



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

Actividad antibacteriana y antifúngica de la corteza de *Yucca periculosa* Baker (Izote), de la localidad de Zapotitlán de las Salinas, Puebla

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

PRESENTA:

ALLENDE SÁNCHEZ LAURA

Director de Tesis: M. en C. ANA MARÍA GARCÍA BORES



Tlanepantla, Edo. de México

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección de la M. en C. Ana María García Bores. Con el apoyo de una beca financiada por la UNAM bajo el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) clave IN211105-3.

DEDICATORIAS

- **A mis padres (Graciela y Margarito) a quienes les debo todo lo que soy, por ayudarme a construir mis sueños, y por apoyarme en cada momento de mi vida, así como su apoyo incondicional, muchas gracias por ser mis padres, no se como agradecer tanto apoyo y comprensión.**
- **A mis hermanos Salvador, Araceli, Gustavo y Julio, por compartir una infancia feliz, por todo los bellos momentos que hemos pasado juntos, y las experiencias que nunca olvidare, así como su apoyo y comprensión, muchas gracias.**
- **A mis amigos que yo considero mis carnales: Abraham, Eduardo, Alejandra, Zuleica, Mario, Enrique, Paco, Yazid, Erick, Claudia, Teresa, Abraham Agustín, Oscar, Nancy, Norma, Irais, Eva, Elizabeth, Malena, Rita, Luís y Penélope por hacer más excitante mi estancia en la Universidad, por los buenos momentos y por los que vendrán.**
- **A mis compañeros de laboratorio: Ivette, Martha, Ari, por todo su apoyo.**
- **A mis mentores y sinodales: Anita, Memo, Tzasna, Margarita, y Edith, gracias por el apoyo que me han demostrado a lo largo del desarrollo de la tesis, por impulsarme a lograr mis sueños, y sobre todo por su invaluable amistad, así como su tiempo, dedicación, consejos y paciencia gracias.**

AGRADECIMIENTOS

- A la máxima casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México.
- A la M en C. Ana María García Boreas por su apoyo incondicional y por el desarrollo de este trabajo, por su paciencia y por su amistad muchas gracias.
- Al Dr. Guillermo Acevedo por recibirme en el laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos y sus aportaciones en este trabajo.
- A la Dra. Tzasa Hernández, a la Dra. Margarita Canales, y a la Bióloga Edith López por su dedicación y paciencia.

“Cada historia tiene un final, pero en la vida cada final es sólo un nuevo comienzo”

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS.....	6
• Género <i>Yucca</i>	6
• <i>Yucca periculosa</i> Baker.....	7
ANTECEDENTES.....	9
HIPÓTESIS.....	11
OBJETIVOS.....	11
• Objetivos generales.....	11
• Objetivos particulares.....	11
AREA DE COLECTA DE LA PLANTA <i>Yucca periculosa</i>	12
MATERIAL Y MÉTODO.....	16
• Colecta de la planta.....	16
Extracción por maceración.....	16
Estudio fitoquímico.....	17
• Aislamiento de los principios activos.....	17
Actividad antibacteriana.....	18
• Actividad antibacteriana de forma cualitativa	18
• Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.....	20
Actividad antifúngica.....	20
• Actividad antifúngica de forma cualitativa.....	20
• Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.....	21
RESULTADOS.....	22
Colecta de la planta.....	22
Extracción por maceración.....	22

Estudio fitoquímico.....	23
• Aislamiento de los principios activos.....	23
Actividad antibacteriana.....	28
• Actividad antibacteriana de forma cualitativa de los extractos y el estilbeno metoxilado	28
• Actividad antibacteriana de forma cualitativa de las fracciones obtenidas a partir de la cc del extracto metanólico.....	30
• Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.....	31
Actividad antifúngica.....	33
• Actividad antifúngica de forma cualitativa.....	33
• Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.....	35
DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	49
PERSPECTIVAS.....	50
LITERATURA CITADA.....	51
APÉNDICE 1. Técnicas cromatográficas.....	56
APÉNDICE 2. Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer.....	57
APÉNDICE 3. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM).....	60
APÉNDICE 4. Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial.....	64
APÉNDICE 5. Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial.....	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Microorganismos empleados para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos y el estilbeno metoxilado de la corteza de <i>Y. periculosa</i>	19
Cuadro 2. Hongos que se utilizaron para la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de la corteza de <i>Y. periculosa</i>	21
Cuadro 3. Datos de Herbario Izta de la planta <i>Y. periculosa</i>	22
Cuadro 4. Rendimiento de cada uno de los extractos obtenidos de la corteza de <i>Y. periculosa</i>	23
Cuadro 5. Fraccionamiento del extracto metanólico obtenidos de la cromatografía en columna.	24
Cuadro 6. Punto de fusión de las Fracciones cristalizadas.....	25
Cuadro 7. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna del las fracciones Q y R.....	25
Cuadro 8. Punto de fusión de las fracciones cristalizadas.....	27

Cuadro 9. Actividad antibacteriana de los extractos y el estilbena metoxilado de la corteza de <i>Y. periculosa</i> .	29
Cuadro 10. Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas por la cc del extracto metanólico de la corteza de <i>Y. periculosa</i> .	30
Cuadro 11. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana de la corteza de <i>Y. periculosa</i> .	32
Cuadro 12. Actividad antifúngica de los extractos y el estilbena metoxilado de la corteza de <i>Y. periculosa</i> .	33
Cuadro 13. Inhibición del crecimiento radial de los extractos de <i>Y. periculosa</i> .	36
Cuadro 14. Inhibición del crecimiento radial del estilbena metoxilado de <i>Y. periculosa</i> .	37
Cuadro 15. Concentración fungicida media (CF ₅₀) y concentración fungicida mínima (CFM) de los extractos y el estilbena metoxilado de la corteza de <i>Y. periculosa</i> .	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Yucca periculosa</i> Baker.....	8
Figura 2. Área de distribución de la <i>Yucca periculosa</i> Baker.....	8
Figura 3. Ubicación geográfica del Valle de Tehuacan-Cuicatlán	14
Figura 4. Estructuras de los compuestos presentes en el extracto metanólico de <i>Y. periculosa</i>	27
Figura 5. Actividad antibacteriana del extracto metanólico y el estilbenu metoxilado obtenido de la corteza de <i>Y. periculosa</i>	29
Figura 6. Inhibición del crecimiento radial del estilbenu metoxilado en <i>A. niger</i>	34
Figura 7. Inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico en <i>A. niger</i>	34
Figura 8. Inhibición del crecimiento radial del estilbenu metoxilado en <i>F. moniliforme</i>	34

Figura 9. Inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico en <i>F. moniliforme</i>	34
Figura 10. Inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico de la corteza de <i>Y. periculosa</i>	37
Figura 11. Inhibición del crecimiento radial del extracto hexánico de la corteza de <i>Y. periculosa</i>	38
Figura 12. Inhibición del crecimiento radial del estilbeno metoxilado de la corteza de <i>Y. periculosa</i>	39

LISTA DE ABREVIATURA

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
cc	Cromatografía en columna abierta
C +	Control positivo
C -	Control negativo
CBM	Concentración bactericida mínima
ccf	Cromatografía en capa fina
CMI	Concentración mínima inhibitoria
MeOH	Metanol
mg/disco	Miligramos por disco
TTC	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio
UFC	Unidades formadoras de colonia
µg	Microgramos
µg/ml	Microgramos por mililitro
µg/disco	Microgramos por disco
µl	Microlitros
Sl	<i>Sarcina lutea</i>
Bs	<i>Bacillus subtilis</i>
Sa	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12938
Se	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
No. 01	<i>Vibrio cholerae</i> No. 01
Agua	<i>Vibrio cholerae</i> INDRE 2006
CC	<i>Vibrio cholerae</i> caso clínico
TOR	<i>Vibrio cholerae</i> CDC V 12
Ec	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
St	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430
Eae	<i>Enterobacter aerogenes</i>
Eag	<i>Enterobacter agglomerans</i>
Ye	<i>Yersinia enterocolitica</i>

Ca	<i>Candida albicans</i>
An	<i>Aspergillus niger</i>
Tm	<i>Trichopyton mentagrophytes</i>
Fs	<i>Fusarium sporotrichum</i>
Fm	<i>Fusarium moniliforme</i>
Rs	<i>Rhizoctonia solani</i>
Rf	Factor de referencia
p.f	Punto de fusión
- / Na	No activo

RESUMEN

Durante los últimos diez años ha surgido en el sector público y privado una búsqueda e interés, sobre el descubrimiento de nuevos productos naturales con propiedades farmacológicas. En el caso de la planta *Yucca periculosa* Baker, se ha reportado en la corteza la presencia de estilbenos entre ellos el 3, 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbeno. A estos compuestos se les confieren diversas actividades biológicas. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos y el estilbeno metoxilado obtenidos de la corteza de *Yucca periculosa*. Se llevó a cabo una extracción por maceración con metanol, a la cual, se le realizó una la partición hexánica. Se aisló el estilbeno metoxilado del extracto metanólico empleando métodos cromatográficos. La actividad antibacteriana se evaluó mediante la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer sobre 13 cepas bacterianas. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la bactericida mínima (CBM) se determinó mediante la microtécnica de dilución en caldo. La actividad antifúngica se evaluó mediante la técnica de inhibición del crecimiento radial sobre 6 cepas de hongos. La concentración fungicida mínima (CFM) y la concentración fungicida media (CF₅₀) se determinó por la técnica de dilución en agar. El estilbeno metoxilado presentó la mayor actividad antibacteriana (ocho cepas), seguida del extracto metanólico y el extracto hexánico no presentó actividad de acuerdo a los parámetros microbiológicos evaluados. El extracto metanólico (5 cepas) y el estilbeno metoxilado (4 cepas) presentaron actividad antifúngica y el extracto hexánico solo presentó actividad en la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*. En este trabajo se concluye que el extracto metanólico, el hexánico, y el compuesto estilbénico de la corteza de *Yucca periculosa* tienen actividad antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

Durante mucho tiempo las infecciones producidas por microorganismos patógenos han sido objeto de estudio debido al gran daño que estos representan a los seres humanos y a las plantas, ya que provocan infecciones que pueden considerarse como un producto inevitable de la relación huésped-parásito (Cedillo, 1997).

El ambiente puede tener microorganismos que son agentes infecciosos, de mayor peligro para los seres vivos, estos incluyen a una gran variedad de bacterias y hongos (Envangelista, 1997).

Las bacterias son consideradas de gran importancia para la salud del ser humano ya que provocan infecciones del conducto urinario, del tracto respiratorio, apendicitis, diarrea esporádica de verano, y en ocasiones enfermedades gastrointestinales por bacterias entéricas tales como: *Shigella* sp, *Salmonella* sp, *Enterobacter* sp, entre otras (Bautista, 2001). En México las dos primeras causas de mortalidad en el año 2002 fueron las infecciones de vías respiratorias y las infecciones intestinales (SSA, 2002).

Los hongos microscópicos desempeñan un papel ecológico importante como desintegradores de materia orgánica, a nivel económico se utiliza para la elaboración de bebidas alcohólicas y como alimentos para el ser humano. Por otro lado, son causantes de enfermedades de importancia médica y agronómica, producen infecciones principalmente en la piel, así como pérdidas en las cosechas. Estos microorganismos pueden invadir varios tejidos de animales y vegetales (Cedillo, 1997).

El estudio de las características propias de las enfermedades infecciosas y los medios para combatirlas ha llevado al descubrimiento de un gran número de fármacos que permiten el tratamiento de estos padecimientos. Sin embargo, por las características propias de los microorganismos como son las bacterias y hongos, estos padecimientos son difíciles de tratar y erradicar (Cedillo, 1997).

Durante los últimos diez años ha surgido en el sector público y privado una búsqueda e interés, sobre el descubrimiento de nuevos productos naturales, con propiedades farmacológicas. Lo anterior puede deberse a la desaparición de la biodiversidad, a la persistencia de viejas enfermedades y al surgimiento de nuevos padecimientos, así como a los precedentes históricos para los productos naturales como fuentes de medicinas útiles (Canales, 2000).

En la actualidad se han realizado numerosas investigaciones sobre los productos naturales y el resultado ha sido la identificación de una gran cantidad de compuestos que se han aislado de plantas (Canales, 2000). En nuestro país se encuentran cerca de 5000 a 7000 especies vegetales, éstas representan un potencial para satisfacer diferentes necesidades del hombre (Caballero, 1978).

Los principios activos son los compuestos químicos presentes en algunas plantas que las hacen útiles como medicamentos, y pueden encontrarse en todo el individuo o sólo en algunas de sus estructuras. La concentración de estas sustancias dependerá de diversos factores como la edad del organismo, el clima, la época del año, el tipo de suelo y la humedad, entre otros. Una sola planta medicinal puede tener varios principios activos, lo que indica la complejidad y riqueza bioquímica que existe en la naturaleza (Ocegueda et al., 2005).

