



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
CARRERA DE BIOLOGÍA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD  
GENERAL DE LA CORTEZA DE *Senna skinneri* Bentham, Irwin &  
Barneby (PARACA).

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**B I Ó L O G A**

PRESENTA

CELIA JIMENA PEÑA GUTIÉRREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO.

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO.

ABRIL, 2009.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**Sinodales asignados para la revisión de esta tesis:**

**Presidente:** Dra. Margarita Canales Martínez.

**Vocal:** Dr. Rafael Lira Saade.

**Secretario:** Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado.

**Suplente:** M. en C. Rocío Serrano Parrales.

**Suplente:** Biol. Luis Barbo Hernández Portilla.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica de la Unidad De Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala



*Con el mas profundo cariño dedico este trabajo a una gran persona, que siempre recordare con infinita admiración por su valentía.*

*Un gran ser humano que con su experiencia, me enseñó, a valorar cada paso de mi vida, a no desperdiciar la oportunidad de despertar cada mañana.*

*Pero sobre todo, a darme cuenta de lo que un ser humano puede proponerse, y es capaz de lograr.*

*Gracias, por hacerme ver que a pesar de tener problemas, la vida solo es una, y que no por ellos, debo dejar de caminar a donde vaya.....*

*A la vida por darme la oportunidad de permanecer en ella, y de lograr cada día los propósitos que me eh planteado.*

*Me encuentro infinitamente agradecida como mis padres y con cada uno de mis maestros, por su valioso apoyo, su conocimiento transmitido y por formarme como una persona capaz de saber, de poder hacer y de ser.*

*Especialmente agradezco a la Dra. Tzasna y a la M. en C. Rocío Serrano, por compartirme el conocimiento, que han logrado adquirir, con su experiencia y dedicación. Gracias por toda la confianza que me han dado en tan poco tiempo.*

## ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	I
Índice de cuadros.....	III
Índice de figuras.....	IV
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Descripción botánica de <i>S. skinneri</i> .....	3
Distribución.....	3
Antecedentes.....	5
Objetivos.....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos particulares.....	7
Metodología.....	8
1. Obtención de la corteza.....	8
2. Obtención del extracto.....	8
3. Bioensayos.....	8
3.1. Actividad antibacteriana.....	8
3.1.1. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.....	8
Microorganismos a utilizar.....	8
3.1.2. Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.....	9
3.1.3. Efecto del extracto sobre la curva de sobrevivencia.....	9
3.2. Actividad antifúngica.....	9
3.2.1. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.....	9
Microorganismos a utilizar.....	9
3.2.2. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.....	10
4. Caracterización parcial de los principios activos.....	10
4.1 Prueba cualitativa para la detección de alcaloides.....	10
4.2 Prueba cualitativa para la detección de fenoles.....	10
4.3 Contenido total de fenoles.....	11
5. Actividad antioxidante.....	11
6. Toxicidad general.....	12
Resultados y Análisis.....	13

Discusión General.....	25
Conclusiones.....	29
Apéndices.....	30
Apéndice 1. Técnica de maceración.....	30
Apéndice 2. Método de difusión en agar de Kirby-Baüer.....	31
Apéndice 3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM). Método modificado de macrodilución en agar .....	34
Apéndice 4. Curva letal (curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento.....	35
Apéndice 5. Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial.....	36
Apéndice 6. Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial.....	37
Apéndice 7. Técnicas cromatográficas.....	38
Apéndice 8. Método cualitativo para alcaloides.....	39
Apéndice 9. Método cualitativo para fenoles.....	40
Apéndice 10. Contenido total de fenoles.....	41
Apéndice 11. Método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH).....	43
Apéndice 12. Método de toxicidad general.....	45
Literatura citada.....	46

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Datos generales de la especie.....	13
<b>Cuadro 2.</b>	Rendimiento de las particiones del extracto metanólico de <i>S. skinneri</i> .....	13
<b>Cuadro 3.</b>	Concentración fungicida mínima y concentración fungicida media de los hongos sensibles al extracto metanólico de <i>S. skinneri</i> . .....	20
<b>Cuadro 4.</b>	Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas por HPLC.....	20
<b>Cuadro 5.</b>	Porcentaje de reducción de la absorbancia del DPPH del extracto de <i>S. skinneri</i> .....	22
<b>Cuadro 6.</b>	Porcentaje de sobrevivencia de <i>Artemia salina</i> a diferentes concentraciones (ppm) del extracto de <i>S. skinneri</i> .....	23



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>Senna skinneri</i> (Bentham, Irwin & Barneby).....	3
<b>Figura 2.</b>	Distribución geográfica de <i>S. skinneri</i> (Bentham, Irwin & Barneby).....	4
<b>Figura 3.</b>	Actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza de <i>S. skinneri</i> .....	14
<b>Figura 4.</b>	Efecto del extracto metanólico de <i>S. skinneri</i> sobre bacterias gram positivas y gram negativas.....	15
<b>Figura 5.</b>	Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración bactericida mínima (CBM), de las bacterias sensibles al extracto metanólico de <i>S. skinneri</i> para cada bacteria .....	16
<b>Figura 6.</b>	Curva de sobrevivencia de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
<b>Figura 7.</b>	Curva de sobrevivencia de <i>Vibrio cholerae</i> caso clínico.....	17
<b>Figura 8.</b>	Efecto del extracto metanólico de la corteza de <i>S. skinneri</i> sobre la inhibición del crecimiento radial.....	18
<b>Figura 9.</b>	Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial del ketoconazol .....	19
<b>Figura 10.</b>	Cromatograma de la fracción activa de la corteza de <i>S. skinneri</i> .....	21
<b>Figura 11.</b>	Porcentaje de reducción del extracto de <i>S. skinner</i> . .....	22
<b>Figura 12.</b>	Porcentaje de sobrevivencia de <i>Artemia salina</i> a diferentes concentraciones (ppm) del extracto de <i>S. skinneri</i> .....	23

