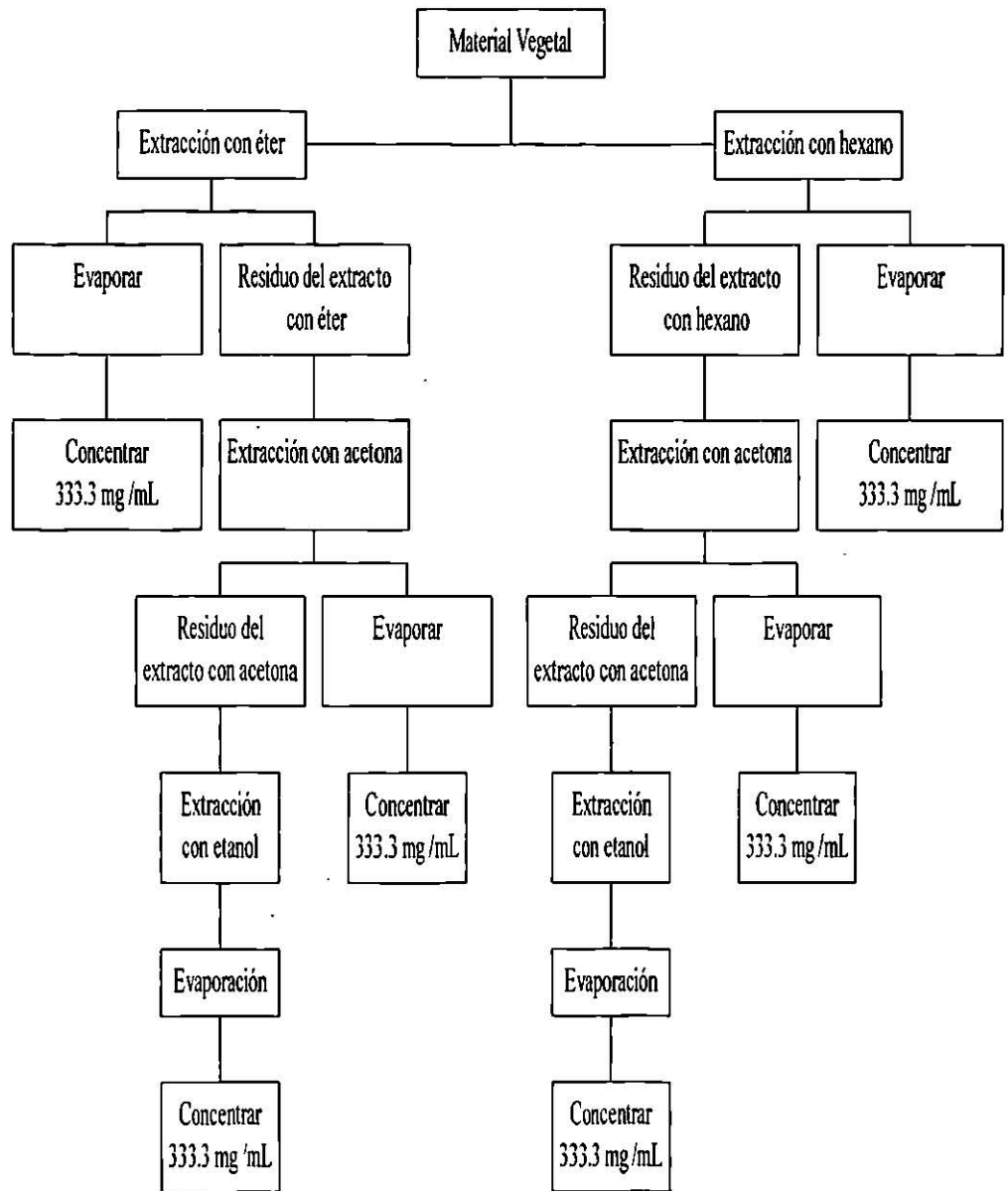


Figura 3. Obtención de los extractos de *S. molle* y *N. oleander*

3. RESULTADOS

3.1 Actividad antimicrobiana

Los extractos obtenidos en éter y acetona de *Schinus molle* presentaron mayor actividad sobre las bacterias utilizadas en la investigación. (tabla 1) Por otra parte todos los microorganismos en estudio fueron inhibidos en diferente proporción por los extractos en éter y acetona de *Nerium oleander* a excepción de *S. flexneri* que no fue inhibida por el extracto en acetona. (tabla 2) . La inhibición bacteriana de los diferentes extractos de ambas plantas se muestra en las figuras 4 y 5.

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Schinus molle*.

MICROORGANISMOS	EXTRACTOS de <i>Schinus molle</i>			
	ETER DE PETROLEO	HEXANO	ACETONA	ETANOL
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+++	++	+++	++
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	+	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	++	+	+
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	++	-
<i>Shigella flexneri</i>	++	+	++	+

N = 3 + INHIBICION DE 2.5 - 4.9 mm ++ INHIBICION DE 5 - 10 mm +++ INHIBICION >10

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de los extractos de *Nerium oleander*.