Los metabolitos secundarios son compuestos químicos que se extraen por diferentes procedimientos. Para que una planta conserve sus propiedades medicinales se deben respetar ciertas reglas de recolección, desecación, almacenamiento y finalmente de presentación como infusión, extractos o cápsulas, entre otras (Ocegueda et al., 2005).

Entre las familias botánicas que tienen su centro de origen y diversidad en nuestro país se encuentran las *Agavaceae* (Franco, 1995). México cuenta con el 75% de las especies de esta familia conocidas a nivel mundial, siendo el 55% endémicas (García-Mendoza, 1995) y algunas de las especies de esta familia se emplean de manera tradicional en nuestro país, un ejemplo es la

especie *Agave stricta*, la cual, es usada para el tratamiento de heridas sangrantes (Canales et al., 2006), antiinflamatorios, para el dolor de oído, úlceras, golpes, disentería, dolor de corazón, o dolor de pulmón (Aguilar et al., 1994).

Algunas *Agavaceas* son elementos característicos en los paisajes de las zonas áridas y semiáridas del país, en estos ecosistemas se presentan un alto grado de endemismos (Rzedowski, 1994). Ejemplo de lo anterior son los géneros *Agave*, *Dasyllirion* y *Yucca*, los cuales, constituyen elementos dominantes de los matorrales xerófilos y en ocasiones pueden formar asociaciones casi puras (Matuda y Piña, 1980).

El género *Yucca* ha tenido un lugar preponderante en las culturas indígenas, ya que las hojas son empleadas para confeccionar cuerdas, sandalias, ropa, redes y bolsas (Matuda y Piña, 1980). El 62% de las especies del género se encuentra en México con 29 especies que habitan principalmente en las zonas áridas y semiáridas (García-Villanueva y Mark, 1997). Una especie de este género es la *Yucca periculosa* Baker pertenece a la familia *Agavaceae* dentro del orden *Aspargales* de la clase *Liliopsida* (Sitte et al., 2002).

Torres et al., (2003), realizaron un estudio de la corteza de *Y. periculosa*, de la cual, aislaron tres estilbenos. Se ha reportado que estos compuestos juegan un papel importante en las plantas ya que les sirven como un mecanismo de defensa. Además, en otros estudios se les consideran como agentes que pueden tener efectos benéficos en el ser humano, ya que pueden evitar el desarrollo de cáncer y de enfermedades cardiovasculares. Estos compuestos, también tienen actividad antioxidante y se proponen como posible tratamiento en problemas antimicrobianos y antifúngicos (Piacente et al., 2002; Serazetdinova et al., 2005).

Existe una gran aplicación los compuestos de origen vegetal para remediar algunos padecimientos como es el caso de los estilbenos. Debido al interés de profundizar el conocimiento de las especies vegetales que puedan ser una

alternativa terapéutica para la población, en este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica, del estilbeno metoxilado y de la corteza de *Y. periculosa* (Izote).

Planeamiento del problema

Durante los últimos diez años ha surgido en el sector público y privado una búsqueda e interés, sobre el descubrimiento de nuevos productos naturales con propiedades farmacológicas. En el caso de la planta *Yucca periculosa* Baker, se ha reportado en la corteza la presencia de estilbenos entre ellos el 3, 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbeno. A estos compuestos se les confieren diversas actividades biológicas.

ANTECEDENTES

- **Estudios de la especie *Yucca periculosa***

En 1997, se analizó la ontogenia de la semilla de *Y. periculosa*, encontrando que hacia la madurez, desaparecen los derivados del tegumento interno ocasionando la fusión de la cutícula tegumentaria con la tegmen-nucelar. Este estudio aportó información de la ontogenia de la planta debido a la persistencia de las cutículas internas en *Y. periculosa* aún cuando el tejido que las originó hubiera desaparecido (García-Villanueva y Mark, 1997).

Torres et al., (2003) realizaron un estudio de la corteza de *Y. periculosa*, en la cual, se aislaron tres estilbenos, el trans-4, 4'-dihidroxiestilbeno, el trans-3, 4', 5-trihidroxiestilbeno (resveratrol) y trans-3, 3', 5, 5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno (estilbeno metoxilado). Se ha reportado que estos compuestos juegan un papel importante en las plantas ya que les sirven como un mecanismo de defensa contra el ataque de insectos.

- **Estudios realizados al grupo de los estilbenos**

Oleszek et al., (2001) realizaron un estudio del resveratrol y otros fenoles de la corteza de *Yucca schidigera* Roezl, donde aislaron y elucidaron la estructura de cinco constituyentes fenólicos de la corteza y su estructura. Estos compuestos incluyen a dos estilbenos conocidos (resveratrol y trans 3, 3', 5, 5'-tetrahidroxi-4 metoxi estilbeno) y tres compuestos novedosos, los yuccaoles A, B y C, con spiro estructuras que son poco recurrentes en el reino vegetal.

Piacente et al., (2002) realizaron un estudio de un nuevo derivado estilbénico con estructura fenólico spiro, la Yuccaona A en la corteza de la *Y. schidigera*. También se determinaron dos nuevas estructuras (yuccaoles D y E) aislados del extracto metanólico de la corteza.

Chan (2002) realizó un estudio del efecto antimicrobiano del resveratrol aplicado en hongos dermatofitos (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporum gypseum*) y en varias bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, y *Pseudomonas aeruginosa*). En este estudio se propone una nueva aplicación para el resveratrol, el cual, es conocido como una molécula de defensa de las plantas.

Serazetdinova et al., (2005) realizaron un trabajo sobre la síntesis de los estilbenos en trigo. En esta investigación se demostró que la presencia del resveratrol confiere una resistencia mejorada contra algunos patógenos. Los derivados acumulados del estilbeno tienen un efecto inhibitorio directo en *Puccinia recondita* y *Septoria nodorum* Berk y puede inducir o intensificar los mecanismos de defensa endógena. Este trabajo aporta un nuevo uso de los estilbenos, a los cuales se les atribuyen propiedades antioxidantes, antimutagénicas y antiinflamatorias.

El resveratrol ha sido uno de los compuestos más estudiados en la actualidad y se ha comprobado su actividad antimicrobiana, es por ello, que nos planteamos la siguiente pregunta si el estilbeno metoxilado es un derivado estructural del resveratrol es probable que el estilbeno metoxilado tenga actividad antimicrobiana.

HIPÓTESIS

Los estilbenos son compuestos que presentan actividad antimicrobiana y antifúngica, se ha reportado la presencia de este tipo de metabolitos en la corteza de *Y. periculosa*, por lo que es probable, que tanto el estilbeno metoxilado (3, 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbeno) como los extractos de la corteza de *Y. periculosa* tengan dicha actividad.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de la corteza de *Y. periculosa* (Izote).

Objetivos particulares

1. Obtener los extractos de la corteza de *Y. periculosa* con diferentes solventes (metanol y hexano).
2. Aislar el 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbeno (estilbeno metoxilado), así como otros componentes del extracto metanólico.
3. Determinar la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos herbales y el estilbeno metoxilado de acuerdo a la técnica de difusión en agar.
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos y el estilbeno metoxilado.
5. Determinar la concentración fungicida mínima (CFM), y la concentración fungicida media (CF₅₀) de los extractos activos y del estilbeno metoxilado.

MATERIAL Y METODOS

❖ **Colecta de la planta**

Para la realización de este trabajo se utilizó la corteza de la planta *Y. periculosa*, colectada en la localidad de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, en el mes de septiembre del 2004. Las coordenadas geográficas de la localidad fueron de 18° 24.688´ de latitud norte y 97° 25.807´ de longitud oeste y una altitud de 1780.946 m.

Se entregó un ejemplar (flores y hojas) en el laboratorio de Recursos Naturales de la UBIPRO para su identificación, y posteriormente el ejemplar fue depositado en el herbario Izta de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

El material vegetal (4 Kg) se puso a secar a la sombra y se trituro con un molino manual.

❖ **Extracción por maceración**

Se pesaron 4 Kg de corteza seca y molida, se maceró en un garrafón de vidrio con capacidad de 20 litros. Con este procedimiento se llevó a cabo la extracción por maceración de la corteza de *Y. periculosa* con metanol. Una vez obtenido el extracto se filtró, posteriormente se destiló el exceso del solvente a presión reducida en un rotavapor hasta concentrar los sólidos para obtener el extracto metanólico, el cual, fue sometido a un lavado con hexano para obtener así una partición hexánica.

Los extractos (metanólico y hexánico) se colocaron en recipientes de vidrio con la finalidad de completar la evaporación del solvente. El contenido de sólidos de cada uno de los extractos se calculó mediante diferencia de peso.

❖ **Estudio Fitoquímico**

▪ **Aislamiento de los principios activos**

Para la separación y el aislamiento del estilbeno metoxilado y otros componentes principales del extracto, se utilizaron las técnicas cromatográficas de placa fina y de columna (Apéndice 1).

Al extracto metanólico (133g) se le realizó una cromatografía en columna (cc), usando como fase estacionaria sílica gel con una malla de 60; como fase móvil se utilizaron mezclas de cloroformo-metanol, incrementando gradualmente la polaridad. Se obtuvieron un total de 125 alícuotas de 250 ml, las cuales, se sometieron a una ccf con la finalidad de agrupar aquellas que fueron similares por lo que se obtuvieron un total de 24 fracciones.

La identidad de los compuestos aislados en la (o las) cc se llevó a cabo al comparar los perfiles cromatográficos del factor de referencia (Rf) el cual, se mide de acuerdo con la relación entre la distancia recorrida por la mancha del compuesto, dividida por la distancia recorrida por el frente del solvente a partir de la marca de inicio. También se comparó el espectro de absorción en UV (200 a 400 nm) con los obtenidos por García (en proceso).

Con el fin de identificar la presencia del estilbeno metoxilado y resveratrol reportado por Torres et al., (2003) el desarrollo de la cc fue monitoreada mediante diversas ccf empleando como patrón estas sustancias. Además se empleó también la naringenina aislada por García (en proceso).

❖ **Actividad antibacteriana**

▪ **Actividad antibacteriana de forma cualitativa**

La actividad antibacteriana de los extractos y el estilbeno metoxilado se evaluó mediante el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Van den Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 2). Cada disco se impregnó con 2 mg de cada

extracto (metanólico y la partición hexánica) y 0.5 mg del estilbeno metoxilado y las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna. Se utilizó como control positivo cloramfenicol (25 µg/disco). Como controles negativos se usaron discos impregnados con 10 µl de cada uno de los solventes utilizados. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Microorganismos utilizados

Se utilizaron 12 cepas bacterianas de importancia médica para determinar la actividad antibacteriana (Cuadro 1).

Cuadro 1. Microorganismos empleados para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos y el estilbeno metoxilado de la corteza de *Y. periculosa*.

BACTERIAS	GRAM
* <i>Sarcina lutea</i> (Sl)	+
<i>Bacillus subtilis</i> (Bs)	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12938 (Sa)	+
* <i>Staphylococcus epidermidis</i> (Se)	+
* <i>Vibrio cholerae</i> No. 01(No. 01)	-
<i>Vibrio cholerae</i> INDRE 2006 (Agua)	-
<i>Vibrio cholerae</i> caso clínico (CC)	-
* <i>Vibrio cholerae</i> CDC V 12 (TOR)	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (Ec)	-
<i>Salmonella typhi</i> ATCC 19430 (St)	-
<i>Enterobacter agglomerans</i> (Eag)	-
<i>Enterobacter aerogenes</i> (Eae)	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> (Ye)	-

* Microorganismos bacterianos empleados en la evaluación cualitativa de las fracciones de la cromatografía en columna de la corteza de *Y. periculosa*.

Cabe mencionar que sólo se utilizaron 4 cepas bacterianas para evaluar de forma cualitativa las fracciones de la cromatografía en columna de la corteza de *Y. periculosa*, debido a su importancia médica y a la sensibilidad que mostraron ante el extracto metanólico (Cuadro 1).

Análisis estadístico

Para analizar los resultados del método de difusión en agar de Kirby-Baüer se utilizó un análisis de varianza bifactorial (ANOVA) realizado en el software estadístico V. 5.

▪ Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana

La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos y el estilbeno metoxilado, se determinó mediante la microtécnica de dilución en caldo (Koneman et al., 1985). Las concentraciones que se evaluaron para los extractos fueron 0.062, 0.125, 0.25, 0.50, 1.0 y 2.0 mg/ml; y para el estilbeno metoxilado las concentraciones fueron 0.062, 0.125, 0.25 y 0.50 mg/ml. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 3).

❖ Actividad antifúngica

▪ Actividad antifúngica de forma cualitativa

La actividad antifúngica se evaluó mediante el método de inhibición del crecimiento radial. Los discos se impregnaron con 2 mg de cada extracto y 0.5 mg de estilbeno metoxilado (3, 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbeno). Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 4) (Wang y Bun, 2002).

Microorganismos utilizados

Se utilizaron 6 especies de hongos de importancia médica y agronómica (Cuadro 2).