## RESUMEN

*Senna skinneri* comúnmente conocida como “Paraca”, es utilizada en la medicina tradicional por los curanderos del poblado de Amatlán, Morelos, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, respiratorias y dermatológicas, mediante el uso de infusiones de la corteza. El objetivo del presente trabajo fue verificar la actividad antimicrobiana, antioxidante y toxicidad general de la corteza de *S. skinneri* (Paraca). El extracto metanólico fue obtenido por maceración, de 328 g de corteza seca y fragmentada, seguido de una partición hexánica. Se evaluó la actividad antimicrobiana determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI), la concentración bactericida mínima (CBM), la concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>), y la concentración fungicida mínima (CFM), en 13 cepas bacterianas y 6 fúngicas. El extracto presentó actividad antimicrobiana en 7 cepas bacterianas (4 Gram positivas y 3 Gram negativas) (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae* agua, *V. cholerae* CC y *Yersinia enterocolitica*) y 2 fúngicas (*Fusarium moniliforme* y *Trichophyton mentagrophytes*). La actividad antioxidante fue evaluada mediante el método de decoloración de una solución metanólica de difenil-picril-hidracilo (DPPH), el extracto presentó actividad antioxidante, posiblemente, atribuible a la presencia de piceanol, el cual se ha reportado en otro estudio de esta especie, como un fuerte antioxidante. Se caracterizó la fracción activa encontrándose la presencia de alcaloides y fenoles, mediante pruebas cualitativas. En la cuantificación de fenoles se encontró que dicha fracción se conforma por un 60% de fenoles. La prueba de toxicidad general se evaluó según el método propuesto por McLaughlin. El extracto presentó una toxicidad general alta ya que el porcentaje de mortalidad es mayor a un 50% en concentraciones menores a 10 ppm. Con los resultados anteriores se valida el uso de la infusión de la corteza de *S. skinneri* en la medicina tradicional.

## INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional se desarrolla en las diferentes culturas, como consecuencia de la interacción del hombre con la naturaleza. Surge como un conocimiento empírico que se va profundizando con el avance del conocimiento científico, de la composición química y de los principios activos presentes en las plantas medicinales (Fusco et al., 2004). Dichos principios, pueden ser sustancias simples (como alcaloides) o bien complejas (resinas, aceites, etc) (Trease y Evans, 1993). Los cuales, administrados en dosis suficientes, pueden producir efectos curativos en las enfermedades del hombre y de los animales en general (Argueta y Cano, 1994).

Por lo que la fitoquímica o química botánica se ha desarrollado como una disciplina independiente, que relaciona la química orgánica de los productos naturales y la bioquímica de la planta. Es la encargada del estudio de las sustancias activas de las plantas, su estructura química, almacenamiento, biosíntesis, metabolismo y distribución (Harbone, 1988). El conocimiento que genera es muy específico para cada planta estudiada llegando a ser una base importante en aquellos países con una elevada riqueza en cuanto a su flora.

Nuestra nación posee una gran diversidad florística, su población a través del tiempo y de un largo proceso de aprendizaje, ha sabido apropiarse de los recursos naturales para su beneficio. Así la medicina tradicional mexicana ha representando, desde siempre, una alternativa como otro tipo de recursos para la salud (Aguilar et al., 1994). Por ejemplo, los habitantes del poblado de Amatlán, en el estado de Morelos, recurren al uso de plantas medicinales para el tratamiento de todo tipo de enfermedades, tales como diabetes, gripa, diarrea, tos, gonorrea, asma, mareo, dolor de cabeza, etc. Con respecto a la diarrea, se utilizan diversas plantas como lo son: marrubio, paraca y tronadora. Las hojas de la tronadora, la corteza de la paraca y la raíz del marrubio se hierven en té (Argueta y Cano, 1994). Con base en este conocimiento los habitantes de Amatlán han determinado que la corteza de la paraca (*Senna skinneri*), es muy efectiva contra la diarrea ya que actúa como laxante, alivia el dolor de cabeza, baja la temperatura (flor de paraca), combate la sarna y curapadecimientos renales (Argueta y Cano, 1994).

### DESCRIPCION BOTANICA DE *S. skinneri*

*S. skinneri* (figura 1) pertenece a la familia Leguminosae, es un arbusto de 1-6m de altura. Las hojas son curvas con 4 o 7 pares de folios de 2-5 cm de largo y de 1-2 cm de ancho, cubiertas de vellos en el reverso. Tiene flores solitarias y axilares, o agrupadas al final de las ramitas, estas son grandes de color amarillo, muy vistoso, en especial cuando el árbol está sin hojas, (Zamora, 2001). Los frutos son aplanados de 8-15 cm de largo y de 0.8-1 cm de ancho, aplanadas e indehiscentes.

### DISTRIBUCIÓN

*S. skinneri* se encuentra distribuida desde el sur de México (Morelos, Michoacán, Oaxaca, etc.), hasta Nicaragua y Venezuela (figura 2). Habita en climas cálido, semicálido y templado, a una altitud de 300 a 1000 m.s.n.m. se encuentra asociada a bosques tropicales caducifolio, subcaducifolio y perennifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña y bosques de encino y de pino.



**Figura 1.** *Senna skinneri* (Bentham, Irwin & Barneby)



**Figura 2.** ■ Distribución geográfica de *S. skinneri* (Bentham, Irwin & Barneby).

En la actualidad existe un interés internacional para sistematizar la información y el uso de las plantas medicinales de cada región, a partir de trabajos etnobotánicos y de validación científica (Fusco et al., 2004).

## ANTECEDENTES

El género *Senna* ha sido estudiado desde el punto de vista fitoquímico y se han reportado los siguientes resultados:

En *S. siamea* se encontraron flavonoides, alcaloides, terpenoides y antraquinonas. Además, de que el extracto alcohólico de esta especie tiene efectos en el sistema nervioso central, el músculo liso y sobre la diuresis (Ingkaninan et al., 2000).