MICROORGANISMOS	EXTRACTOS de <i>Nerium oleander</i>			
	ETER DE PETROLEO	HEXANO	ACETONA	ETANOL
<i>Escherichia coli</i>	++	-	+	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	++	+
<i>Bacillus cereus</i>	+	-	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	-	+	-
<i>Salmonella typhi</i>	++	-	++	-
<i>Shigella flexneri</i>	+	-	-	-

N = 3 + INHIBICION DE 2.5 - 4.9 mm ++ INHIBICION DE 5 - 10 mm +++ INHIBICION >10

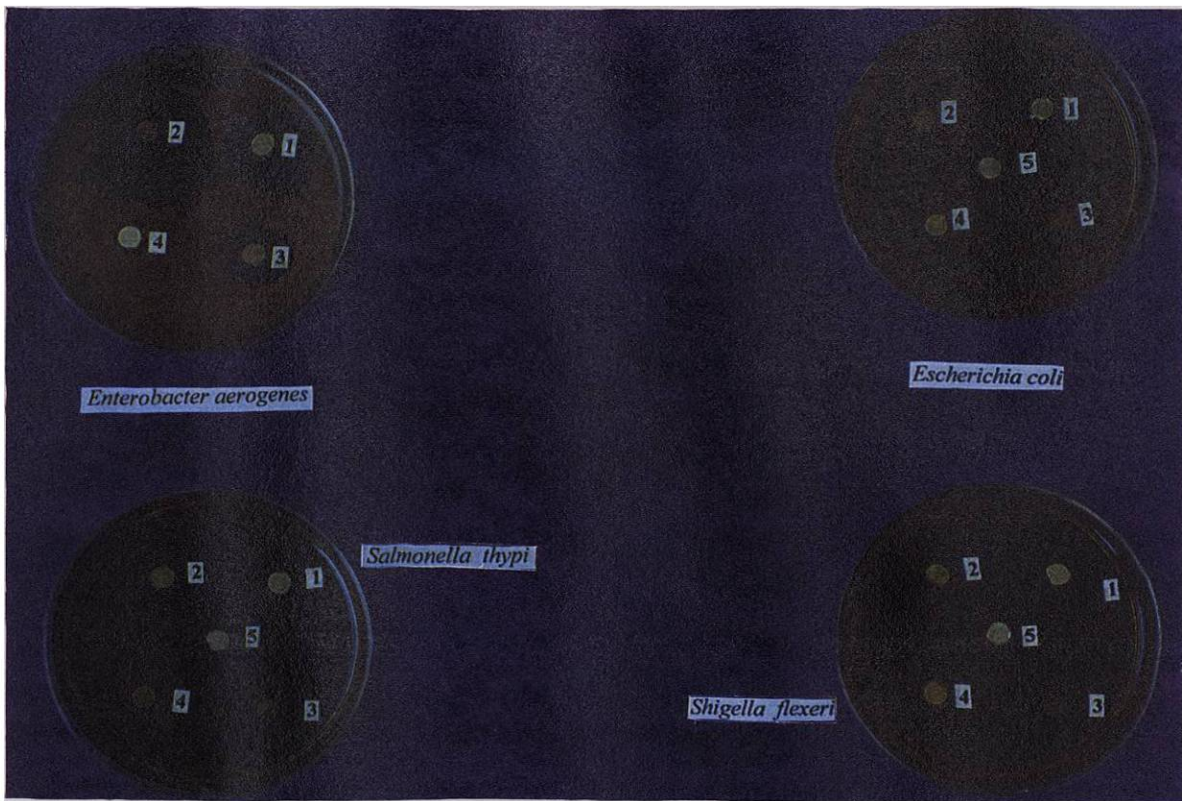


Figura 4. Efecto antimicrobiano de los extractos de *Schinus molle*; (Anacardiaceae) Microorganismos utilizados para evaluar la actividad: *E.aerogenes* en los solventes: 1. Hexano, 2. Acetona, 3. Etanol y 4. Control negativo y con *E. coli* *S. thyphi* y *S. flexneri* en los solventes: 1. Eter de petróleo, 2. Hexano, 3. Acetona, 4. Etanol y 5. Control negativo