Cuadro 2. Hongos que se utilizaron para la evaluación cualitativa de la corteza de *Y. periculosa*.

HONGOS

* *Candida albicans* (Ca)

** *Aspergillus niger* (An)

* *Trichophyton mentagrophytes* (Tm)

** *Fusarium sporotrichum* (Fs)

** *Fusarium moniliforme* (Fm)

** *Rhizoctonia solani* (Rs)

* Hongos con importancia médica

** Hongos con importancia fitopatógena

▪ Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los extractos y el estilbenu metoxilado, se obtuvo mediante la técnica de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Se determinó la concentración fungicida media (CF₅₀) y concentración fungicida mínima (CFM) de los extractos y el estilbenu metoxilado. Las concentraciones empleadas para los extractos fueron: 0.062, 0.125, 0.25, 0.50, 1.0 y 2.0 mg/ml y para el estilbenu metoxilado las concentraciones empleadas fueron las siguientes: 0.062, 0.125, 0.25 y 0.50 mg/ml (Apéndice 5). Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

RESULTADOS

❖ Colecta de la planta

La planta *Y. periculosa* (Izote) fue colectada durante el mes de septiembre del 2004, en la localidad de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Los datos generales del ejemplar en el herbario Izta, se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Datos del Herbario Izta de la planta *Y. periculosa*.

Nombre científico	<i>Yucca periculosa</i> Baker
Nombre común	Izote
Número de registro	27516

❖ Extracción por maceración

En la cuadro 4, se observa el rendimiento (contenido de sólidos totales expresado en porcentaje) del extracto metanólico y la partición hexánica obtenidos de la corteza de *Y. periculosa*.

El extracto que obtuvo mayor rendimiento fue el extracto metanólico con 313.09 g (7.827%). El menor rendimiento fue para el extracto hexánico con 3.04 g (0.076%). Estos resultados indican que la *Y. periculosa* presenta una mayor cantidad de compuestos polares.

Cuadro 4. Rendimiento de cada uno de los extractos obtenidos de la corteza de *Y. periculosa*.

Extractos	Rendimiento (g)	%
Extracto metanólico	313.09	7.827
Extracto hexánico	3.04	0.076

* Rendimiento obtenido a partir de 4 Kg de la corteza.

❖ **Estudio Fitoquímico**

▪ **Aislamiento de los principios activos**

A partir del extracto metanólico se realizó una cromatografía en columna (cc). Se eligió este, debido a lo reportado por Torres et al., (2003) en donde se menciona la presencia del estilbeno metoxilado (3, 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbeno).

En el cuadro 5 se muestra las fracciones obtenidas del extracto metanólico a partir de la cc. Se pueden observar también las mezclas de solventes de distinta polaridad usadas como fase móvil, el rendimiento y los compuestos aislados.

Cuadro 5. Fraccionamiento del extracto metanólico obtenidos de la cc.

Solvente	Alícuota	Facción	Rendimiento (g)	Compuestos aislados
Cloroformo	1	A	0.0798	
Cloroformo-	2-11	B	0.1774	
MeOH 98:2	12-27	C	0.0916	
Cloroformo-	28-36	D	0.0467	
MeOH 95:5	37-49	E	1.350	
Cloroformo-	50-52	F	0.5319	
MeOH 93:7	53-61	G	0.1571	
Cloroformo-	62-65	H	0.1860	Naringenina
MeOH 9:1	66-68	I	0.0655	
	69-70	J	0.0927	Naringenina
	71-72	K	0.0119	
	73-74	L	0.0153	
	75	M	0.0004	
	76-77	N	0.2061	
	78	O	0.0881	
	79	P	0.4018	
	80-81	Q	2.0618	* Estilbenos
	82-85	R	4.3243	* Estilbenos
	86-90	S	4.0747	
Cloroformo-	91-99	T	12.0164	
MeOH 8:2				
Cloroformo-	100-107	U	24.7708	
MeOH 7:3				
Cloroformo-	108-111	W	23.8772	Posible presencia de taninos u otros compuestos fenólicos
MeOH 6:4	112-113			
	114			
	115-121			
	122-125			

* Presencia de estilbenos.

En las fracciones H y J (Cuadro 5) se identificó la presencia de naringenina, de acuerdo con el factor de referencia (0.3428) el cual, coincide con la muestra aislada por García (en proceso). Para corroborar la presencia de este compuesto se midió el espectro de absorción de la región del UV (200 a 400 nm) de 237 y 305 λ_{\max} que coincide con lo reportado por García (en proceso) y por último el punto de fusión (p.f) (Cuadro 6) mostrando la presencia de impurezas provocando una variación en el p.f ya que, según el patrón de Torres et al., (2003) el p.f de la naringenina se encuentra entre los 223-225 °C.

Cuadro 6. Punto de fusión de las fracciones cristalizadas.

Fracción	Punto de fusión (°C)
* H	260
* J	265

*Presencia de naringenina.

A las fracciones Q y R del extracto metanólico se les realizó una ccf, las cuales, mostraban la presencia del estilbeno metoxilado (de acuerdo con el patrón de Torres et al., 2000). Debido a lo anterior se reunieron, con el propósito de aislar este compuesto se sometieron a otra cc. Las fracciones obtenidas se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Fracciones obtenidas por cromatografía en columna del las fracciones Q y R.

Solvente	Alícuota	Facción	Rendimiento (g)	Compuestos aislados
Cloroformo	1	I	0.0266	
	2-5	II	0.0682	
	6-13	III	0.0823	
Cloroformo-MeOH 95:5	14-15	IV	0.0112	
	16-24	V	0.1025	
Cloroformo-MeOH 90:10	25-27	VI	0.0193	
	28-30	VII	0.0047	Naringenina y Resveratrol Resveratrol
	31-37	VIII	0.0726	
	38-43	IX	0.2916	
	44	X	0.0250	
	45-47	XI	0.6521	
	48-55	XII	0.3430	Estilbeno metoxilado
	56-57	XIII	0.3432	
	58-69	XIV	1.2073	Estilbeno metoxilado
	70	XV	0.3306	
Cloroformo-MeOH 80:20	71-86	XVI	0.4136	Posible presencia de Taninos
Cloroformo-MeOH 70:30	87-91	XVII	0.1055	
	92	XVIII	0.0006	
Cloroformo-MeOH 50:50	93-98	XIX	0.0960	
	99-103	XX	0.0427	
	104-106	XXI	0.0126	
MeOH	107-109	XXII	0.0920	
	110	XXIII	0.0338	
	111-113	XXIV	0.3866	

Del fraccionamiento cromatográfico (Q y R) se obtuvieron 24 (XXIV) fracciones. Cabe mencionar que en algunas de éstas, se detectó la presencia de cristales. Con la finalidad de identificar que compuestos estaban presentes en las fracciones se realizó una ccf y se determinó el R_f, empleando los patrones de Torres et al., (2003) y García (en proceso), también se compararon los espectros de absorción en UV (200 a 400 nm) y el p.f.

En la fracción VII (Cuadro 7) se identificó la presencia de naringenina y resveratrol, de acuerdo con el R_f, el cual, se registro en 0.3571 para la naringenina y 0.1785 para el resveratrol, lo cual, coincide con las muestras aisladas por García (en proceso).

En la fracción VIII (Cuadro 7) se determinó la presencia de resveratrol. El R_f de la muestra (0.1785) concuerda con el patrón obtenido por García, en proceso. Cabe mencionar que el espectro de absorción en la región del UV (200 a 400 nm) fue de 220, 305 y 320 λ_{max} y también coincide con la muestra auténtica de García. En lo referente al p.f. (Cuadro 8) se observaron variaciones con respecto a lo reportado por Torres et al., 2003 debido a la presencia de impurezas.

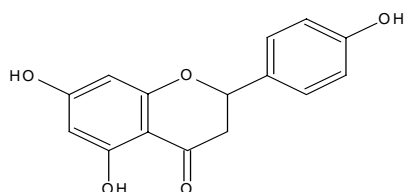
En la fracción XII y XIV se identificó la presencia del estilbeno metoxilado (3, 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbeno) debido a que el R_f de la muestra 0.2 concuerda con la muestra aislada por García (en proceso). Para corroborar lo anterior, se determinó el espectro de absorción de la región del UV (228 y 316 λ_{max}), el cual también concuerda con lo reportado por García en proceso. Por último, se midió el p.f (Cuadro 8), el cual varía con respecto a lo publicado por Torres et al., 2003 debido a la presencia de impurezas. El rendimiento de las fracciones con presencia de estilbeno metoxilado (3,5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbeno) fue de 1.5503g.

Por último en las fracciones W y XVI, es probable que contengan taninos u otros compuestos fenólicos, debido a que fue positivo a la reacción de cloruro férrico, y forman películas.

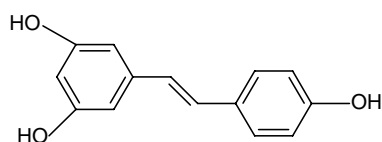
Cuadro 8. Punto de fusión de las fracciones cristalizadas

Fracción	Punto de fusión (°C)	Compuestos determinados
VIII	175-180	Resveratrol
XII	170	Estilbeno metoxilado
XVI	180	Estilbeno metoxilado

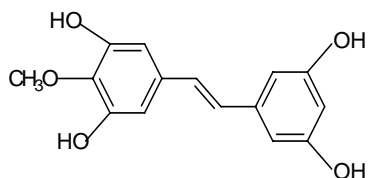
En la figura 4, se muestran las estructuras de los compuestos aislados de la corteza de *Y. periculosa* mediante la cc del extracto metanólico: la naringenina y el resveratrol, así como el estilbeno metoxilado.



Naringenina



trans-3, 4', 5-trihidroxiestilbeno (Resveratrol)



trans-3, 3', 5, 5'-tetrahidroxi-4-metoxiestilbeno (Estilbeno metoxilado)

Figura 4. Estructuras de los compuestos presentes en el extracto metanólico de *Y. periculosa*.

❖ **Actividad antibacteriana**

- **Actividad antibacteriana de forma cualitativa de los extractos y el estilbano metoxilado (3, 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbano)**

En el cuadro 9, se muestra los halos de inhibición de los diferentes extractos y el estilbano metoxilado, obtenidos de la corteza de *Y. periculosa* sobre las diferentes cepas bacterianas. Se determinó que el extracto hexánico no presentó actividad sobre los diferentes microorganismos, mientras que el extracto metanólico y el estilbano metoxilado presentaron actividad antibacteriana.

Cuadro 9. Actividad antibacteriana de los extractos y el estilbano metoxilado de la corteza de *Y. periculosa*.

Bacterias	Halos de inhibición (mm)				
	Extracto hexánico 2 mg/disco	Extracto metanólico 2 mg/disco	Estilbano metoxilado 0.5 mg/disco	C (-) MeOH	C (+) 30 µg/disco
Sl	Na	13.7 ± 1.5	Na	Na	23 ± 0.5
Bs	Na	12.0 ± 1.0	Na	Na	16 ± 0.5
Sa	Na	Na	Na	Na	19 ± 0.5
Se	Na	12.3 ± 0.6	14.6 ± 0.6	Na	17 ± 0.5
No 01	Na	13.7 ± 2.0	15.6 ± 2.0	Na	30 ± 0.5
Agua	Na	13.6 ± 1.5	16.0 ± 1.0	Na	27 ± 0.5
CC	Na	13.0 ± 1.0	14.0 ± 1.7	Na	16 ± 0.5
TOR	Na	15.0 ± 0.0	15.0 ± 0.0	Na	29 ± 0.5
Ec	Na	Na	8.3 ± 0.6	Na	16 ± 0.5
St	Na	Na	7.3 ± 0.6	Na	25 ± 0.5
Eag	Na	Na	Na	Na	23 ± 0.5
Eae	Na	Na	Na	Na	24 ± 0.5
Ye	Na	8.7 ± 1.5	10.0 ± 1.5	Na	15 ± 0.5

* Na= no activo, * C (+)= Cloramfenicol Halos de inhibición en mm.

Sarcina lutea (Sl), *Bacillus subtilis* (Bs), *Staphylococcus aureus* ATCC 12938 (Sa), *Staphylococcus epidermidis* (Se), *Vibrio cholerae* No. 01 (No. 01), *Vibrio cholerae* INDRE 2006 (Agua), *Vibrio cholerae* caso clínico (CC), *Vibrio cholerae* CDC V 12 (TOR), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Ec), *Salmonella typhi* ATCC 19430 (St), *Enterobacter agglomerans* (Eag), *Enterobacter aerogenes* (Eae), *Yersinia enterocolitica* (Ye).

En la figura 5, se muestra la actividad antibacteriana del extracto metanólico, el estilbano metoxilado y el control positivo (cloramfenicol). Con la finalidad de determinar si existía diferencia significativa entre las actividades antibacterianas se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) bifactorial ($P < 0.05$). El análisis de varianza mostró que si existen diferencias entre los tratamientos. La mayor actividad fue del cloramfenicol, seguida del estilbano metoxilado y por último el extracto metanólico.