En la especie de *S. oblicua*, se encontró que el extracto de dicloro metano inhibe a *Mycobacterium tuberculosis*, además de que se aislaron dos naftopironas con propiedades antimicrobianas (quinguangulin y rubrofusarin) (James et al., 2004). Por otra parte en *S. obtusifolia* se ha reportado la presencia de las antraquinonas, emodin, physcion y rehein (Rogers et al., 2005).

En cuanto a *S. skinneri*, se han reportado diversas investigaciones entre ellas:

Arrieta y col. en 1999, reportaron del extracto metanólico de las hojas, la presencia de cuatro moléculas; el flavonol 5,7-dimetoxirutina y la aglicona 5,7-dimetoxiquercetina, D-3-O-metil-chiro-inositol y el 3,3', 4,5'-tetrahidroestilbeno. Estos compuestos fueron aislados por primera vez de una fuente natural. El estilbeno mostró actividad antibacteriana ante *Escherichia coli* y *Salmonella thyphimurium*.

En otro trabajo González y col. (2006) reportaron la presencia de taninos en la especie en una concentración de 2.5% y de fenoles, en un 6.9%. Además, Agnes y col. (2004) y Ku y col. (2005), reportaron, en investigaciones independientes, la presencia de piceatanol en bajas concentraciones, con actividad anticancerígena, antileucémica y antioxidante.

Cuando se habla de actividad antioxidante hay que recordar que existe oxidación de las biomoléculas debido a la formación de radicales libres, mediante procesos naturales, lo cual conduce a diversas enfermedades. Cabe

mencionar que los organismos fotosintéticos están expuestos a ambientes muy oxidativos, por lo que poseen un sistema antioxidante muy eficaz (Rivero y Betancort, 2006).

Debido a que se han realizado pocos estudios sobre la corteza de la especie y no se ha comprobado la actividad antimicrobiana de esta, es necesario, determinar científicamente que posee ésta actividad, conocer el principio o los principios activos de *S. skinneri*, conocer si presenta actividad antioxidante, siendo esta posiblemente una característica del género *Senna* y con ésta información validar su uso en la medicina tradicional, contribuyendo así al conocimiento de la especie.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana, antioxidante y toxicidad general del extracto metanólico de la corteza de *Senna skinneri* (Paraca).

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener el extracto metanólico de la corteza de *Senna skinneri* y su partición hexánica.
- Evaluar la actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica) del extracto metanólico contra cepas de importancia clínica.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), Concentración Bactericida Mínima (CBM), Concentración Funguicida Mínima (CFM) y Concentración Funguicida Media (CF<sub>50</sub>) de los extractos activos.
- Determinar el efecto de los extractos activos sobre la curva de crecimiento de una bacteria Gram positiva y una Gram negativa.
- Determinar la presencia de alcaloides y fenoles cualitativamente.
- Determinar la actividad antioxidante del extracto metanólico de la corteza de *Senna skinneri* y su partición hexánica.
- Evaluar la toxicidad general del extracto metanólico de la corteza de *Senna skinneri* y su partición hexánica.



## **METODOLOGIA**

### **1.- OBTENCIÓN DE LA CORTEZA**

La corteza de *S. skinneri* se compró con los vendedores del mercado de Sonora y fue determinada en el herbario IZTA por la Curadora Edith López Villa Franco (número de ejemplar IZTA-41884).

### **2.- OBTENCIÓN DEL EXTRACTO**

Para la obtención de los extractos herbales, se pusieron a macerar en metanol 329 g de corteza seca y triturada, el extracto metanólico se filtró y concentró a presión reducida, posteriormente se realizó una partición hexánica (Apéndice 1) (Domínguez 1979).

### **3.- BIOENSAYOS:**

#### **3.1. Actividad antibacteriana.**

##### **3.1.1. Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.**

Para la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana, se utilizó la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer (Koneman, 1985), realizando cada ensayo por triplicado. Los sensidiscos fueron impregnados con 2 mg del extracto, como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con 25 µg de cloramfenicol y como control negativo se emplearon sensidiscos impregnados con 10 µL del solvente empleado (Apéndice 2).

#### **Microorganismos a utilizar.**

Bacterias Gram-negativas: *Vibrio cholerae* No-01, *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislado de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislado de un caso clínico (estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxinas, serotipo Inaba), *Vibrio cholerae* CDC V12, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Enterobacter aerogenes*, donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán y

*Yersinia enterocolitica*, donada por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala (UNAM).

Bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Sacarina lutea* donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuaititlán.

### **3.1.2 Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.**

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos que presentaron actividad se utilizó la técnica de dilución en agar (Koneman, 1985). Cada ensayo se realizó por triplicado. Las concentraciones empleadas para cada bioensayo fueron: 0.0312, 0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL, como control positivo se utilizó cloramfenicol a diferentes concentraciones (0.001 - 0.15 µg/mL) y como control negativo se utilizó la mayor cantidad de metanol utilizada en las diluciones (Apéndice 3).

### **3.1.3. Efecto del extracto sobre la curva de sobrevivencia.**

Se utilizó una cepa bacteriana Gram positiva (*S. aureus*) y una Gram negativa (*V. cholerae* CC). Se monitoreó su crecimiento, en 9 tiempos durante 24 horas al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto (MIC, ½ MIC, CBM) y un grupo testigo (sin extracto) (Kubo et al., 1993, citado en Ávila, 1996). (Apéndice 4).

## **3.2. Actividad antifúngica.**

### **3.2.1. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.**

Se realizó según el método cualitativo de inhibición de crecimiento radial (Wang y Bun, 2002), utilizando sensidiscos impregnados con 2 mg del extracto, como control negativo se utilizaron sensidiscos impregnados con 10 µL de metanol y como control positivo se utilizaron discos con 10 µg de Ketoconazol, cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice 5).

### **Microorganismos a utilizar.**

*Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium sporotrichum* (ATTC NRLL 3299), *Fusarium moniliforme* (donadas por el Dr. César Flores Ortiz, laboratorio de fisiología UBIPRO – FES – Iztacala) y *Rhizoctonia solani* (donada por el Dr. Raúl Rodríguez, INIFAP – Celaya).