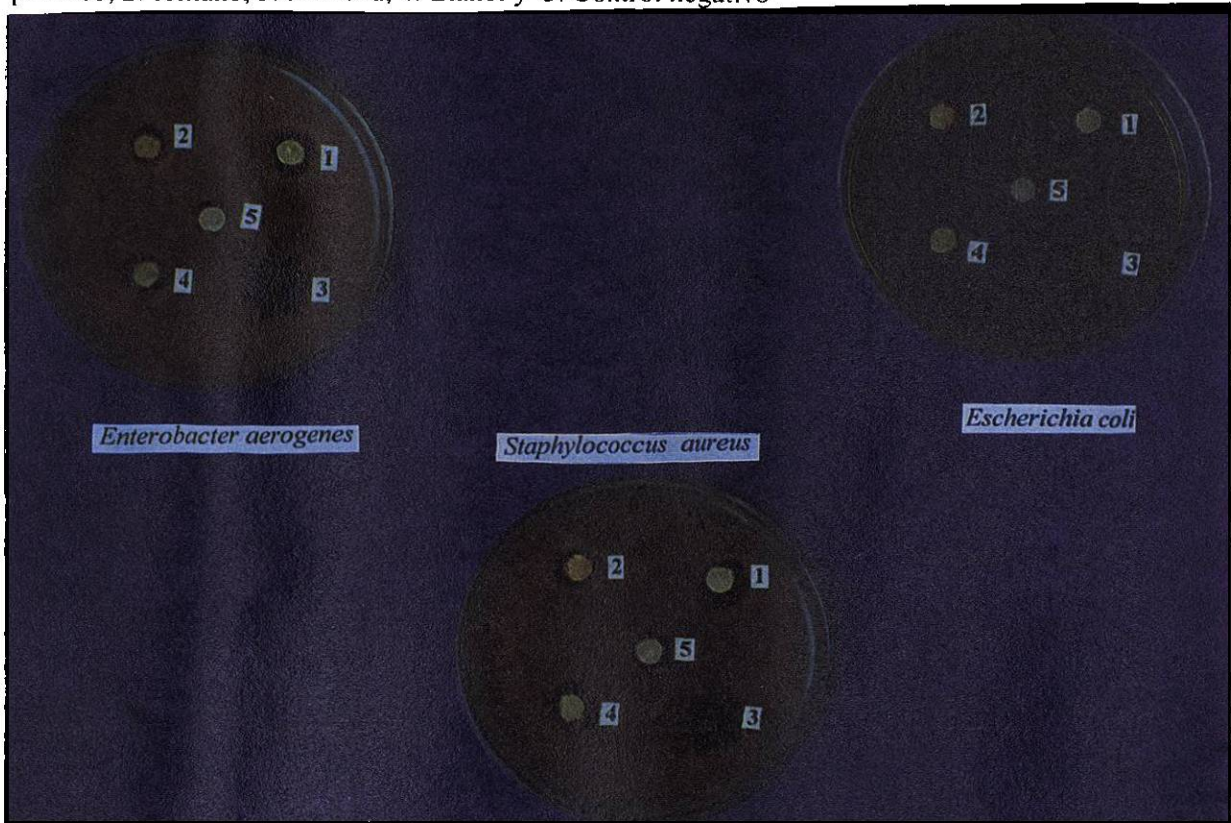


Figura 5. Efecto antimicrobiano de los extractos de *Nerium oleander*; (Apocynaceae) Microorganismos utilizados para evaluar la actividad: *E.aerogenes*, *E. coli* y *S. aureus*, los solventes: 1. Eter de petróleo, 2. Hexano, 3. Acetona, 4. Etanol y 5. Control negativo

Tabla 3. Inhibición bacteriana de los extractos que presentaron mayor actividad sobre todos los microorganismos estudiados en comparación con el efecto presentado por el cloranfenicol.

Microorganismos	Halo de inhibición en mm			
	Extracto Eter <i>S. molle</i>	Extracto Acetona <i>S. molle</i>	Extracto Eter <i>N. oleander</i>	Cloranfenicol 25mg/mL
<i>Escherichia coli</i>	3.0	3.0	5.0	4.0
<i>Shigella flexneri</i>	9.0	5.0	2.0	3.0
<i>Bacillus cereus</i>	3.0	4.0	3.5	21.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.5	3.0	5.0	8.0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	12.0	18.0	4.5	19.0
<i>Salmonella typhi</i>	4.0	6.0	5.0	23.0

3.2 Separación de fracciones por métodos cromatográficos

Se probaron varios eluentes (Hexano-Cloroformo-Etanol 1:1:1, Cloroformo-Hexano 4:2, Hexano-Cloroformo 9:4, Hexano-Acetona 9:2, Cloroformo-Acetona 9:1, Hexano-Acetona-Cloroformo 2:2:2, Benceno-Cloroformo 2:3, Benceno-Acetona 9:2, Eter de petróleo-Acetona 9:2, Eter de petróleo- Benceno-Acetona 9:9:2) y se encontró que el Eter de petróleo-Benceno-Acetona 9:9:2 era un eluyente adecuado para separar las bandas de los extractos que presentaron efecto antimicrobiano (Extracto en éter de petróleo y en acetona de *S. molle*, del extracto etéreo de *N. oleander*). La separación se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCD) en placas de silica gel J.T. Baker 7G en las cuales se observaron diferentes bandas dependiendo del extracto utilizado. La revelación de las bandas se hizo visible por medio de vapores de yodo y luz UV, los resultados se muestran en las tablas 4, 5 y 6.

Tabla 4. Cromatografía en capa fina del extracto etéreo de *S. molle*

MANCHAS	Rf	VISIBLE	UV	VAPORES DE YODO
1	0.23	Amarilla	-----	-----
2	0.41	Amarilla	--	-----
3	0.50	verde claro	amarilla	café
4	0.60	verde claro	marrón	verde claro
5	0.61	verde	naranja	verde
6	0.66	verde	roja roja	verde

Tabla 5. Cromatografía en capa fina del extracto en acetona de *S. molle*

MANCHAS	Rf	VISIBLE	UV	VAPORES DE YODO
1	0.03	verde claro	-----	-----
2	0.25	amarillo	café	amarilla
3	0.43	verde claro	-----	café
4	0.52	verde claro	verde claro	-----
5	0.60	verde claro	naranja	verde
6	0.63	verde	rojo	-----
7	0.68	verde	rojo	verde

Tabla 6. Cromatografía en capa fina del extracto etéreo de *N. oleander*

MANCHAS	Rf	VISIBLE	UV	VAPORES DE YODO
1	0.26	Amarilla	-----	-----
2	0.44	Amarilla	--	-----
3	0.53	verde claro	amarilla	café
4	0.65	verde	naranja	verde
5	0.70	amarilla	roja amarilla	amarilla

3.3 Determinación de la fracción con actividad antimicrobiana por Bioautografías

En la tabla 8 se muestra que las fracciones 1, 2, 3 de los extractos en éter de *S. molle* presentaban efecto sobre *E. aerogenes* y *B. cereus*; mientras que las fracciones 1, 2, y 3 del extracto en acetona de la misma planta presentaron efecto sobre *E. aerogenes* y solo las fracciones 1 y 2 de este extracto mostraron efecto sobre *B. cereus*. Las fracciones de *N. oleander* no presentan efecto sobre ningún microorganismo. (Figura 6)