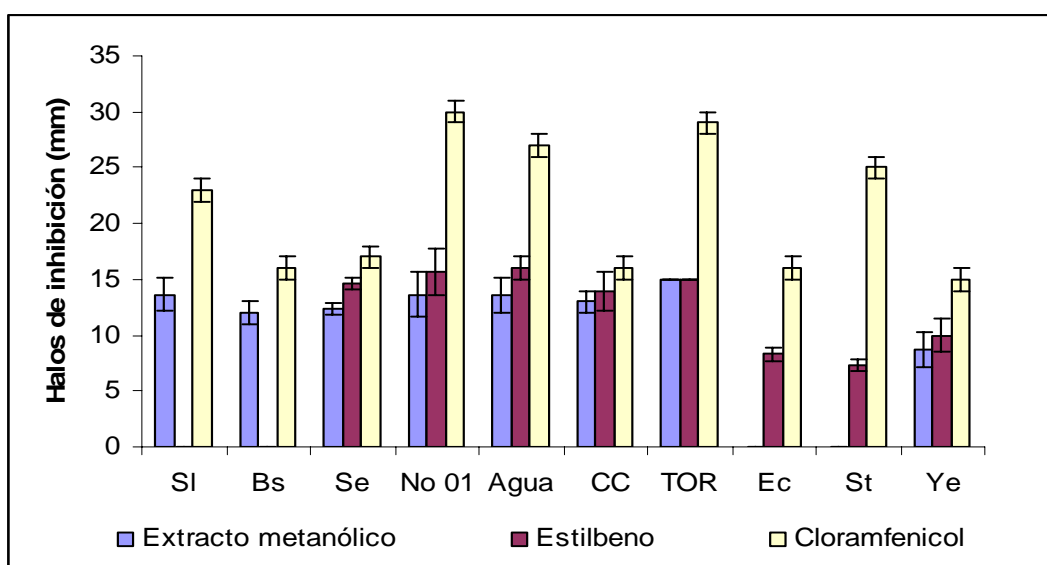


Figura 5. Actividad antibacteriana del extracto metanólico y el estilbano metoxilado obtenido de la corteza de *Y. periculosa* y el control positivo (cloramfenicol).

▪ **Actividad antibacteriana de forma cualitativa de las fracciones obtenidas a partir de la cc del extracto metanólico**

Se valoró la actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas de la cc. Cabe mencionar que sólo se evaluaron en 4 cepas bacterianas debido al bajo rendimiento de las fracciones. Se empleó una concentración de 0.5 mg/disco de cada fracción contra dos cepas gram negativas (*V. cholerae* No. 01 y *V. cholerae* CDC V 12 TOR) y dos gram positivas (*S. lutea* y *S. epidermidis*). Los resultados

obtenidos de la actividad antibacteriana de las fracciones se muestran en el cuadro 10.

La mayor actividad antibacteriana se obtuvo en las fracciones D, E, P, S y T, ya que presentaron un halo de inhibición mayor de 16 mm, y de acuerdo con la identificación de los componentes del extracto, la fracción Q y R se encontró la presencia de estilbenos. En cuanto a las fracciones donde se aislaron los compuestos obtenidos de la cc, se obtuvo una inhibición máxima de 12 mm.

Cuadro 10. Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas por la cromatografía en columna del extracto metanólico de la corteza de *Y. periculosa*.

Fracciones	TOR	Halos de Inhibición (mm)			Compuestos aislados
		No. 01	SI	Se	
A	15	10	11	10	
B	Na	Na	Na	Na	
C	7	8	11	13	
D	17	13	20	20	
E	10	11	20	18	
F	Na	Na	11	Na	
G	Na	8	8	Na	
H	9	12	Na	8	Naringenina
J	Na	Na	8	Na	Naringenina
L	7	8	14	11	
N	12	7	10	9	
O	9	10	10	Na	
P	16	12	20	11	
Q	15	11	20	15	Presencia de estilbenos
R	15	11	20	11	Presencia de estilbenos
S	13	11	20	12	
T	18	17	23	20	
U	11	8	15	18	
W	Na	Na	10	Na	Taninos o compuestos fenólicos

Na= no activa.

Vibrio cholerae CDC V 12 (TOR), *Vibrio cholerae* No. 01, *Sarcina lutea* y *Staphylococcus epidermidis*.

- **Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana**

Los resultados obtenidos de la determinación de los parámetros microbiológicos de la CMI y la CBM se muestran en el cuadro 11.

El estilbena metoxilado fue más activo que el extracto metanólico, debido a que presentó actividad antibacteriana ante las cepas de *S. epidermidis*, *V. cholerae* No.01, *V. cholerae* Agua y *V. cholerae* caso clínico y requirió de menores concentraciones (0.12-0.5 mg/ml) para inhibir el crecimiento bacteriano.

Por otro lado, el extracto metanólico es menos activo ante las cepas *V. cholerae* TOR, *V. cholerae* CC, *V. cholerae* Agua, *V. cholerae* No. 01, *S. lutea*, *S. epidermidis*, *B.subtilis* y *Y. enterocolitica*, ya que requirieron de concentraciones mayores de 0.5 mg/ml para inhibir el crecimiento bacteriano.

Cuadro 11. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana de la corteza de *Y. periculosa*.

Bacterias	Extracto metanólico		Cloramfenicol	
	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)
Sl	0.50	2.00	0.002	0.004
Ye	1.00	2.00	0.004	0.005
Bs	0.50	1.00	0.002	0.004
Se	0.25	0.50	0.002	0.004
Agua	1.00	2.00	0.001	0.002
No.01	1.00	2.00	0.001	0.002
CC	0.50	2.00	0.001	0.002
TOR	0.50	2.00	0.001	0.002
Bacterias	Estilbeno metoxilado		Cloramfenicol	
	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)
Ec	0.25	>0.5	0.001	0.002
St	0.25	>0.5	0.002	0.004
Ye	0.50	0.5	0.004	0.005
Se	0.12	0.5	0.002	0.004
No. 01	0.12	0.5	0.001	0.002
Agua	0.12	>0.5	0.001	0.002
TOR	0.25	0.5	0.001	0.002
CC	0.12	>0.5	0.001	0.002

* *Sarcina lutea* (Sl), *Bacillus subtilis* (Bs), *Staphylococcus epidermidis* (Se), *Vibrio cholerae* No. 01 (No. 01), *Vibrio cholerae* INDRE 2006 (Agua), *Vibrio cholerae* caso clínico (CC), *Vibrio cholerae* CDC V 12 (TOR), *Escherichia coli* ATCC 25922 (Ec), *Salmonella typhi* ATCC 19430 (St), *Yersinia enterocolitica* (Ye).

❖ Actividad antifúngica

▪ Actividad antifúngica de forma cualitativa

Se determinó la actividad antifúngica del extracto metanólico, la partición hexánica y el estilbeno metoxilado, obtenidos de la corteza de *Y. periculosa*. Los resultados se muestran en el cuadro 11. Se puede observar que el extracto hexánico sólo presentó actividad en la cepa de *T. mentagrophytes*. El extracto metanólico y el estilbeno metoxilado fueron activos sobre algunas cepas de hongos (*A. niger*, *F. sporotrichum*, *F. moniliforme*, *R. solani*, y *T. mentagrophytes*). Los extractos y el estilbeno metoxilado, no presentaron actividad antifúngica ante la cepa de *C. albicans*.

Cuadro 12. Actividad antifúngica de los extractos y el estilbeno metoxilado de la corteza de *Y. periculosa*.

Hongos	Extracto metanólico (2 mg/ml)	Extracto hexánico (2mg/ml)	Estilbeno metoxilado (0.5 mg/ml)
* <i>Candida albicans</i>	Na	Na	Na
** <i>Aspergillus niger</i>	✓	Na	✓✓
* <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	✓	✓	Na
** <i>Fusarium sporotrichum</i>	✓	Na	✓✓
** <i>Fusarium moniliforme</i>	✓	Na	✓✓
** <i>Rhizoctonia solani</i>	✓	Na	✓✓

Resultados obtenidos a partir de tres repeticiones. Na = no activo ✓ Con actividad ✓ ✓ Mayor actividad * Importancia médica ** Importancia fitopatógica.

En las figuras 6-9 se puede observar la inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico y el estilbeno metoxilado en las cepas fúngicas *A. niger* y *F. moniliforme*. En el caso de los extractos la inhibición no es tan marcada comparada con el estilbeno metoxilado, sin embargo, se puede apreciar una disminución del crecimiento radial en las cepas cercano a los sensidiscos.

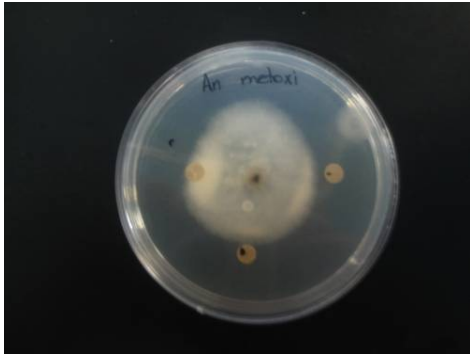


Figura 6. Inhibición del crecimiento radial del estilbano metoxilado en *A. niger*.

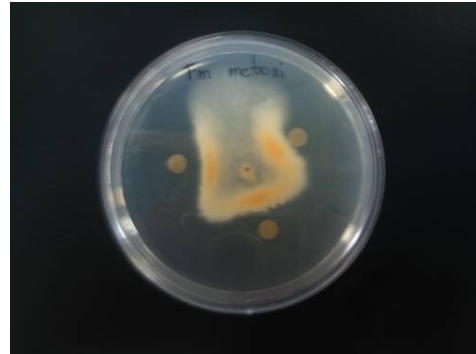


Figura 8. Inhibición del crecimiento radial del estilbano metoxilado en *F. moniliforme*.



Figura 7. Inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico en *A. niger*.



Figura 9. Inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico en *F. moniliforme*.

- **Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica**

En los cuadros 13-14, se muestra la actividad antifúngica de los extractos y el estilbeno metoxilado obtenidos de la corteza de *Y. periculosa* sobre las diferentes cepas fúngicas (inhibición del crecimiento radial).

El estilbeno metoxilado presentó mayor actividad antifúngica con concentraciones menores de 0.5 mg/ml, que los extractos ya que requirieron de concentraciones mayores de 2 mg/ml para inhibir el crecimiento radial.

Cuadro 13. Inhibición del crecimiento radial de los extractos de *Y. periculosa* (%).

		Porcentaje de inhibición (%)					
Cepas		Concentración (mg/ml) de los extractos					
		0.0625	0.125	0.250	0.50	1	2
Extracto metanólico	An	0	0	25 ± 17.6	33.3 ± 2.9	39.5 ± 5.8	50 ± 0.0
	Tm	0	37.5 ± 5.1	54.1 ± 5.8	75 ± 0.0	93.7 ± 0.0	100 ± 0.0
	Fs	0	0	0	39.5 ± 2.9	41.6 ± 5.8	75 ± 0.0
	Fm	0	14.5 ± 0.0	35.4 ± 2.9	37.5 ± 10.2	41.6 ± 5.8	50 ± 0.0
	Rs	0	29.1 ± 5.8	41.6 ± 7.7	68.7 ± 0.0	70.8 ± 2.9	79.1 ± 2.9
Extracto hexánico	Tm	12.5±0.28	62.5 ± 0.1	66.6 ± 0.0	75 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0

Cuadro 14. Inhibición del crecimiento radial del estilbeno metoxilado de *Y. periculosa*.

		Porcentaje de inhibición (%)			
Cepas	Concentración (mg/ml) de los extractos				
		0.0625	0.125	0.250	0.50
Estilbeno metoxilado	Fs	0	0	18.7 ± 0.0	100 ± 0.0
	Fm	45.6 ± 0.1	56.2 ± 0.0	58.1 ± 0.2	100 ± 0.0
	Rs	0	0	0	21.8 ± 0.1
	An	0	0	0	25 ± 0.1

En la figura 10, se observa que el extracto metanólico inhibió el 100% del crecimiento radial en la cepa *T. mentagrophytes* (Tm) a la concentración de 2 mg/ml. A diferencia de lo anterior en las cepas *F. moniliforme* (Fm) y *A. niger* (An), el extracto metabólico sólo inhibió el 50% del crecimiento a la concentración de 2 mg/ml.