### **3.2.2. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.**

Para la determinación de la  $CF_{50}$  y CFM se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Como medio de cultivo se empleó agar de papa dextrosa. Las concentraciones para cada bioensayo fueron: 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mg/mL, todos los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 6).

Para la evaluación cuantitativa ( $CF_{50}$  y CFM) del efecto de los extractos sobre hongos levaduriformes se utilizó la técnica de dilución en agar (Koneman, 1985) empleando caldo sabouraud y agar papa dextrosa (PDA).

## **4. CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN ACTIVA**

En principio se realizó una cromatografía de filtración en gel (Sephadex LH 20), (Apéndice 7). Una vez obtenidas las alícuotas para la agrupación en fracciones, se procedió con el análisis de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), utilizando un cromatografo Hewlett-Allsphere ODS-1 de 250x4.6mm; el eluyente fue una mezcla de Metanol, Acetonitrilo, Agua (25:25:50 v/v/v), a un flujo de 1mL/min; el sistema se llevo a cabo de manera isocrática. La lectura se hizo a una longitud de onda de 280 nm a una temperatura de  $23 \pm 1$  ° C.

Posteriormente a la fracción con actividad antibacteriana se le realizaron pruebas cualitativas (presencia de alcaloides y fenoles) y cuantitativas (fenoles totales).

### **4.1 PRUEBA CUALITATIVA PARA LA DETECCIÓN DE ALCALOIDES**

Se utilizó el método cualitativo para alcaloides con los reactivos Dragendorff y Mayer (Wagner, 2001) (Apéndice 8).

## **4.2 PRUEBA CUALITATIVA PARA LA DETECCIÓN DE FENOLES**

Fue empleado el método cualitativo para fenoles utilizando una solución de cloruro férrico (FeCl<sub>3</sub>) al 1% (Dey y Harborne, 1989) (Apéndice 9).

## **4.3 CONTENIDO TOTAL DE FENOLES.**

La concentración de fenoles totales se midió por espectrofotometría en base a una reacción colorimétrica de oxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utilizó fue el reactivo de Folin-Ciocalteu (Método modificado de Vernon et al., 1999) (Apéndice 10).

## **5. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.**

Para evaluar la actividad antioxidante se utilizó el método de decoloración del 2,2 difenil-1-picrilhidracil (DPPH) 10 µM (Apéndice 11). A partir de una solución stock de 10mg de extracto disueltos en 10mL de metanol, se prepararon las siguientes diluciones; 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 ppm. Como control negativo se utilizaron pozos con 200µL de MeOH y como control positivo se utilizó quercetina a las mismas concentraciones que el compuesto problema. Los resultados se reportaron obteniendo el porcentaje de reducción que se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C-E/C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del control positivo.

E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPPH + compuesto problema).

Por medio de espectrometría UV-VIS a una longitud de onda de 517 nm, este método permite evaluar la actividad antioxidante, através del grado de decoloración de una solución metanólica de DPPH debido a la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-20 ppm) (Rivero y Betancort, 2006).

## **6. TOXICIDAD GENERAL.**

El ensayo se realizó por triplicado con larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach), colocando 10 larvas en frascos de vidrio transparente con 10mL de solución de NaCl al 0.5 %, cada uno. Las concentraciones del problema a ensayar fueron 1000, 100 y 10 µg/mL. Como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), el cual fue el solvente empleado para disolver el problema. Los cultivos se mantuvieron bajo luz blanca durante 24 horas a temperatura ambiente (23-25 °C). Posteriormente las larvas sobrevivientes fueron cuantificadas. Finalmente se obtuvo la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) para cada extracto, interpolando en gráficas de porcentaje de sobrevivencia contra la concentración en µg/mL, a través del análisis de regresión lineal (McLaughlin, 1991), (Apéndice 12).

## RESULTADOS Y ANÁLISIS

En el cuadro 1 se muestran los datos generales de la especie:

Cuadro 1. Datos generales de *S. skinneri*

<b>Familia</b>	Leguminosae
<b>Nombre científico</b>	<b><i>Senna skinneri</i></b>
<b>Nombre común</b>	Paraca
<b>Número de registro</b>	41884
<b>Parte utilizada</b>	Parte aérea
<b>Forma de uso</b>	Infusión

### Rendimiento del extracto

El rendimiento del extracto metanólico de la corteza de *S. skinneri* (Paraca) fue de 88.82 g. De la partición del extracto, la fase metanólica obtuvo un mayor rendimiento (81.27 g) y la fase hexánica obtuvo un rendimiento de (4.62 g) (Cuadro 2). Esto es debido a que las cortezas están constituidas principalmente de compuestos polares como por ejemplo: aldehído cinámico, propenilbencenos, cumarinas, fenilpropanos, prelignanos, lignanos, ligninas, flavonoides, taninos, etc. (Preston, 1974).

Cuadro 2. Rendimiento de las particiones del extracto metanólico de *S. skinneri*

Partición	Peso (g).	%
Metanólica (polar)	81.27	24.7
Hexánica (no polar)	4.62	1.4

El % se calculó con respecto a 328.9 g de corteza.

### Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que el extracto hexánico no presentó actividad antibacteriana, sin embargo el extracto metanólico de *S. skinneri* es activo ante 7 de las 13 cepas bacterianas probadas (4 Gram positivas y 3 Gram negativas), siendo *S. lutea* la que mostró los halos de inhibición más grandes ( $21.66 \pm 2.08$  mm) y *V. cholerae* INDRE 206 la que mostró los halos de inhibición más pequeños ( $10.66 \pm 1.52$  mm) (Figura 3).