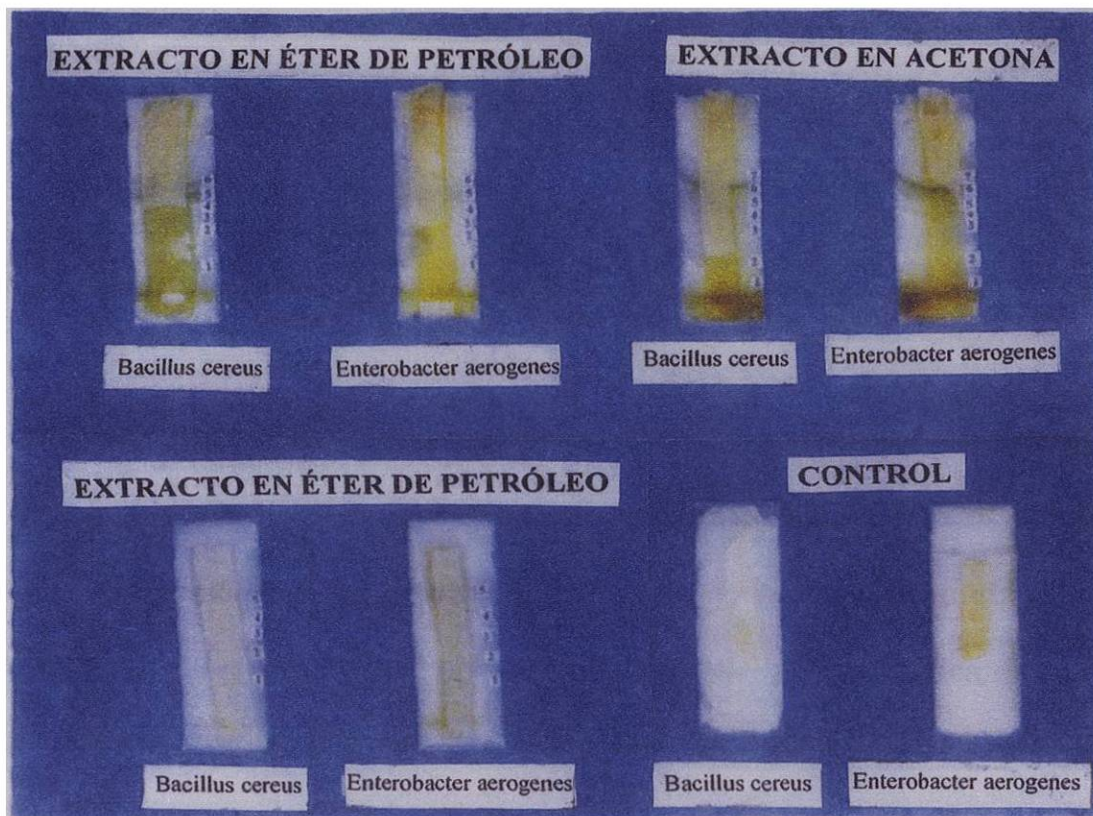


Figura 6. Inhibición bacteriana de las fracciones separadas de los extractos de *S. molle* y *N. oleander* por bioautografía. En la parte superior *S. molle* y en la inferior *N. oleander* y control.

Tabla 7. Pruebas de inhibición bacteriana por bioautografía

MICROORGANISMOS	Fracciones Extracto éter de petróleo <i>Schinus molle</i>						Fracciones extracto acetona <i>Schinus molle</i>							Fracciones Extracto éter de petróleo <i>N. oleander</i>				
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.4 Determinación de grupos funcionales por pruebas químicas.

Se realizaron las pruebas químicas a los extractos de *S. molle* para la determinación de los grupos funcionales de las fracciones que presentaron inhibición en la bioautografía; aunque solo las pruebas de KMnO_4 , H_2SO_4 y Shinoda presentaron algunas reacciones positivas para las fracciones probadas; la primer prueba indica la presencia de insaturaciones y las últimas 2 la presencia de flavonoides o compuestos tipo flavonoides respectivamente, los resultados se muestran en la tabla 8. También se realizaron las pruebas químicas en el extracto etéreo de *N. oleander* (Tabla 9).

Tabla 8. Determinación de los grupos funcionales y metabolitos secundarios de las fracciones activas de *S. molle*.

PRUEBAS PARA GRUPOS FUNCIONALES	FRACCIONES ÉTER DE PETRÓLEO <i>Schinus molle</i>			FRACCIONES ACETONA <i>Schinus molle</i>		
	1	2	3	1	2	3
Br ₂ / CCl ₄ (insaturaciones)	-	-	-	-	-	-
KMnO ₄ (insaturaciones)	+	+	+	+	+	+
2-4 DNFH (carbonilos)	-	-	-	-	-	-
FeCl ₃ (oxidrilos fenólicos)	-	-	-	-	-	-
Liebermann-Burchard (triterpenos)	-	-	-	-	-	-
Salkowski (esteroles)	-	-	-	-	-	-
Molisch (carbohidratos)	-	-	-	-	-	-
KOH (Coumarinas)	-	-	-	-	-	-
Baljet (sesquiterpenlactonas)	-	-	-	-	-	-
H ₂ SO ₄ (flavonoides)	+	-	+	-	-	-
Shinoda (flavonoides)	-	-	+	-	-	-
Dragendorff (alcaloides)	-	-	-	-	-	-

Tabla 9. Determinación de los grupos funcionales y metabolitos secundarios del extracto *N. oleander* en éter de petróleo.

PRUEBAS PARA GRUPOS FUNCIONALES	EXTRACTO ÉTER DE PETRÓLEO <i>Nerium oleander</i>
Br ₂ / CCl ₄ (insaturaciones)	-
KMnO ₄ (insaturaciones)	+
2-4 DNFH (carbonilos)	-
FeCl ₃ (oxidrilos fenólicos)	-
Liebermann-Burchard (triterpenos)	-
Salkowski (esteroles)	-
Molisch (carbohidratos)	-
KOH (Coumarinas)	-
Baljet (sesquiterpenlactonas)	-
H ₂ SO ₄ (flavonoides)	-
Shinoda (flavonoides)	-
Dragendorff (alcaloides)	-

En la figura No. 7 se muestra el espectro de infrarrojo de la fracción de mayor actividad mostró un picos intensos a 758 cm⁻¹, 1216 cm⁻¹, 1504 cm⁻¹, 1714 cm⁻¹, 3066 cm⁻¹ y 3367 cm⁻¹.