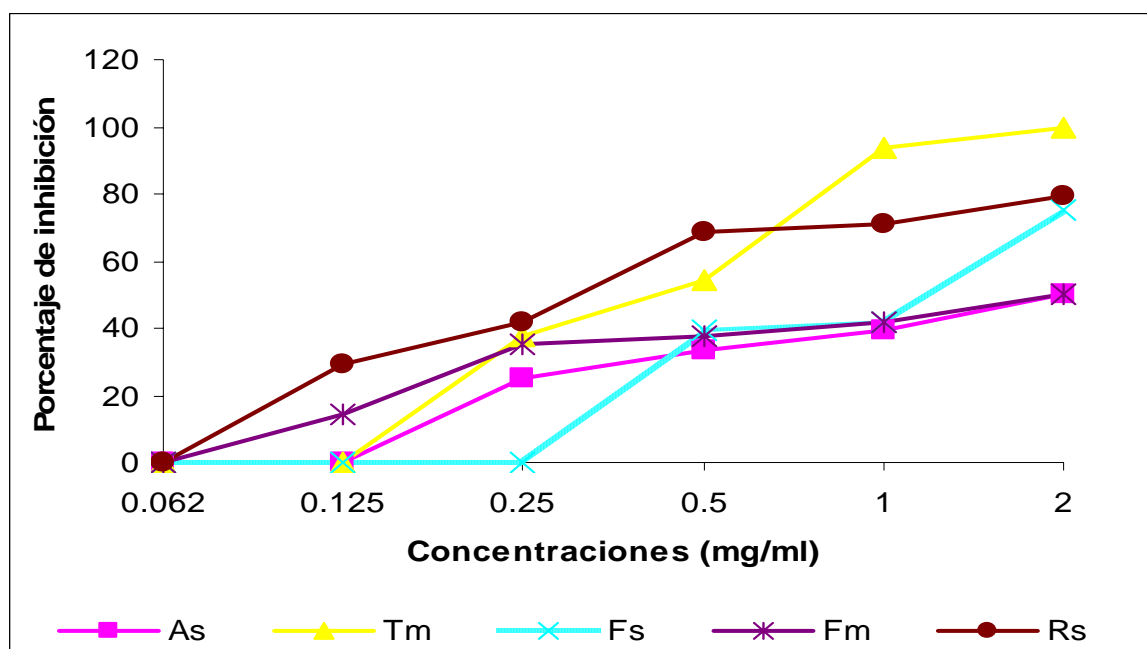


Figura 10. Inhibición del crecimiento radial del extracto metanólico de la corteza de *Y. periculosa*.

En la figura 11, se observa la inhibición del crecimiento radial del extracto hexánico en un 100% a partir de una concentración de 1 mg/ml en la cepa de *T. mentagrophytes* (Tm).

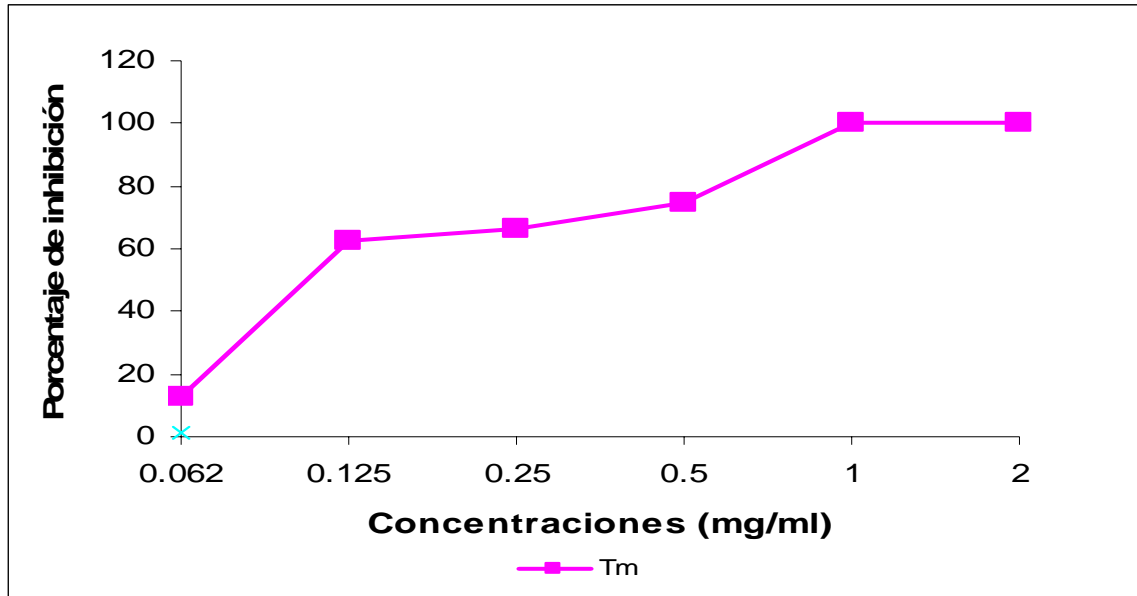


Figura 11. Inhibición del crecimiento radial del extracto hexánico de la corteza de *Y. periculosa*.

En la figura 12, se puede observar que el estilbено metoxilado inhibió el 100% de crecimiento radial a la concentración de 0.5 mg/ml, en las cepas de *F. sporotrichum* (Fs) y *F. moniliforme* (Fm). A diferencia de lo anterior, las cepas menos sensibles fueron *A. niger* (An) con el 25% a una concentración de 0.5 mg/ml y *R. solani* (Rs) sólo inhibió en 21.8% a una concentración de 0.5 mg/ml.

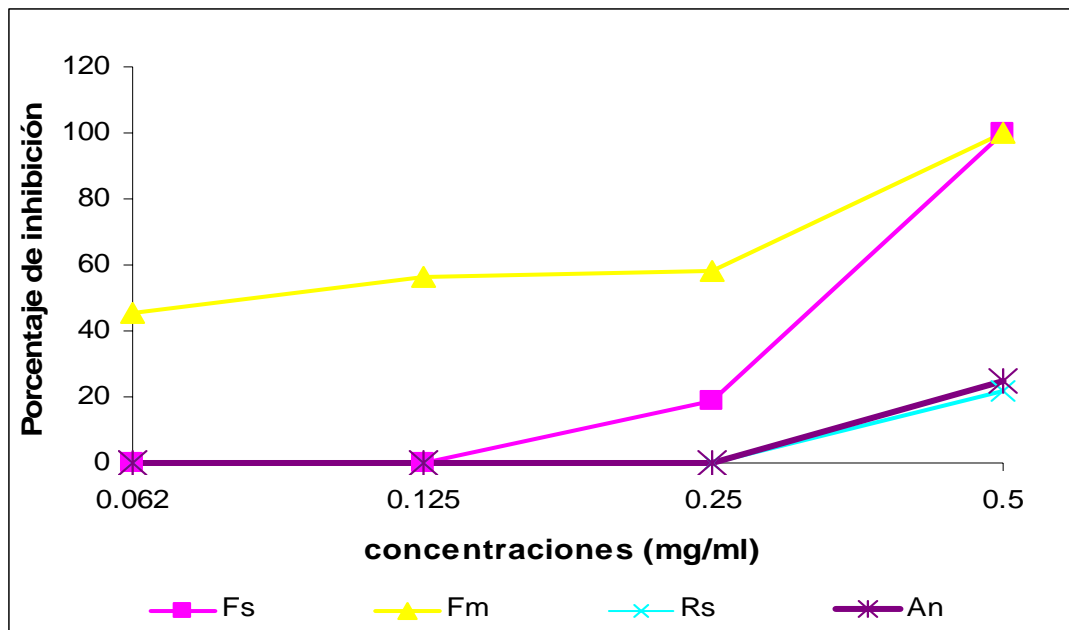


Figura 12. Inhibición del crecimiento radial del estilbano metoxilado de la corteza de *Y. periculosa*.

En el cuadro 15 se observa la CF_{50} y la CFM calculadas a partir del análisis de las tendencias obtenidas de las gráficas anteriores, se realizó un ajuste lineal y una ecuación logarítmica, según el tipo de gráfico obtenido de la inhibición del crecimiento radial y la CFM de los extractos y el estilbano metoxilado.

En la CFM del extracto metanólico las cepas que requirieron de mayores concentraciones (2 mg/ml) fueron *R. solani*, *F. sporotrichum*, *F. moniliforme* y *A. niger*; mientras que para el estilbano metoxilado las cepas que requirieron de concentraciones mayores (0.5 mg/ml) fueron *R. solani* y *A. niger*.

En la CF_{50} se determinó que las cepas con mayor sensibilidad fueron para el extracto metanólico: *T. mentagrophytes* (0.3802 mg/ml) y *R. solani* (0.3813 mg/ml); mientras que para las cepas tratadas con el extracto hexánico la única cepa sensible fue *T. mentagrophytes* (0.151 mg/ml). Por último, la cepas con mayor sensibilidad al estilbano metoxilado fueron: *F. sporotrichum*, (0.0993 mg/ml) y *F. moniliforme* (0.1091 mg/ml).

Cuadro 15. Concentración fungicida media (CF₅₀) y concentración fungicida mínima (CFM) de los extractos y el estilbeno metoxilado la corteza de *Y. periculosa*.

Hongos	Extracto MeOH (mg/ml)		Extracto hexánico (mg/ml)		Estilbeno metoxilado (mg/ml)	
	CF ₅₀	CFM	CF ₅₀	CFM	CF ₅₀	CFM
Tm	0.380	2	0.151	1	-	-
Rs	0.381	> 2	-	-	0.142	> 0.5
Fs	1.260	> 2	-	-	0.099	0.5
Fm	1.531	> 2	-	-	0.109	0.5
An	1.808	> 2	-	-	0.153	> 0.5

(-) no activo.

DISCUSIÓN

Los recursos vegetales son una fuente importante de compuestos nuevos que potencialmente pueden ser usados para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos, en diferentes países, y no solo para rescatar las tradiciones ancestrales, si no, como una solución alternativa a grandes problemas (Paz et al., 1995).

❖ **Colecta de la planta**

La corteza de la planta de *Y. periculosa* se colectó durante el mes de septiembre del 2004, en la localidad de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, esta se encuentra dentro de la reserva de la biosfera de Tehuacan-Cuicatlán, la cual, es una de las regiones áridas y semiáridas de México con mayor diversidad biológica (Dávila, 2002) y endemismo.

Las plantas al igual que la mayoría de los organismos del planeta han desarrollado mecanismos de defensa contra condiciones adversas. Entre estos, se encuentran la producción de sustancias denominadas fitoalexinas, las cuales, protegen a las plantas de parásitos, insectos, animales, bacterias y hongos causantes de enfermedades (Boller, 1995).

❖ **Extracción por maceración**

El extracto metanólico de la corteza de *Y. periculosa* presentó el mayor rendimiento (cuadro 4) con 313.09 g (7.827%), esto se puede deber a que la corteza contiene una alta cantidad de compuestos polares como, por ejemplo, las antocianinas, saponinas, taninos, flavonoides, fenoles, entre otros. Al preparar el extracto metanólico, se extrajeron una gran cantidad de compuestos polares y por medio de una partición hexánica se logró una separación de diferentes compuestos no polares.

La especie *Y. periculosa*, sintetiza compuestos polares en la corteza. Lo anterior puede estar directamente ligado a las variaciones ambientales de la localidad, ya que en este tipo de regiones áridas afectan a las plantas, al presentar ciertas características que les permiten sobrevivir y reproducirse en ambientes que presentan un estrés constante para ellas (Arias et al., 2000), lo cual, puede estar reflejado en el rendimiento de los sólidos de *Y. periculosa*.

Es importante estudiar la estructura básica de los compuestos extraídos y las propiedades químicas ya que pueden combatir ciertas enfermedades, además pueden servir para el desarrollo de nuevas drogas, como antibióticos, insecticidas, herbicidas, entre otros.

❖ Estudio Fitoquímico

El estudio fitoquímico, está encaminado a encontrar nuevos compuestos, debido a la gran variedad de sustancias que son elaboradas y almacenadas por las plantas, así como el estudio de sus estructuras químicas derivadas de sus biosíntesis (Harborne, 1973), esto se relaciona con estudios enfocados a la producción de fármacos, entre otros estudios.

Se identificó la presencia de naringenina, resveratrol y el estilbeno metoxilado mediante el Rf, el espectro de absorción en la región del UV (200 a 400 nm) y por último el p.f.

En las fracciones H y J, se detectó la presencia de naringenina, el cual, pertenece al grupo de los flavonoides, los cuales, son sustancias que se encuentran en las plantas cuyas estructuras derivan del núcleo aromático flavano o 2-fenilbenzopirano. Los flavonoides se hallan en todas las plantas vasculares. Desde el punto de vista económico, uno de los flavonoides más importantes se encuentran la naringenina, la cual, es una sustancia amarga, y es el componente principal de muchos frutos cítricos (Valencia, 1995). La naringenina se ha reportado como un exitoso ejemplo tópico como un agente

fotoprotector (Saija et al., 1998). Este estudio muestra que las fracciones que contienen este compuesto presentaron actividad antibacteriana (Cuadro 10) contra algunas cepas (*V. cholerae* Tor, *V. cholerae* No. 01, *S. lutea* y *S. epidermidis*).