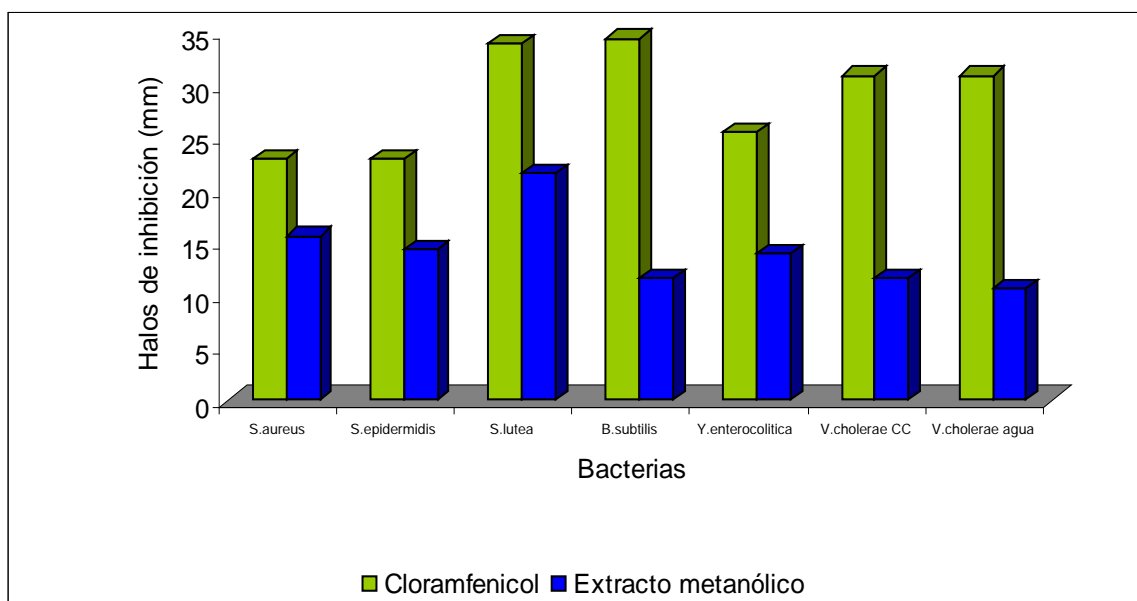


Figura 3. Actividad Antibacteriana del extracto metanólico, de la corteza de *Senna skinneri*.

Las bacterias que presentaron los mayores halos de inhibición son; *S. lutea*, *S. aureus* y *S. epidermidis*.

Como se puede observar en la figura 4, las bacterias Gram positivas ( $15.83 \pm 3.82$  mm) presentaron mayores halos de inhibición que las bacterias Gram negativas ( $12.11 \pm 1.69$  mm), encontrándose diferencias significativas entre estas según el análisis de ANOVA ( $F=31.98$ ;  $p<0.05$ ).

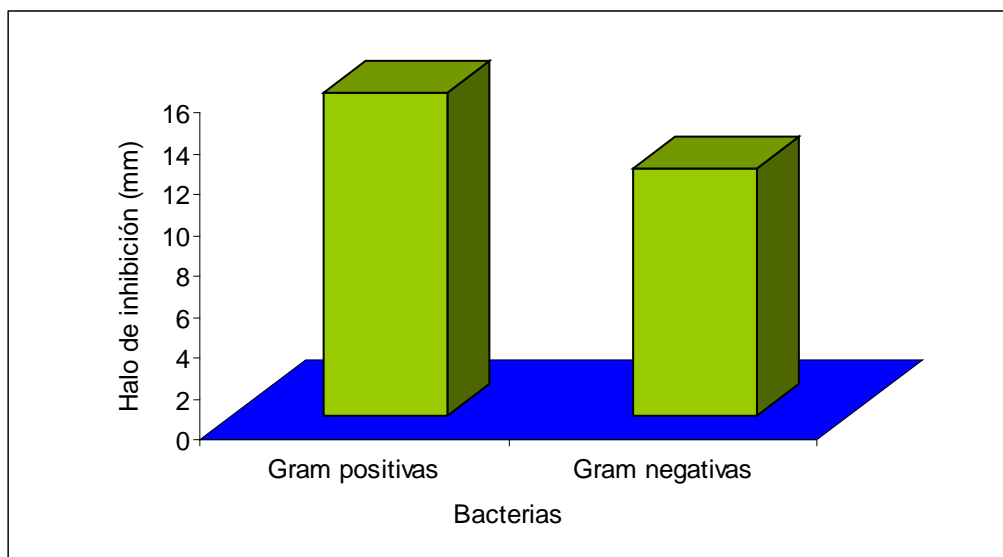


Figura 4. Efecto del extracto metanólico de *S. skinneri* sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

#### **Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana**

En estos resultados se observa que las bacterias más sensibles al extracto metanólico de la corteza de *S. skinneri* fueron *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. lutea* ya que se requieren concentraciones iguales a 0.125 mg/mL para inhibir drásticamente su crecimiento, mientras que *V. cholerae* CC y *Y. enterocolitica* son las que presentaron mayor resistencia ya que requieren de 0.75 mg/mL para inhibir drásticamente su crecimiento, entonces, con estos datos se puede determinar que, las bacterias Gram positivas son más sensibles al efecto del extracto metanólico que las Gram negativas ya que se requieren concentraciones menores para inhibir su crecimiento (Figura 5).