Date: 18/11/99

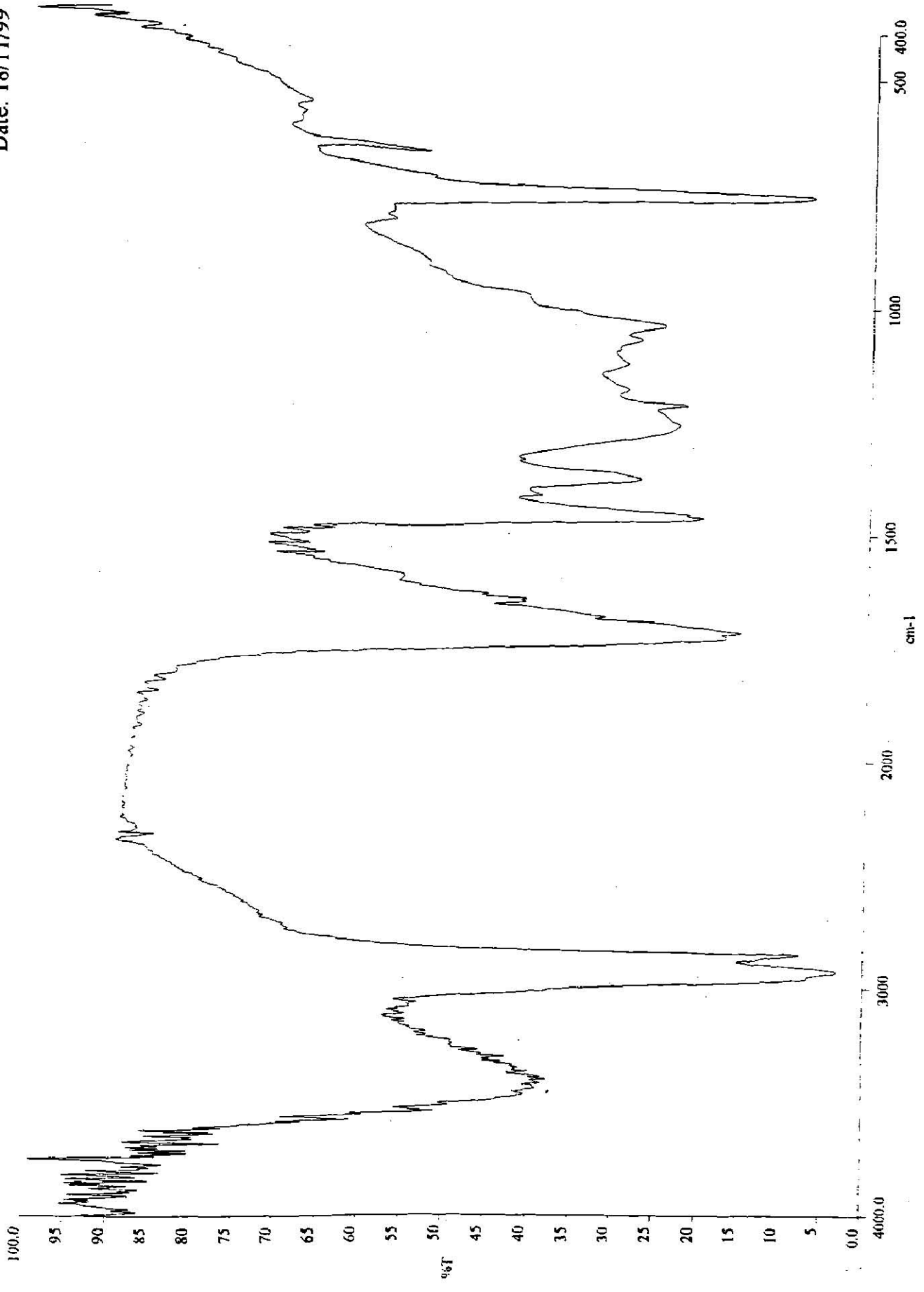


Figura No. 7 Espectro infrarrojo de la fracción No. 3 del extracto etéreo de *S. molle*

4. DISCUSIÓN

En esta investigación se encontró que el extracto etéreo de *S. molle* presentaba inhibición débil sobre *Salmonella typhi* y que todos los extractos de la misma planta mostraban un efecto mayor sobre *Enterobacter aerogenes*; lo que concuerda con Kramer quien reporta que *Schinus molle* tiene un efecto antibacterial, antifúngico, antiviral (27).

Se pudo comprobar lo reportado por March en 1991; en nuestros resultados el efecto inhibitorio varía de acuerdo al tipo de solvente utilizado en la extracción y al microorganismo con el cual se ponga en contacto. *Enterobacter aerogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella flexneri* fueron inhibidos por todos los extractos de *S. molle* en mayor proporción el primero y menor en los últimos; los extractos etanólicos de *S. molle* presentaron mayor inhibición en *E. aerogenes* y *Bacillus cereus*. Se comparó la actividad con cloranfenicol observándose que el extracto en éter de *S. molle* presentaba mayor efecto que este antibiótico sobre *S. flexneri* y un efecto superior sobre *E. aerogenes*; mientras que el extracto acetónico de la misma planta presentó un efecto muy cercano al de dicho antibiótico sobre *E. aerogenes* y un menor efecto sobre el resto de los microorganismos. , Sanchez-García en 1995 encontró inhibición en estos mismos microorganismos en extractos acuosos. Por otra parte en 1993 Gundidza M., probó los extractos acuosos del aceite esencial de las hojas frescas de *S. molle*, y encontró que estos exhibían una actividad significativa sobre especies de bacterias como *E. aerogenes*, *E. coli* entre otros.

Las pruebas de CCD mostraron que el eluyente y su concentración contribuyen en la separación de los extractos, ya que se probaron varios eluentes a diferentes concentraciones de los mismos y se observó que el eluyente más adecuado para separar las bandas de los extractos que presentaron mejor efecto era el éter de petróleo-benceno-acetona 9:9:2. Las cromatografías y bioautografías usadas para separar e identificar las fracciones de los extractos en éter y acetona de *S. molle* revelaron 6 y 7 fracciones respectivamente. Sin embargo solo las fracciones 1, 2, y 3 de ambos extractos con Rf de 0.23, 0.41, 0.50 para el primero y 0.03, 0.25, 0.43 para el segundo mostraron inhibición sobre *E. aerogenes* y al mismo tiempo las fracciones antes mencionadas del primer extracto presentaron inhibición en *B. cereus* y solamente las fracciones 1 y 2 del extracto en acetona presentaron efecto sobre dicho microorganismo.