Los fenoles están representados en las plantas, por un grupo muy amplio de estructuras químicas, más de 8000, y se caracterizan por presentar, todos ellos, el núcleo aromático, unido a uno o más sustituyentes hidroxilo. Pero en general, los fenoles vegetales presentan estructuras más complejas y pueden ser reconocidos con facilidad como componentes de la madera y pigmentos de flores y frutos (Valencia, 1995). En las plantas, con frecuencia, aparecen derivados fenólicos más complejos como los estilbenos, estos se encuentran en un gran número de especies vegetales, localizándose principalmente en la médula del tronco de especies arbóreas. Los estilbenos juegan un rol muy importante en algunas plantas, ya que se les ha conferido como un mecanismo de acción contra el ataque de algunos hongos microscópicos. También se conocen como nematicidas, antioxidantes, antimicrobianos e inhibidor del crecimiento de algunos insectos (Buchanan et al., 2000; Torres et al, 2003).

En las fracciones W y XVI, se detectó la presencia de taninos, los cuales, están ampliamente distribuidos en las plantas, y se localizan en partes específicas como hojas, frutos o en la corteza (Valencia, 1995).

Se ha reportado que los taninos, pueden inducir la formación de complejos insolubles de enzimas y sustratos que las bacterias requieren para su crecimiento normal, la combinación entre los taninos y las macromoléculas se establece, probablemente, por medio de enlaces de puentes de hidrógeno entre los grupos fenólicos de los taninos y de determinados lugares de las proteínas (Bruneton, 1991). El mecanismo de acción de los taninos se debe a la acción inhibitoria del crecimiento de los microorganismos se debe a los siguientes efectos: astringencia, acción sobre las membranas y competencia

por los metales (Bruneton, 1991; Canales, 2000). Sin embargo en este estudio sólo presentó actividad antibacteriana en la cepa *S. lutea* (Cuadro 10).

❖ **Actividad antibacteriana**

En la actualidad se han realizado numerosas investigaciones sobre el tema de antibacterianos de origen vegetal y el resultado ha sido la identificación de una gran cantidad de compuestos que se han aislado de plantas y se ha logrado determinar los microorganismos que son sensibles a éstas (Canales, 2000).

En el cuadro 9 se muestran los halos de inhibición de extractos y el estilbenu metoxilado (3, 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbenu), utilizando 13 cepas bacterianas, observándose que ambos tienen propiedades antibacterianas sobre las diferentes cepas (gram positivas y gram negativas).

Tanto el extracto metanólico como el estilbenu metoxilado, presentaron diferencia en cuanto a la actividad antibacteriana (Cuadro 9) siendo el estilbenu metoxilado más activo. Esto probablemente se deba a que algunos compuestos del extracto metanólico puedan actuar sinergismo en dicha actividad, debido a que el extracto metanólico es una mezcla de compuestos o por que se encuentra menos concentrado.

En la figura 5, se observa que el cloramfenicol presentó los mayores halos de inhibición. Se ha reportado que el cloramfenicol tiene un mecanismo de acción, el cual, actúa inhibiendo la síntesis proteica por unión reversible a las unidades 50s de los ribosomas e impiden la formación de uniones peptídicas. El cloramfenicol, puede ser bacteriostático pero en algunos casos también actúan como bactericida. Sin embargo, se ha comprobado que el cloramfenicol tiene efectos secundarios de tipo hematológico, neurológico, digestivo, entre otros (Kunklinski, 2000), por lo que se busca encontrar nuevos medicamentos.

En el análisis de varianza bifactorial ($P < 0.05$) se observó que existen diferencias significativas entre la actividad antibacteriana que presentó el

cloramfenicol, el estilbena metoxilado y el extracto metanólico. El estilbena metoxilado puede atravesar distintas envolturas celulares afectando la membrana celular alterando de manera inespecífica o específica algunos transportadores celulares y en algunos casos estos mecanismos han de activarse por enzimas intracelulares, antes de alcanzar su blanco de acción y matar a la bacteria (Baquero et al., 2002).

El extracto hexánico no presentó actividad antibacteriana, esto puede deberse a que las bacterias no sean sensibles al extracto o que requiera de concentraciones más altas para inhibir el crecimiento bacteriano.

El estilbena metoxilado presentó la mayor actividad antibacteriana comparada con el extracto metanólico. Los estilbenos tienen una estructura plana, lo cual, hace suponer que su mecanismo de acción puede deberse a su semejanza a las bases púricas y pirimídicas, por lo que se intercalan entre las bases nitrogenadas de la doble hélice, inhibiendo la síntesis de ADN y ARN (Hernández, 2004; Andrade, 2005).

Chan (2002) reporta que el resveratrol tiene actividad antibacteriana. Esta información puede apoyar los resultados obtenidos en este trabajo, ya que el estilbena metoxilado tuvo actividad en algunas enfermedades de importancia médica y fitopatógena.

En el cuadro 10, se muestran los valores de CMI y CBM, en donde se puede observar que las concentraciones más bajas para inhibir el crecimiento de algunas cepas bacterianas sensibles corresponden al estilbena metoxilado (3, 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbena) seguida del extracto metanólico. Esto se puede deber a que las cepas sean más sensibles al estilbena metoxilado que al extracto metanólico, ya que este último es una mezcla de compuestos, y la concentración del activo es más baja.

❖ Actividad antifúngica

Los extractos y el estilbeno metoxilado, obtenidos de la corteza de la planta *Y. periculosa* mostraron actividad antifúngica contra algunas cepas de hongos de importancia económica, social y médica, esta información puede dar pie al descubrimiento de nuevos medicamentos y con ello al combate de enfermedades medicas como: trombosis, infartos, problemas de la piel (tiña), así como a la prevención de problemas de tipo agronómico tales como el combate de algunos hongos responsables de la pudrición del fruto, tallo, raíz.

En cuanto a la actividad antifúngica el estilbeno metoxilado presentó mayor actividad comparada con el extracto metanólico y el extracto hexánico, debido probablemente a las referencias hechas a los estilbenos ya que causan modificaciones en la membrana fúngica dando como resultados anomalías en la estructura celular y en la respiración del hongo (Serazetdinova et al., 2005; Chan, 2002). También se sabe que la presencia de algunos estilbenos alteran la función de la membrana (Shultz et al., 1991; Chan, 2002). Esto concuerda con los resultados de la actividad antifungica del estilbeno metoxilado sobre algunas cepas de hongos. Dichos compuestos podrían ser usados como un potencial fungicida potencial en el control de enfermedades.

Se ha comprobado que el resveratrol (grupo de estilbeno) interfiere en la membrana fúngica, despolarizando la membrana, lo cual, conduce a una inestabilidad y esta actúa como un agente fungistático, por otra parte se conoce que los estilbenos inhiben la síntesis de las pirimidinas. La estructura a nivel mitocondrial y la membrana nuclear son las primera en ser afectadas, seguida de la desorganización de los organelos y a la destrucción de la membrana celular del hongo (Chan, 2002). En cuanto al estilbeno metoxilado aislado en este estudio se le puede atribuir también dicha actividad, ya que se le conoce como una molécula de defensa de la corteza de *Y. periculosa*, la cual, es exitosa sobre algunos hongos patógenos de plantas y del ser humano, esto probablemente se deba a que pueda presentar el mismo mecanismo de acción como el resveratrol (Serazetdinova et al., 2005; Chan, 2002; y Torres et al., 2003).

Considerando los resultados obtenidos en este trabajo es importante tener un banco de datos actualizado de plantas como la *Y. periculosa* como una nueva información de calidad verificada por especialistas, que pueda ser consultado por diferentes sectores de la sociedad que sirva para la toma de decisiones y la planeación de estrategias de salud alternativa. Todo esto ayudará a formular recomendaciones de aprovechamiento, manejo y conservación de este recurso vegetal en la reserva de la biosfera de Tehuacan-Cuicatlan, y también como una nueva aplicación sobre algunos agentes causantes de enfermedades.

CONCLUSIONES

- Se identificaron tres compuestos (3, 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbeno metoxilado, resveratrol y naringenina) de la corteza de *Yucca periculosa*.
- El extracto metanólico y el 3, 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbeno extraídos de la corteza de *Yucca periculosa*, tienen actividad antibacteriana y antifúngica.
- El 3, 5, 3', 5'-tetrahidroxi-4 metoxi-estilbeno tiene mayor actividad antibacteriana que los extractos de *Yucca periculosa*.
- El estilbeno metoxilado fue más activo ya que requirió de concentraciones menores comparada con el extracto metanólico en los parámetros microbianos de CMI y CBM.
- El extracto hexánico de la corteza de *Yucca periculosa* sólo presentó actividad antifúngica en la cepa *Trichophyton mentagrophytes*.
- El extracto metanólico presentó mayor inhibición del crecimiento radial en 5 cepas de hongos, en cuanto al estilbeno metoxilado, este solo presentó actividad en 4 cepas de hongos.
- El estilbeno metoxilado presentó las concentraciones más bajas, seguida del extracto hexánico y por último el extracto metanólico en la CF₅₀ y la CFM.

PERSPECTIVAS

- Sería adecuado realizar estudio posteriores para determinar el modo de acción de los compuestos que se encuentran en la corteza de la *Yucca periculosa*.
- Realizar investigaciones para determinar los aspectos farmacológicos de los extractos y el estilbeno metoxilado de corteza de *Yucca periculosa*.
- Los extractos y el estilbeno metoxilado presentaron actividad antimicrobiana, los cuales, podrían utilizarse como medicamentos o posibles plaguicidas para lo cual es necesario realizar estudios toxicológicos.
- Aislar el principio activo del extracto hexánico.

APENDICE 1

Técnicas Cromatográficas

Las cromatografías de adsorción en columna abierta se realizaron sobre gel de sílice 60 F₂₅₄ (tamaño de partícula 0.063-0.200 mm, malla 70-230). Para las cromatografías en capa fina (ccf) se emplean cromatofolios de aluminio cubiertos con gel de sílice 60 F₂₅₄ (0.2 mm de espesor, para análisis).

La ccf permitió verificar el desarrollo de las cromatografías en columna abierta y comprobar la pureza de los compuestos obtenidos. Como agentes cromogénicos se emplearon: a) Una solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado, y para el desarrollo del color fue necesario calentar las placas cromatográficas durante dos minutos a 110 °C. b) El revelado con luz UV a 254 y 366 nm.

A partir del extracto metanólico se realizó una cromatografía en columna (cc). Se utilizó como fase móvil mezclas con diferente polaridad (metanol y cloroformo), para la obtención de las fracciones.

APÉNDICE 2

Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer (Van den Berghe y Vlietinck, 1991)

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos herbales y las fracciones producto de las separaciones cromatográficas, así como el estilbena metoxilado. La metodología es la siguiente:

Medio:

Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton (Bioxon 110-1), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

Inóculo:

Con un asa de siembra estéril se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias del microorganismo a ensayar. Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müller – Hinton, se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Incubar el tubo de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml (este procedimiento se realiza por cada microorganismo a desafiar).

El estándar 0.5 de McFarland se prepara añadiendo 0.5 ml de cloruro de bario a 99.5 ml de H_2SO_4 0.36 N. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los

organismos en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o en su defecto con un espectrofotómetro a 660 nm.

Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina al 0.9 % hasta igualarlas. Una vez logrado esto, se sumerge un segundo hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlos se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa de agar de Müller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente. Finalmente, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, la placa de Müller-Hinton está lista para la aplicación de las muestras a las que se les evaluará su actividad antibacteriana.

Aplicación de sustancias:

Se utilizó sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel whatman del N° 5 (los sensidiscos se utilizarán para evaluar biológicamente los extractos y las fracciones separadas mediante cromatografía). En todos los caso de las diluciones se realizaran de acuerdo con las necesarias para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto, en el caso de los extractos las concentraciones serán de 2 mg por sensidisco y en el caso del estilbeno metoxilado y las fracciones obtenidas de la cc las concentraciones fueron de 0.5 mg por sensidisco.

Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril.

Controles negativos:

Para los bioensayos preliminares se utilizaron sensidiscos con los diferentes solventes (metanol y hexano) dejándolos evaporar durante 12 horas al igual que los experimentales, para el aceite esencial se utilizará aceite de olivo estéril.

Control positivo:

Se evaluará la sensibilidad de las cepas experimentales en sensidiscos con 25 µg de cloramfenicol para el caso de bacterias.

Incubación:

Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad. Se colocan en una incubadora a 35 °C. Es preciso evitar presión de CO₂ debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida de agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Asimismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición. Se incuban siempre placas con discos sin sustancias a evaluar como control (control negativo).

Interpretación de resultados:

Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, la prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio en mm.

Para analizar los resultados de difusión en agar de Kirby-Bauer se utilizó un análisis de varianza bifactorial (ANOVA) realizado en el software estadística V. 5.