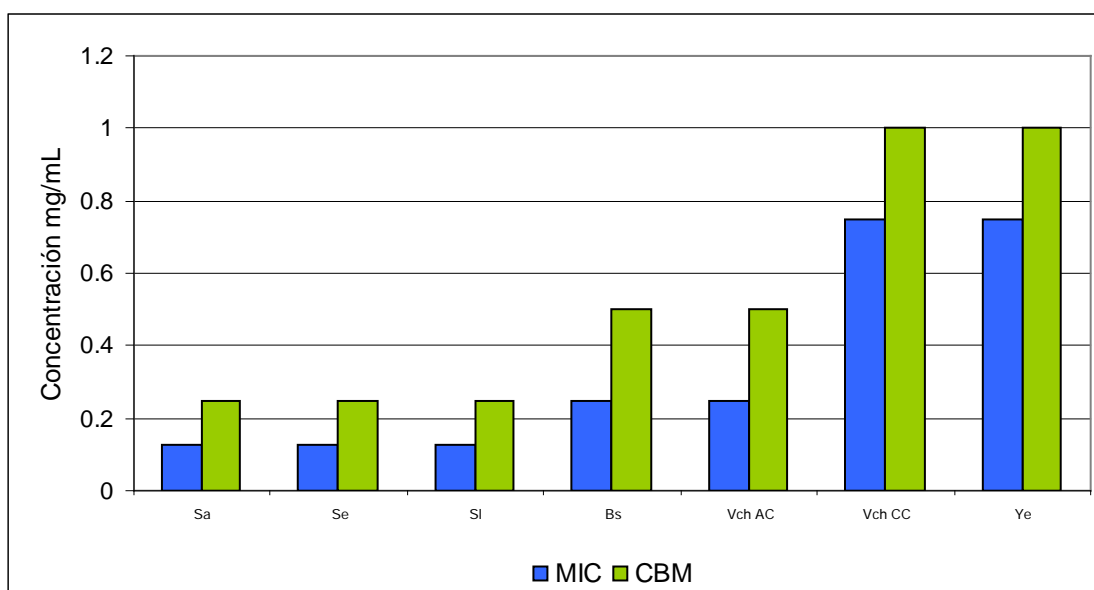


Figura 5. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM).

Simbología: Sa: *S. aureus*; Se: *S. epidermidis*; Sl: *S. lutea*; Bs: *B. subtilis*; Vch AC: *V. cholerae* agua; VchCC: *V. cholerae* caso clínico; Ye: *Y. enterocolitica*. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### Curvas de sobrevivencia bacteriana

En las figuras 6 y 7 se muestra el efecto del extracto metanólico de *S. skinneri* sobre el crecimiento bacteriano de *S. aureus* y *V. cholerae* CC. Tal efecto es bacteriostático a dosis iguales o menores a la CMI. Sin embargo, se observa un efecto bactericida a concentraciones iguales a CBM, lo cual se refleja en una curva de supervivencia del tipo de impactos múltiples (alteraciones en alguna o algunas vías metabólicas) en la que antes de hacerse lineal con pendiente negativa presenta un comportamiento que pareciera no tener cambios significativos, en cuanto al número de sobrevivientes. Lo anterior pudiera deberse a que en cada organismo viable deben producirse varios impactos antes de perder dicha viabilidad. La cinética para el caso de *S. aureus* y *V. cholerae* CC es de 21 y 20 impactos respectivamente. En las curvas de CBM no se aprecia muerte celular significativa en las primeras horas y se incrementa a partir de las 8 y hasta las 12 h, tiempo en el cual, a esa concentración ya no hay UFC vivas.

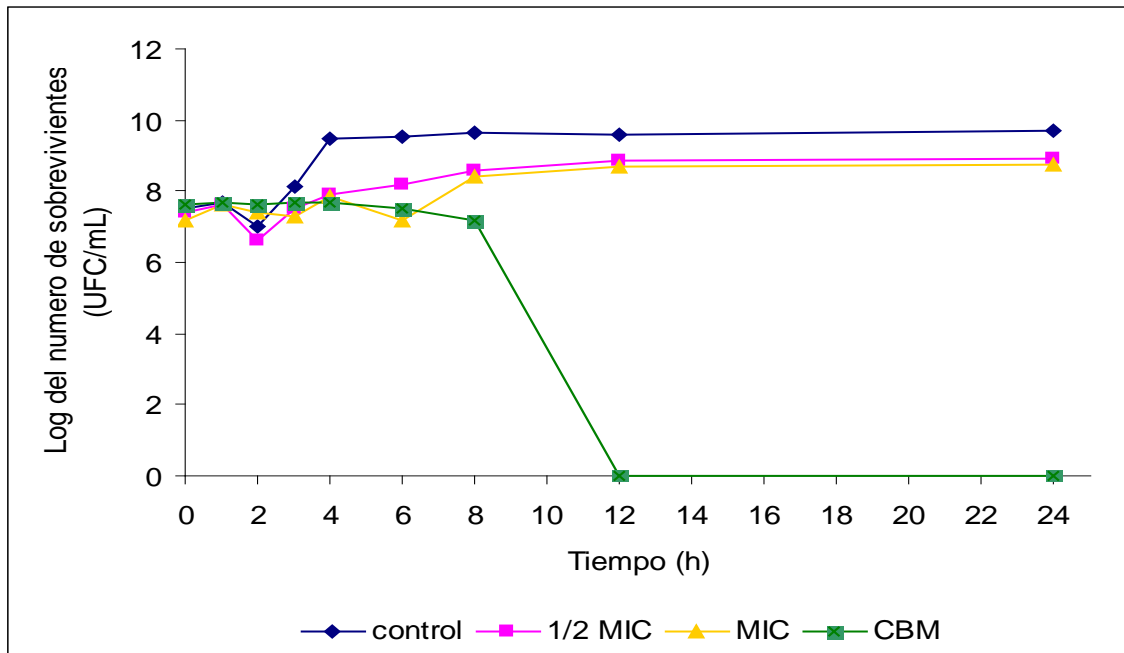


Figura 6. Efecto del extracto metanólico de *S. skinneri* sobre las curvas de sobrevivencia de *S. aureus*.

Simbología: UFC: unidades formadoras de colonias; h: horas; ½ MIC= 0.0625mg/ml; MIC= 0.125 mg/ml; CBM = 0.25 mg/ml.