Las pruebas químicas para la identificación de grupos funcionales muestran que las fracciones con Rf de 0.23, 0.41 y 0.50 del extracto en éter de *S. molle* presentan insaturaciones lo mismo que las fracciones con Rf 0.03, 0.25 y 0.43 extraídas con acetona de la misma planta. Sin embargo la fracción 1, con Rf 0.23 indica la presencia de compuestos flavonoides al parecer flavonas ya que al realizar la prueba de H₂SO₄ se presentó una coloración guinda; así mismo la fracción 3, con Rf 0.50 reveló la presencia de flavonas al observar la misma coloración que en la fracción anterior por la prueba de H₂SO₄ además de una reacción positiva de la prueba de Shinoda lo cual comprueba aún más la presencia de este tipo de compuesto y se corrobora en el espectro de infrarrojo que se muestra en la figura No. 7 que presenta un pico intenso a 758 cm⁻¹ correspondiente a la flexión fuera del plano C-H de anillo aromático, absorción a 1504 cm⁻¹, corresponde a alargamiento C-C de anillo aromático y a 3066 cm⁻¹ de

estiramiento C-H, presenta un pico fuerte a 3367 cm^{-1} de estiramiento de O-H y 1216 cm^{-1} de alargamiento C-O de fenoles, absorción fuerte a 1714 cm^{-1} para carbonilo cetónico. Estas sustancias que también han sido aisladas de insectos *Melipotis perpendicularis* específicamente el Lonchocarpol A que tiene efecto bactericida sobre *S. aureus* y *Enterococcus faecium* según Salvatore M.J (47) La genisteína es otro compuesto flavonoide obtenido de *Genista ephedroides* por Pistelli (40) y la Oct-1-en-3-yl arabinopiranosil-(1→6)-β-glucopiranosido y ácido phaselico obtenidos de *Trifolium subterraneum* por Shaofang (49) . Cabe mencionar que las pruebas químicas para la determinación de grupos funcionales no son pruebas confirmatorias y que para poder establecer con certeza que se trata de un grupo funcional en especial es necesario realizar estudios espectroscópicos.

El extracto en éter de petróleo de *Nerium oleander* presentó un efecto moderado sobre *S. typhi*, *E. coli* y *S. aureus*. Por otra parte *E. aerogenes* fue inhibido por todos los extractos de *N. oleander*; mientras que el resto de los microorganismos no fueron inhibidos o se inhibieron en menor medida en los extractos de hexano, acetona y etanol. Los extractos en éter de petróleo de *N. oleander* presentaron actividad biológica sobre todos los microorganismos en estudio; aunque no existen reportes de su uso como agente bactericida; sin embargo este extracto presentó mayor inhibición sobre *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi* y menor inhibición sobre *B. cereus* y *S. flexneri* y *E. aerogenes*. También se observó que el extracto en éter de *N. oleander* no presentaba efecto significativo sobre los microorganismos estudiados en comparación con cloranfenicol.

Las cromatografías del extracto en éter de *N. oleander* mostraron 5 fracciones, sin embargo, las fracciones separadas no presentaron efecto antimicrobiano en la bioautografía; esto se puede deber a que exista una acción sinérgica entre todos los compuestos que se encuentran en el extracto y no a un principio activo en particular como lo menciona Velázquez González (52), ya que el extracto si presentó efecto antimicrobiano antes de separar sus fracciones.

Por otra parte las pruebas realizadas en el extracto en éter de petróleo de *N. oleander* solamente indicaron la presencia de insaturaciones mediante la prueba de KMnO_4 ; aunque se han realizado otros estudios en *Nerium. odorum* dónde se ha encontrado que los extractos etéreos de raíz y corteza contienen acetofenonas (2,4 dihidroxiacetofenona y 4-hidroxiacetofenona) que son usadas en enfermedades de la piel probablemente causadas por microorganismos (50). Es cierto que las sustancias obtenidas de este tipo de plantas son muy tóxicas para el hombre pero se podría establecer la dosis adecuada para usar el extracto como agente interno ya que con relación a estos antecedentes podría utilizarse como agente antimicrobiano externo. Además en *N. oleander* se han encontrado un gran número de sustancias como la oleandrigenina, neriína, desacetiloleandrina, neriantina, adinerina, tanino, flavonas entre otras; se cree que en las pruebas con cloranfenicol este tipo de sustancias actúan de una manera sinérgica produciendo la inhibición encontrada en esta investigación ya que se tienen antecedentes de que las flavonas tienen efecto antimicrobiano sobre algunas bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales (45, 47, 55).

5. CONCLUSIONES

- Los extractos de *S. molle* y *N. oleander* presentaron actividad contra los microorganismos estudiados .
- El extracto etéreo de *S. molle* presentó mayor actividad sobre *E. aerogenes* y *S. flexneri*, y el etanólico inhibió moderadamente a *B. cereus*.
- El extracto etéreo de *Nerium oleander* mostró efecto moderado sobre *S. aureus* y *S. typhi* y débil sobre *B.cereus* y *S. flexneri*.
- El mejor eluyente para separar las fracciones de ambas plantas fue éter de petróleo-benceno-acetona en una relación 9:9:2.
- El extracto etéreo de *S. molle* por bioautografía presentó 3 fracciones activas sobre *E. aerogenes* y *B.cereus*. y el extracto acetónico presentó 3 fracciones activas sobre *E. aerogenes* y 2 sobre *B.cereus*.
- Las 3 fracciones activas del extracto etéreo de *S. molle* presentaron positiva la prueba de KMnO_4 para insaturaciones; la prueba de H_2SO_4 (flavonoides) resultó positiva para las fracciones 1 y 3 y la prueba de Shinoda (flavonoides) fue positiva para la fracción 3. La fracción 3 del extracto etéreo por medio de espectroscopía de infrarrojo presentó señales características para flavonoides.
- En el extracto acetónico de *S. molle*, las 3 fracciones dieron positiva la prueba de KMnO_4 (insaturaciones) .