APENDICE 3

Concentración mínima inhibitoria (CMI) y de concentración bactericida mínima (CBM)

Método de macrodilución en caldo (Koneman et al., 1985)

Este método se utiliza para evaluar cuantitativamente la actividad antibacteriana de los extractos herbales y el estilbeno metoxilado.

a) Preparación de reactivos y diluciones:

La solución antimicrobiana de trabajo se prepara diluyendo la droga en el caldo de Müller-Hinton a la mayor concentración final deseada. La prueba se realiza en tubos de ensayo de 13 por 100 mm con tapa de rosca o con tapones de algodón. Para un pequeño número de pruebas se preparan diluciones al doble directamente en los tubos, del modo siguiente: se colocan 2 ml de solución de trabajo de la droga en el primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes es añadido 1 ml de caldo de Müller-Hinton. Con una pipeta esterilizada se transfiere 1 ml del primer tubo al segundo. Después de mezclar bien el contenido del segundo tubo, se transfiere 1 ml con una pipeta diferente (en esta transferencia y en todas las sucesivas) al tercer tubo. El proceso continúa hasta el penúltimo tubo, al que se le quita 1 ml que se descarta. El último tubo no recibe agente antimicrobiano y sirve de control de crecimiento. Las concentraciones finales de antimicrobianos en esta prueba son iguales a la mitad a la serie inicial de dilución, debido al agregado de una concentración igual de inóculo en caldo.

b) Inoculación e incubación de los tubos:

Se prepara un inóculo que contenga 10^6 a 10^7 UFC/ml (unidades formadoras de colonia/ml) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utiliza el estándar 0.5 de McFarland y diluyendo luego 1:200 en caldo). Añadir a

cada tubo, 1 ml del inóculo ajustado. Incubar los tubos a 35 °C durante 16 a 20 horas. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO₂ a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo.

c) Interpretación de resultados:

La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible representa la concentración mínima inhibitoria (CMI). Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se considera evidencia de que la droga ha sido incapaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

d) Determinación de la concentración bactericida media

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un organismo se realiza la prueba de actividad bactericida que emplea el mismo sistema de dilución en caldo. Cuando la suspensión inicial del microorganismo es inoculada en los tubos de caldo, se toma una alícuota del tubo de control de crecimiento inmediatamente después de ser sembrado, la cual se inocula en una placa de agar de Müller-Hinton para determinar el número real de unidades formadoras de colonia (UFC) del inóculo. Este número se obtiene al contar las colonias presentes luego de la inoculación de la placa de agar hasta el día siguiente y por multiplicación del factor de dilución.

Luego que se ha determinado la CMI se siembra una cantidad conocida del inóculo (usualmente 0.1 ml) tomado de cada uno de los tubos de caldo que no presentan turbidez luego de la incubación, en placas de agar Müller-Hinton. El número de colonias que se desarrolla en estos subcultivos luego de incubar durante 18 horas se compara con el número de UFC/ml del cultivo original. En aquellos tubos que no presenten turbidez, los microorganismos permanecerán viables o bien, habrán sido destruidos por el agente microbiano. Debido a que

incluso las drogas bactericidas no siempre esterilizan totalmente una población bacteriana, la mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0.1% del inóculo original, se denomina concentración bactericida media (CBM).

Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1985).

La microtécnica de dilución en caldo sigue el mismo principio que el método de dilución en caldo, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica (placas de ELISA). La microplaca se prepara colocando 50 μ l de caldo Muller-Hinton con la concentración deseada del compuesto a probar.

Se prepara una suspensión bacteriana con un asa de siembra estéril tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de los microorganismos a ensayar. Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müller – Hinton, se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Incubar el tubo de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml, de esta suspensión se toman 0.1 ml y se le adicionan a 99.9 ml de solución salina al 0.9 % obteniéndose así una concentración de 10^5 bacterias/ml. Cada concavidad se inocula con 50 μ l de esta suspensión bacteriana.

Una vez inoculada la placa se tapa para evitar la desecación y se incuba por 24 horas a 37 °C, pasado este tiempo se le añaden 50 μ l de una solución de cloruro de tetrazolio al 0.08 % a cada concavidad, se incuba por 30 min. a 37 °C. En las concavidades donde se desarrolla el organismo, el colorante es reducido a formazan de color rojo, produciéndose un botón rojo en el fondo del microtubo. Donde no hay desarrollo bacteriano la solución permanece clara.

APÉNDICE 4

Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial

(Wang y Bun, 2002)

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas petri (100x15mm) que contengan 20 ml de agar de papa dextrosa (PDA), en el cual, se inoculan las esporas del hongo. Después que el micelio se ha desarrollado, se colocan discos previamente impregnados con el compuesto activo, la preparación de los discos es igual a la técnica de difusión en agar. Si el primer ensayo es con un extracto crudo, se recomienda usar concentraciones grandes de activo (1-2 mg por disco) y en el caso del *estilbeno metoxilado* la concentración empleada fue de 0.5 mg. Los discos se colocan a una distancia de 30 mm del límite micelial.

➤ Incubación

Las placas son incubadas a 23°C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

➤ Controles negativos

Discos a los que se les agregará 10 µl del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que las experimentales).

➤ Interpretación de resultados

En el caso de existir zonas de inhibición se reportará el extracto como activo, en todos los casos esta prueba se hará por triplicado.

APÉNDICE 5

Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002)

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva acabo en placas de cultivo de 24 pozos, que contengan 6 ml de agar de para dextrosa, con las siguientes concentraciones en el caso de extractos a probar 0.062, 0.125, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/ml y para el estilbeno metoxilado las concentraciones empleadas fueron las siguientes: 0.062, 0.125, 0.25 y 0.5 mg/ml. Posteriormente se coloca una pequeña cantidad de micelio en el centro de la caja. Todos los biensayos se realizaron por triplicado.

➤ Incubación

Las placas son incubadas a 23 °C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

➤ Interpretación de resultados

Los resultados se reportan en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento, la cual, corresponde a CFM; mientras que la concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la CF₅₀ y estas fueron determinadas tomando en cuenta el control negativo que representa el 0% de inhibición.

CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

- **Género *Yucca***

El género *Yucca* está integrado por plantas perennes, con hojas ascendentes, rígidas, planas o convexas, y algunas veces estriadas. Tiene una inflorescencia en panícula, erecta o pendular. Su fruto puede ser indehiscente, carnoso y seco (Matuda y Piña, 1980).

Todas las especies del género *Yucca* son plantas de tipo xerófilo. Lo anterior se puede observar ya que aún las especies que viven en zonas más o menos lluviosas se desarrollan mejor en los substratos menos húmedos (Matuda y Piña, 1980).

Rzedowski (1994), señala que el centro de dispersión del género *Yucca* se localiza en la Altiplanicie Mexicana, pero su área actual de distribución se extiende desde la gran curvatura del Río Missouri en los Estados Unidos, cerca de la frontera con Canadá, hasta Centroamérica, las Islas Bermudas y las Antillas (Matuda y Piña, 1980).

La gran mayoría de las especies del género, se localizan en las zonas áridas semiáridas de los Estados Unidos y México, caracterizados por el “matorral desértico rosetofillo” o “Izotales” (Valiente-Banuet et al., 2000).

- ***Yucca periculosa* Baker**

Clasificación:

Reino: Plantae
Clase: Liliopsida
Orden: Aspargales
Familia: Agavaceae
Género: *Yucca*
Especie: *Yucca periculosa* Baker

Las plantas del género *Yucca* son plantas arborescentes muy ramificadas (plantas viejas), que llegan a alcanzar hasta 15 m de altura y sus hojas poseen un largo de 35-50 cm por 2-3 cm de ancho. Durante los meses de marzo, abril en Tehuacan y julio a agosto en Perote, tienen su florescencia (Matuda y Piña, 1980) (Figura 1).

El área de distribución de *Y. periculosa* son los estados de Puebla (Tehuacan) Izúcar de Matamoros, Ciudad Cerdan), Oaxaca (Cuicatlán, Teotitlán, Tamazulapan, Huajuapam de León y Mitla), Veracruz (Perote) y Tlaxcala (Tlaxcala) (Figura 2).

La planta *Y. periculosa* habita en planicies y valles con suelos profundos, laderas con pendiente suave y suelo delgado y pedregosos; con altitudes entre 1300 y 1650 msnm, formando parte del matorral desértico. Su nombre popular es Izote o palmitos (Matuda y Piña, 1980).

La inflorescencia de la planta *Y. periculosa* es conocida como “palmito” y es muy apreciada debido a que sus flores son comestibles. La fibra que se extrae del tallo se conoce como “coaxcle”. En décadas pasadas esta fibra fue utilizada como relleno de asientos para autos, colchones y sillas. Con las hojas nuevas conocidas como “cojoyos” se tejen adornos utilizados en las fiestas patronales. Además, en granjas avícolas, se exprimen los tallos en el suelo para impedir altas producciones de metano resultado de los desechos orgánicos. En la comunidad de Los Reyes Metzontla se utiliza como leña para la cocción de la cerámica. Con los tallos de plantas muertas se fabrican macetas rústicas (Arias et al., 2000).



Figura 1. *Yucca periculosa* Baker.



Figura 2. Área de distribución de *Y. periculosa* en México.

AREA DE COLECTA DE LA PLANTA *Yucca periculosa*

La provincia fitogeográfica del Valle de Tehuacan Cuicatlán (Rzedowski, 1994) se encuentra localizada entre los 17° 03' y 97° 43' de longitud oeste (Figura 3). Sigue una dirección sureste-noreste por la Sierra de Juárez, Zongolica y Tecamachalco, en la parte sureste del estado de Puebla y noreste del de Oaxaca (Valiente-Banuet et al., 2000). Esta provincia es la región árida y semiárida más meridional de México (Rzedowski, 1994). Fisiográficamente, el Valle de Tehuacan es parte de la provincia mixteca-oaxaqueña, en la cual, existen pequeños valles de origen tectónico, entre lo que destacan los de Cuicatlán, Huajuapán, Tehuacan, Tepelmeme y Zapotitlán (Dávila et al., 1993).

Sobre la fauna no existe aún un diagnóstico completo; sin embargo, estudios sobre algunos grupos de animales indican que la riqueza faunística es igualmente considerable, por ejemplo, Dávila et al., (2002) encontraron aproximadamente 24 especies de murciélagos, 91 especies de aves, 11 especies de anfibios, 48 especies de reptiles, la información disponible para el resto de los grupos de mamíferos es pobre. Una de las razones por las que se ha protegido el área de Tehuacan-Cuicatlán, declarándola como una reserva de la Biosfera, es porque en esta región del país existe una gran variedad de plantas y animales, muchos de ellos endémicos.

La reserva de la biosfera de Tehuacan-Cuicatlán está localizada en el centro de la República Mexicana, comprendiendo parte de los estados de Puebla y Oaxaca (Valiente-Banuet et al., 2000; Dávila et al., 2002).

El Valle de Zapotitlán Salinas forma parte del municipio de Zapotitlán de las Salinas, el cual, comprende una superficie aproximada de 86.76 km². Este se ubica en los 18° 20' de latitud norte y 97° 28' de latitud oeste. El valle se encuentra delimitado al oriente por las sierras de Atzingo y Miahuatepec, al

norte por los cerros Chacateca y Pajarito, al poniente por el cerro La Mesa y al sur por el cerro Corra de Piedra (Valiente-Banuet et al., 2000).

El tipo de suelo que se encuentra en el Valle de Zapotitlán es comúnmente de yeso y caliza, mucha veces con altos contenidos de sales. De hecho, en Zapotitlán de las Salinas el suelo ha sido explotado desde tiempos prehispánicos por la cultura chocho-popoloca para la obtención de sal. Esta explotación se ha llevado a cabo hasta la actualidad y se ha conservado la técnica prehispánica, de tal modo que se pueden observar tanto salinas recientes como prehispánicas, aún en funcionamiento (Dávila et al., 1993).

Otro material importante que se obtiene de los suelos del Valle de Zapotitlán es el ónix, este material representa un alto ingreso económico para los habitantes del municipio, ya que con él se elaboran artesanías de diferentes tipos, así como lápidas, macetas, material de construcción, figuras, entre otras (Oliveros, 2000).

Por último, en la colonia de Los Reyes Metzontla, perteneciente al municipio de Zapotitlán Salinas, se presenta un tipo de suelo arcilloso que es bien utilizado por sus habitantes en la elaboración de artesanías de barro; para la cual la técnica empleada y los modelos artesanales no han sido modificados significativamente desde tiempos prehispánicos (Oliveros, 2000).

El Valle de Zapotitlán Salinas presenta un clima seco o árido, semicálido, con una marcada época de lluvias en el verano. La precipitación anual es de 280 mm y su promedio de temperatura a lo largo de todo el año es de 21.2°C. El clima seco de esta región se debe principalmente a que las corrientes de viento cargado de humedad que provienen del Golfo de México chocan contra las montañas de la Sierra Madre Oriental, dejando caer toda la lluvia en las zonas del lado oriente de la Sierra, y pasando al otro lado en forma de vientos secos. Así, sólo una mínima parte de esta lluvia pasa hacia el Valle de Zapotitlán, generando el clima semiárido que lo caracteriza. A este fenómeno se le denomina efecto de sombra de montaña o sombra orográfica. El clima seco del

Valle de Zapotitlán Salinas determina una serie de características de la vegetación (Arizmendi y Espinosa de los Monteros, 1996).