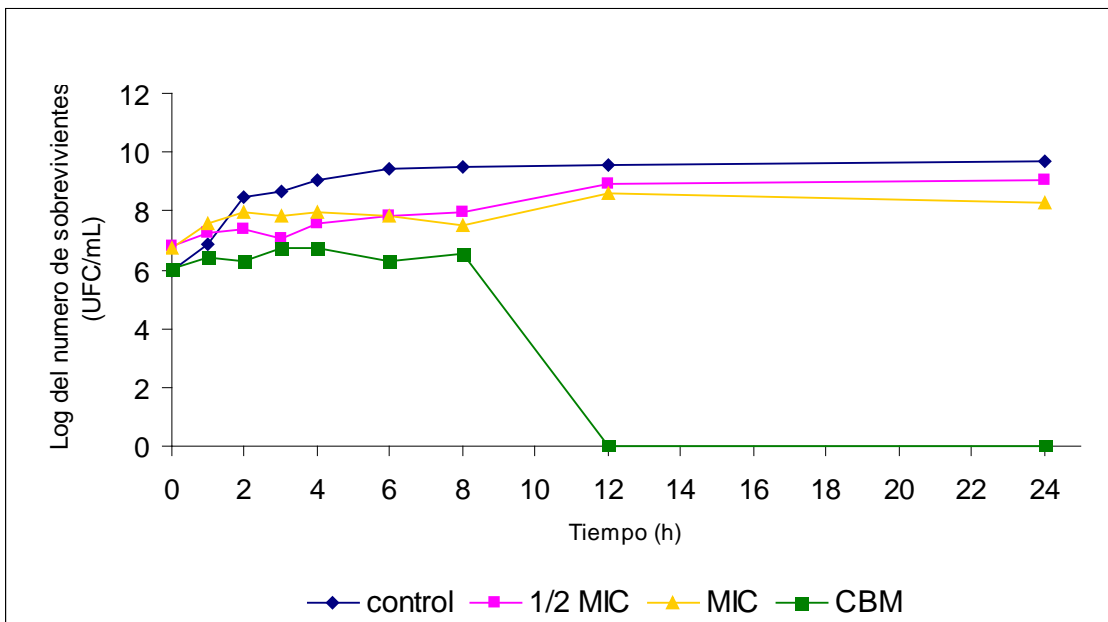


Figura 7. Efecto del extracto metanólico de *S. skinneri* sobre las Curvas de sobrevivencia de *V. cholerae* CC.

Simbología: UFC: unidades formadoras de colonias; h: horas; ½ MIC= 0.375g/ml; MIC= 0.75mg/ml; CBM= 1.0mg/ml.

### Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica

En la realización del ensayo cualitativo se pudo observar que de los 6 hongos probados sólo 2 fueron sensibles ante el extracto metanólico de la corteza de *S. skinneri*, estos fueron *F. moniliforme* y *T. mentagrophytes*.

### Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica

Los resultados obtenidos del ensayo muestran la sensibilidad de cada hongo al extracto metanólico, se observa que *T. mentagrophytes* es más sensible al extracto inhibiendo el 100% de su crecimiento a una concentración de 1.5 mg/mL en comparación de *F. moniliforme* que a esa misma concentración se inhibe solo el 62% de su crecimiento (Figura 8).

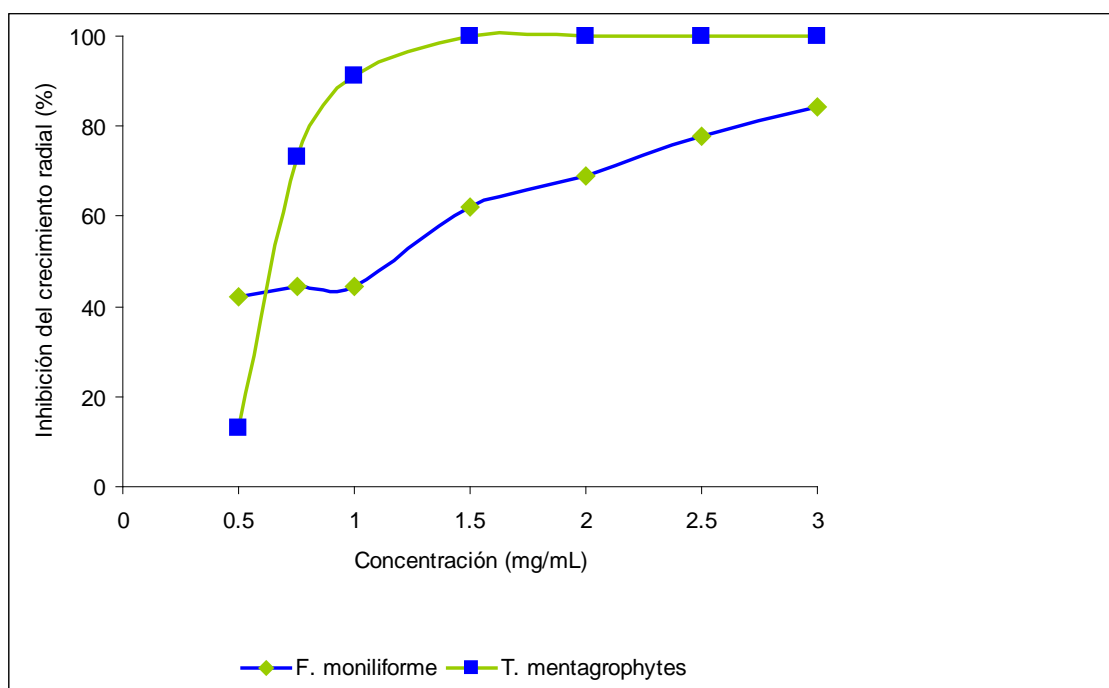


Figura 8. Efecto del extracto metanólico de la corteza de *Senna skinneri* sobre la inhibición del crecimiento radial.

Los resultados del control positivo se muestran en la figura 9, donde es evidente que la sensibilidad de los hongos es similar a la presentada en el extracto de la corteza de *S. skinneri*, ya que *T. mentagrophytes* es más

sensible al ketoconazol que *F. moniliforme*, con CFM de 0.97 y 28.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