6. BIBLIOGRAFÍA.

1. Allegrini, J. 1973. Emulsions d'Huiles Essentielles Fabrication et Applications Microbiologie. Travaux de la Societe de Pharmacie de Montpelliex. Pp. 33.73-86.
2. Baron Samuel. 1991. Medical Microbiology. Third Edition. Associate Editor Churchill Livingstone N.Y. Pp 378-382
3. Begum Sabira, Razia Sultana and Bina Siddiqui. 1997. Triterpenoids From The Leaves of *Nerium Oleander*. J. Phytochemistry. Vol 44. No.2. Pp. 329-332.
4. Bhakuni, D. 1976. Screening of chilean plant of Anticancer .I Lloydia 394: 225-243
5. Bilbao Rodriguez María del Rosario. 1971. Estudio Fitoquímico del *Schinus molle*. Tesis. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. Pp:1
6. Brickell Christopher. 1992. Enciclopedia de plantas y flores. Vol. II . Grijalbo México. Pp. Fitoquímica. Editorial Limusa, México. Pp.94
7. Carmona García Francisco Javier. 1970. Contribución al estudio químico de *Schinus molle* (Pirul). Tesis Instituto Tecnológico y de Estudios superiores de Monterrey. Escuela de Ciencias. Monterrey N.L. Pp. 2
8. Caceres, A. 1990. Plants Used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. I screening of 84 plants against bacteria. J. Ethnopharmacology. Pp 30: 55-73

9. Corsano, S. y Mincione E. 1965. Triterpenoids from *Magnifera Indica*: The Estructure of Magniferolic Acid. *Tetrahedrom Lett.* Pp 2377
10. Dikshit A, Naqvi A A, Husain A. 1986. *Schinus molle*: anew source of natural fungitoxicant. *Appl Eviron Microbiol.* 51(5): 1085-1088
11. Dominguez, X. A. Javier F. Carmona and Rosario B de Venegas. 1970. Lignoceric acid other compounds of *Schinus molle*. *Phytochemistry*. Pergamon Press. Vol. 10. Pp. 1687.
12. Dominguez, X. A. 1979. *Fitoquímica*. Editorial Limusa, México. Pp 94
13. Dominguez, X. A. 1982. *Química Orgánica Experimental*. Editorial Limusa, México. Pp 79-106
14. Espinoza Bustamante C.G. 1990. Estudio Químico de *Krameria interior* y *Aristoochia brevipes*. Tesis. F.C.B. U. A. N. L.
15. Fernández Salazar F. M. 1996. Inhibición de Especies de *Listeria* por Extractos de Plantas. Tesis. F. C. B. U. A. N. L. Pp
16. Fulenmeier Martin. 1984. *Plantas Curativas*. Editorial Schwiter Zug, Suiza. Pp 122
17. Gajanon P. P. Dutl. S. Bull .1935. *Chemical Abstract*. United Provinces. Agra Oudh India 29 Pp 7577
18. González M. A. Lombardo. 1946. *Indigenus Medicinal Plants of Uruguay*, Rev Farm. Buenos Aires. Pp 88, 297-309
19. Greulach Victor A. 1970. *Las Plantas Introducción a la Botánica Moderna*. 1ªEd Centro regional de Ayuda Técnica. Pp 26-28.

20. Gundidza M. 1993. Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. Departament of Pharmacy, Faculty of Medicine, University of Zimbabwe, Harare. Cent Afr Med 1993. Nov; (11): 231-234
21. Hamburger, M.O, C.A. Cordell. 1987. A direct Bioautographic TLC assay compounds possessing antibacterial activity, J. of Natural Products, Vol.50. No. Pp 19-22
22. Huacuja González E. R. 1995. Contribución al estudio Fitoquímico y determinación de la acción antimicrobiana de *Senecio candidissimus*. Tesis. F. C.B. U. A. N. L. Pp 1-126
23. Hylin J.W. and E.E. Spenyer. 1966. *Schinus molle*, Chlorinium Compds. J. Ags Food Chem. Pp 4 (5) 515-19
24. Kaistha K.K. 1962. Structural Studies on the Triterpenes of *Schinus terebinthifolius*. J. Pharmacology. Pp 51, 1136-9
25. Kaistha K. K. and L. B. Kier. 1962. A Phitochemical Investigation of the Fruits of *Schinus Terebinthifolius*. Disertation Abs. Pp 23, 844-5
26. Koneman Elmer W. Stephen D. Allen. V. R. Dowell. Hebert M. Sommers. 1989. Diagnóstico Microbiológico. 1ª edición. Editorial Medica Panamericana. Pp 380-402
27. Kramer; F.L. 1957. The Pepper Tree *Schinus molle*. Econ Bot 11: 322-323
28. Lewis. H.W. 1977. Medicinal Botany. John Wiley & Sons Publication. U.S.A. Pp. 374
29. Magaña, R. H. M. G. Jorda. 1991. Plantas medicinales .5ª ed. Editorial Árbol, S. A. de C.V. Pp 7-8