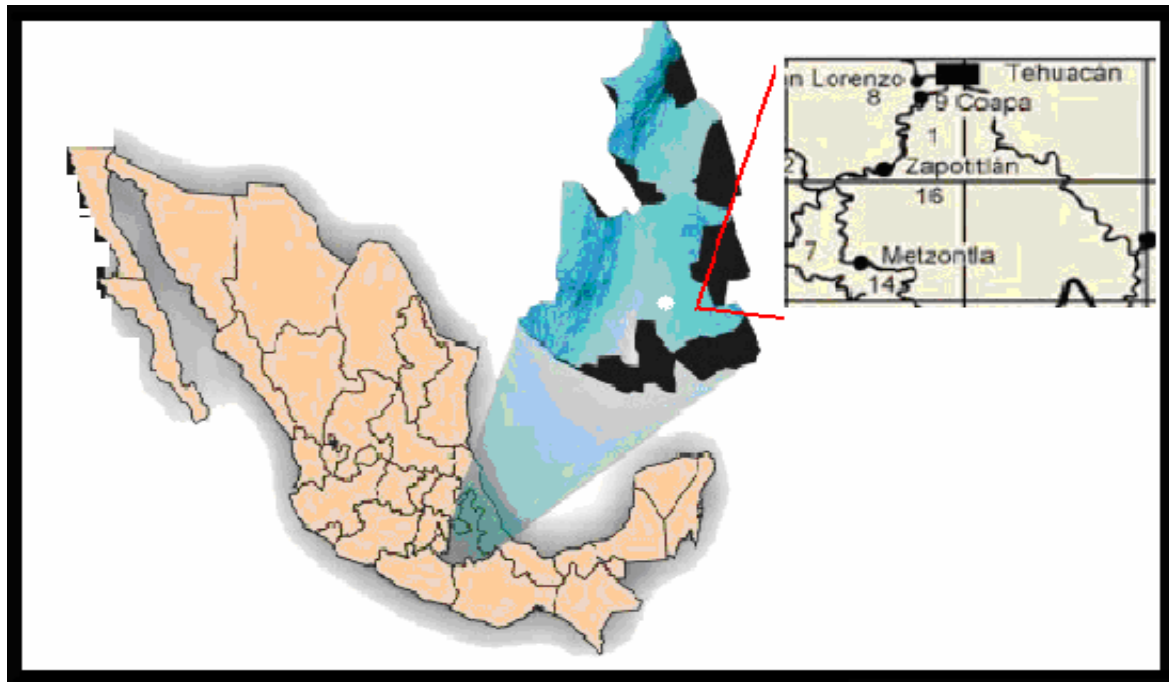


Figura 3. Ubicación geográfica del Valle de Tehuacan-Cuicatlán entre los estados de Puebla y Oaxaca.

Las lluvias del Valle de Zapotitlán Salinas son escasas e irregulares y cuando se presentan, son de tipo torrencial. El suelo retiene poco agua provocando su rápido escurrimiento hacia los arroyos, esto impide que las raíces de las plantas capten agua. Además, las lluvias torrenciales y los fuertes vientos pueden dar lugar a una intensa erosión del terreno y resequedad del medio ambiente. Por otro lado, se dan cambios muy extremos en la temperatura: por ejemplo, durante el día el sol intenso provoca altas temperaturas y durante la noche la temperatura puede descender incluso por debajo de los 0° C (Arizmendi y Espinosa de los Monteros, 1996).

Dávila et al., (1993) registraron más de 27000 especies de plantas para el área, y Valiente-Banuet et al., (2000) han logrado describir 29 tipos diferentes de asociaciones vegetales, que constituyen una muestra de la heterogeneidad ambiental que aloja tan diversidad florística; y Dávila et al., (2002) registran un total de 2621 especies de plantas vasculares con un porcentaje de endemismo (13.9%).

El municipio de Zapotitlán Salinas se localiza al sureste del estado de Puebla y se encuentra enclavado en la porción sur occidental del Valle de Tehuacan.

La gran biodiversidad de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, es importante ya que resguarda algunos vestigios de asentamiento prehispánicos de culturas como la chocho, cuicateca, mazateca, mixteca, náhuatl, popoloca y zapoteca, que constituyen cerca de 30% de los 650, 000 habitantes de la región (Casas et al., 1997). Un ejemplo de estas civilizaciones son las ruinas arqueológicas de la cultura popoloca, que se encuentran en la cima del Cerro de la Máscara, o Cuthá, en el municipio de Zapotitlán Salina (Toledo et al., 2000).

LITERATURA CITADA

- Aguilar, A., Camacho, J., Chino, S., Jácquez, P., López, E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS. México. pp 253.
- Andrade, I. 2005. Efecto Antimicrobiano de la Raíz de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng). Less (Popote). Tesis de Licenciatura Biología. FES-IZTACALA. UNAM. México.
- Arias, A. Valverde, M. y Reyes, J. 2000. Las Plantas de la Región de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología. México. pp 80.
- Arizmendi, M.C. y Espinosa de los Monteros, E. 1996. Avifauna de los Bosques de Cactáceas Columnares del Valle de Tehuacan, Puebla. Acta Zoológica Mexicana. 67: 25-46.
- Bautista, L. 2001. Estudio de la Calidad Fisicoquímica y Bacteriológica de la Zona Costera de Bahía Banderas y sus Problemas de Contaminación. Tesis de Licenciatura Biología. FES-Iztacala. UNAM. México.
- Baquero, F., Blázquez, J. y Martínez, J. 2002. Mutación y Resistencia a los Antibióticos. Investigación y Ciencia. Diciembre: 72-78.
- Boller, T. 1995. Chemoreception of microbial signal in plant cell. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 46: 189-214.
- Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognocia. Acribia. España. pp 594.
- Buchanan, B., Gruissem, W., and Jones, R. 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland USA. pp 1367.
- Caballero, M. 1978. Estudio botánico y ecológico de la región del Río Uxpanapa, Veracruz. El uso Agrícola de la selva. 3 (2): 63-83.
- Canales, M. 2000. Actividad Antibacteriana de la Planta *Alternanthera caracasana* HBK (Tianguis). Tesis de Maestría. FES-Iztacala. UNAM. México.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Durán, A., y Lira, R. 2006. Análisis Cuantitativo del Conocimiento Tradicional de las

Plantas Tradicionales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana*. 75: 21-43.

- Casas, A., Caballero, J., Mapes, C., y Zárate, S. 1997. Manejo de la Vegetación, Domesticación de Plantas y Origen de la Agricultura en Mesoamérica. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 61: 31-47.
- Cedillo, L. 1997. Síntesis de Análogos del Tolnaftato con Potencial Actividad Antifúngica. Tesis Licenciatura Químico Farmacéutico Biológico. Facultad de Química. UNAM. México.
- Chan, M. 2002. Antimicrobial Effect of Resveratrol on Dermatophytes and Bacterial Pathogens of the Skin. *Biochemical Pharmacology*. 63: 99-104.
- Dávila, P., Villaseñor, R., Medina, R., Ramírez, A., Salina, J., Sánchez, K., y Tenorio, P. 1993. Listado Florístico de México. Flora del Valle de Tehuacan-Cuicatlan. Instituto de Biología. UNAM. México. pp195.
- Dávila, P., Arizmendi, M. C., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J.L., Casas, A., y Lira, R. 2002. Biological diversity in the Tehuacan-Cuicatlán Valley. México. *Biodiversity and Conservation*. 11: 421-442.
- Evangelista, Z. 1997. Evaluación de la Calidad Bacteriológica y Físicoquímica de las Playas de Villa del Mar y Mocambo, Veracruz. Tesis de Licenciatura Biología. ENEP-Iztacala. UNAM. México.
- Franco, I. 1995. Conservación *in-situ* y *ex-situ* de las Agavaceas y Nolináceas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 56: 27-36.
- García, B. A. M. Estudio de la Actividad Fotoprotectora y Antioxidante de *Yucca periculosa* Baker. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. FES-Iztacala. UNAM. En proceso.
- García-Mendoza, A. 1995. Riqueza y Endemismo de la Familia Agavaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 56: 7-24.
- García-Villanueva, E. y Mark, E. 1997. Ontogenia de la Semilla de *Yucca periculosa* (Agavaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 61:5-13.
- Harborne, J. 1973. *Phytochemical Methods*. Ed. Chapman and Hall. USA. pp 40.
- Hernández, T. 2004. Etnobotánica y Actividad Antimicrobiana de Algunas Plantas Tradicionales Usadas en la Medicina Tradicional del Valle de

Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Tesis de Doctorado. FES-Iztacala. UNAM. México.

- Koneman, W., Allen, S., Dowell, R., Sommers, M. 1985. Diagnóstico Microbiológico. Ed. Medica Panamericana. México. pp 386-393.
- Kunklinski, 2000. Farmacognosia. Estudios de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. OMEGA. Barcelona. pp 515.
- Matuda, E. y Piña E. 1980. Las Plantas Medicinales del Género *Yucca*. Serie Fernando de Alva Ixtlilxochitl. Colección Miscelanea. Edo. de México. pp 145.
- Ocegueda, S., Moreno, E., Koleff, P. 2005. Plantas Utilizadas en Medicina Tradicional y su Identificación Científica. Biodiversitas. 68: 12-16.
- Oleszek, W., Sitek, M., Stochinal, A., Piacente, S., Pizza, C., and Cheeke, P. 2001. Resveratrol and other Phenolics from the Bark of *Yucca schidigera*. J. Agric food Chemistry. 49 (2): 747-752.
- Oliveros, O. 2000. Descripción Estructural de las Comunidades Vegetales en las Terrazas Fluviales del Río El Salado, en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, México. Tesis Licenciatura Biología. FES-Iztacala. UNAM. México.
- Paz, E., Cerderías, M., Fernández, J., Ferreira, F., Moyna, P., Soubes, M., Vasquez, A., Vero, S. and Zunino, L. 1995. Screening of Niger Medical Plants for Antimicrobial Activity. Journal of Ethnopharmacology. 45: 67-70|
- Piacente, S., Bifulco, G., Pizza, C., Stochmal, A., y Oleszek, W. 2002. A novel Phenolic Spiro Derivative, Yuccaone A, from *Yucca schidigera* Barck. Tetrahedron Letters. 43: 9133-9136.
- Rzedowski, J. 1994. Vegetación de México. LIMUSA. México. pp 432.
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Giacchi, M., De Pasquale, A., and Bonina, F. 1998. Influence of Different Penetration Enhancers on in vitro Skin Permeation and in vivo Photoprotective effect of Flavonoids. International Journal of Pharmaceutics. 175: 85-94.
- Schultz, T., Cheng, Q., Boldin, D. Hubbard, T., Jin, L., Fisher, T., and Nicholas, D. 1991. Comparison of the Fungicidal Activities of (E)-4-Hydroxylated Stilbenes and Related Bibenzyls. Phytochemistry. 30 (9): 2939-2945.
- Serazetdinova, L., Oldach, K. and Lorz, H. 2005. Expression of Transgenic Stilbene Synthases in Wheat Causes the Accumulation of Unknown Stilbene

Derivatives with Antifungal Activity. *Journal of Plant Physiology*. 162: 985-1002.

- Sitte, P., Weiler, E., Kadereit, J., Bresinsky, A., and Körner, C. 2002. Strasburger. *Tratado de Botánica*. Omega. Barcelona. pp 1134.
- SSA. 2002. Progresá Programa de Educación, Salud y Alimentación Componente de Salud / Prontuario Operativo para Personal de Salud. Secretaría de Salud. México DF. <http://www.respyn.uanl.mx/vii/3/articulos/deficiencias.htm> (11/12/2006).
- Terán, B. Actividad Antibacteriana y Antifúngica de *Cordia curassavica* (Jacq) Roemer y Shultes (Barredor). 2006. Tesis de Licenciatura Biología. FES-Iztacala. México.
- Toledo, A., Valdez, M., y Santiago, J. 2000. Las Plantas de la Región de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología. UNAM.
- Torres, P., Avila, G., Romo de Vivar, A., García, A., Marin, J., Aranda, E. y Céspedes, C. 2003. Antioxidant and Insect Growth Regulatory Activities of Stilbenes and Extracts from *Yucca periculosa*. *Phytochemistry*. 64: 463-473.
- Valencia, C. 1995. Fundamentos de Fitoquímica. Ed. Trillas. México. pp 235.
- Valiente-Banuet, A., Casas, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, Arizmendi, M. C., Villaseñor, J. y Ortega, J. 2000. La Vegetación del Valle de Tehuacan-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 67:27-74.
- Van den Berghe, A. y Vlietinck, J. 1991. Screening Methods for Antibacterial Agents from Higher Plants. En: *Methods in Plant Biochemistry*. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series Editor Dey P.M. Academic Press. New York, USA. 47-71.
- Wang, H. Bun, N. 2002. Isolation of an antifungal thaumantin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*. 61: 1-6.