30. Maldonado A. B. J. Guillermo. J. G. D. 1993. Manual para el Manejo de las Plantas Tóxicas en el estado de N. L, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Centro de Investigaciones Regionales del Noreste Campo Experimental General Teran. Pp 80
31. March, C. I. Sanz and Yufera E. P. 1991. Antimicrobial Activities on Mediterranean Plants. Zentralbl Mikrobiol. Pp 146. 291-295
32. Martínez Maximino. 1979. Catalogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de la Cultura Económica, México. D.F.
33. Martínez M. 1958. Plantas Medicinales de México. 3ª ed. Impresión León Sanchez, México.
34. Mentzer, C. Actualités de Phytochimie Fondamentale. 1968. 3ª edición. Masson et Cie. Editerus. Pp 104, 211-212
35. Mitscher, L. A. 1972. Antimicrobial Agents From Higher Plants.I. Introduction, Rationale, and Metodology. Lloydia. Pp 35: 157-166
36. Morton J. F. 1981. Atlas of Medicinal Plantas of Middle America. Charles C. Thomas Public.
37. Nuñez M.-Samper. *Schinus molle*, Fruit of and Pepper Adulteration Threwit. 1953. Anales Bromatol (Madrid). Pp 5, 345-8
38. Pellecuer, S. J. J. Allegrini. S. Bouchberg, M. 1976. Hulies Essentielles bactericideset fongiades. Revue e I' Institut Pasteur de Lyon. Pp. 9: 135-159.
39. Pereda R.M. Bye R. Bah M. 1993. Hepatotoxic Pyrrolizidine Alcaloids in the Mexican Medicinal Plant *Packera candidissima* (Asteraceae Senecionae). Journal of Ethnopharmacology. Elsiever. Pp. 43: 19-30

40. Pistelli Luisa, Alessandra B, Isa G, Antonio M. 1998. Flavonoids from *Genista ephedroides*. Dipartimento di Chimica Bioorganica, Universita di Pisa, Via Bonanno 33, 56126 Pisa, Italy, add Istituto di Botanica ed Orto Botanico, Universita di Urbino, via Bramante 28, 61028 Urbino, Italy. Journal Prod Nat. Pp 61, 1404-1406
41. Ratikanta Maiti. 1991. Plantas Utiles en el Municipio de Matehuala S.L.P; un Estudio Etnobotánico. F. C. B. U. A. N. L. San Nicolas de los Garza N.L. Pp 85,102
42. Reader's Digest. 1987. Plantas Medicinales Virtudes Insospechadas de Plantas Conocidas. I^a ed. Pp
43. Reyes Hernández A. J. 1987. Contribución al Estudio Químico y Efecto de *Salvia texana*. Tesis. F.C.B. U.A.N.L.
44. 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 Caseínicas. Facultad de Medicina. U. A. N. L. Pp XVII
45. Ross, S. 1980. Antimicrobial activity of Some Egyptian Aromatic Plants. Fitoterapia. Pp51: 201-205
46. Salimuzzaman Siddiqui. Bina S. Siddiqui, Sabira Begum, and Farrukh Hafeez. 1989. Kenerocin: A New Triterpene from the Leaves of *Nerium oleander*. Planta Médica No. 3 . Vol . 55. Editorial Thieme. Pp 292 - 293
47. Salvatore M. J. Aurora B. K. Amy C. G. H. Russell O, Kenneth F. B, GeorgeK. A, Charles J. G. Harri G. Ramjit, Steven M. P, and Keith M. W. 1997. Antibacterial Activity of Lonchocarpol A. Merck Research Laboratories,

- Rhaway, New Jersey, and Department of New Lead Pharmacology, Merck Research Laboratories, West Point, Pennsylvania. *J Prod Nat.* 61, 640-642
48. Sanchez García . Cesar. A. 1995. Efecto de Extractos de 33 Plantas sobre el crecimiento de 11 especies Bacterianas Causantes de enfermedades Gastrointestinales. F.C.B. U.A.N.L. San Nicolas, N.L. Pp 20-22
49. Shaofang Wang, Emilio L. G. and James R. S. 1998. Bioactive isoflavonols and Other Components from *Trifolium subterraneum*. Centre of Legumes in Mediterranean Agriculture, Department of Chemistry, Univesity of Western Australia, Nedlands, western Australia 6907, Australia, and CSIRO Entomology, Private Bag, Wembley, Western Australia 6014 Australia. *Journal de Prod Nat.* Pp 61, 508-510
50. Tatsuo Yamauchi, J. Michiko Hara and Yasuko Ehara. 1971. Acetophenones of roots of *Nerium odorum* *Phytochemistry*. Vol. 11. Pergamon Press. Pp 1852
51. Thomson William A. R. D. M. 1981. Guía Práctica Ilustrada de las plantas Medicinales. 1ª reimpresión, Editorial Blume. Pp 82-83, 162
52. Velázquez González Claudia C. 1997. Estudio Fitoquímico y actividad antimicrobiana de *Tiquilia canescens*. Pp 10-15
53. Verastegui M. M. A. Verde S. M. J. García A. J. S. 1998. Bioautografía para Detectar la Actividad Antimicrobiana de los extractos de plantas. *Revista de Sociedad de Química de México XXXIII Congreso Mexicano de Química XVII Congreso de Educación Química.* Pp 13.1
54. Verde S. J. 1987. Estudio Químico de *K. Cytisoides*, *K. ramosissima*, *K. sonora*, *K. grayi*, *Tiquila canescens*, *Pentalonyx creanatus* y *Kallstroemia maxima*. Tesis. ITESM.

55. Villareal Ma. Del Carmen. 1960. Contribución al estudio de los glicósidos presentes en las vainas y semillas del Laurel Rosa (*Nerium oleander*) Tesis. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Labastida. Mty. N.L.
56. West E. Emmel M.W. 1952. Poisionus Plants in Florida. Florida Ago Exp Sta. Bul. Pp 510.
57. Yougken Heber. W. 1951. Tratado de Farmacognosia. 1ª ed. Editorial Atlante. S.S. México D.F. Pp. 895-896.