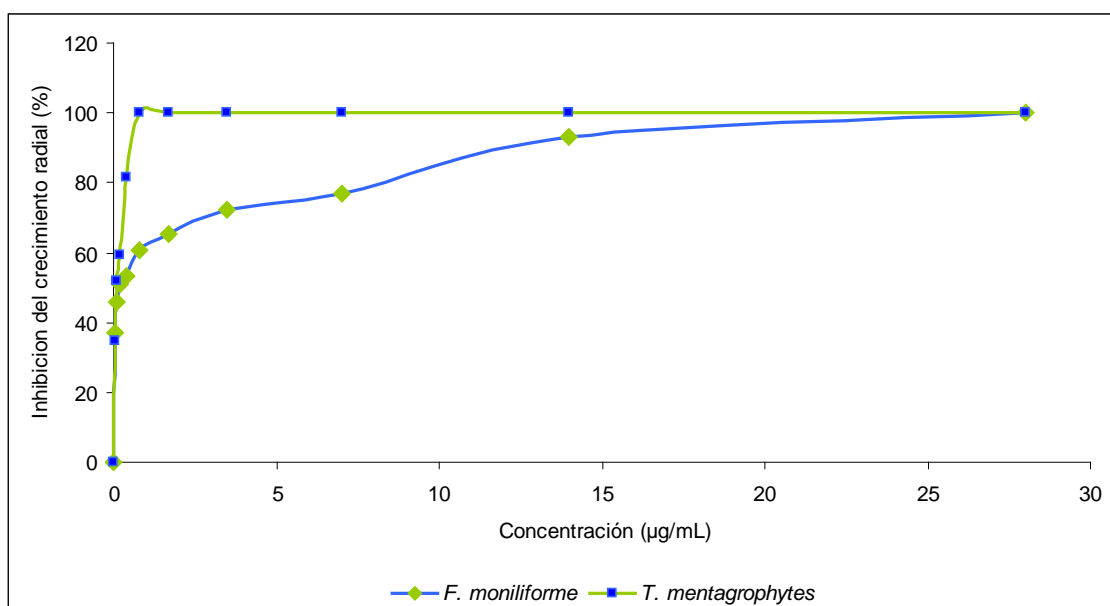


Figura 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del ketoconazol (control positivo).

Con respecto al control positivo (Figura 9) las concentraciones del extracto son elevadas; sin embargo, hay que tomar en cuenta que el extracto constituye una mezcla donde, el o los principios activos pueden estar en concentraciones muy pequeñas y es por ello que se requiere mayor concentración para obtener el efecto (Domínguez, 1979).

Cuadro 3. Concentración fungicida mínima y concentración fungicida media de los hongos sensibles al extracto metanólico de *S. skinneri*.

Hongo	Ketoconazol ( $\mu\text{g/mL}$ )		Extracto metanólico ( $\text{mg/mL}$ )	
	CF <sub>50</sub>	CFM	CF <sub>50</sub>	CFM
<i>F. moniliforme</i>	0.240	28.00	1.025	3.76
<i>T. mentagrophytes</i>	0.875	0.972	0.630	1.50

## CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN ACTIVA

De la cromatografía de filtración en gel (Sephadex LH 20), se obtuvieron 60 alícuotas de 5 mL cada una. Con el análisis de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se obtuvieron únicamente 4 fracciones, a las cuales se les evaluó la actividad antimicrobiana sobre *S. aureus*, (cuadro 8).

Cuadro 4. Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas de la cromatografía por filtración en gel.

Fracción	Alícuotas agrupadas	Halo de inhibición en <i>S. aureus</i> (mm)
1	1-9	16,0 ± 0.0
2	10-50	12,0 ± 0.0
3	51-57	10,0 ± 0.0
4	58-60	Na

Na: No activa

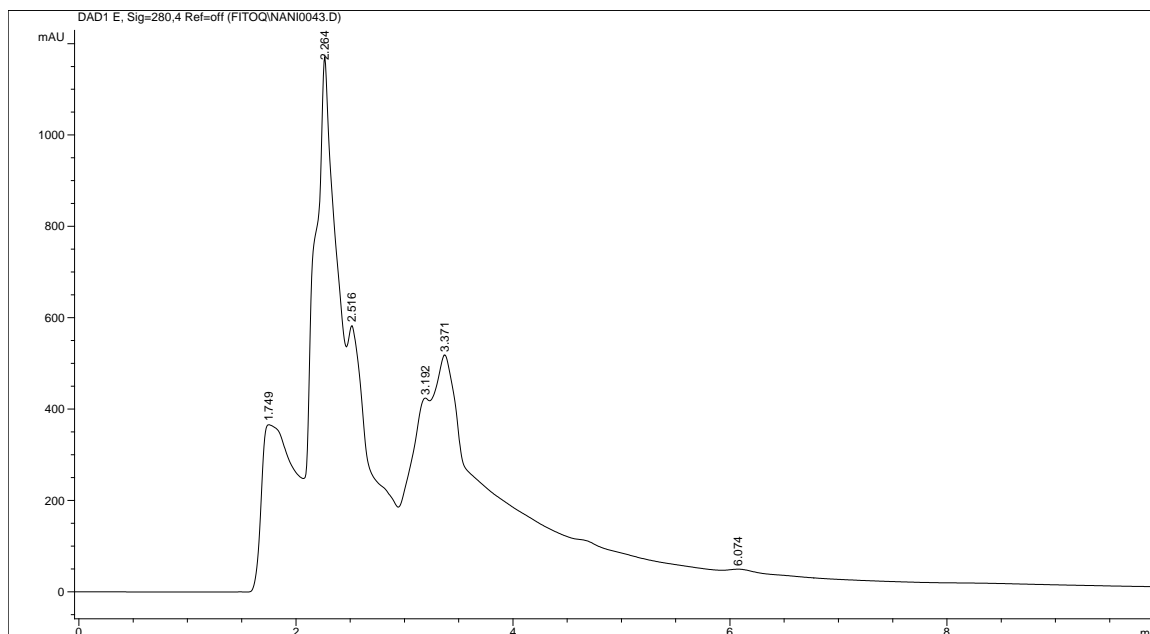


Figura 10. Cromatograma (HPLC) de la fracción activa (F1) de la corteza de *S. Skinneri*.

Como se puede observar la fracción que presentó los mayores halos de inhibición fue la F-1, la cual dio positiva para alcaloides y fenoles.

En la determinación de fenoles totales se encontró que la F-1 está constituida en un 60% de fenoles. (0.6 g por gramo de extracto).

En la figura 10 se pueden apreciar 6 picos, todos ellos con el pico máximo de absorción = 280 nm, se sabe que este valor es característico de fenoles.

### **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**

El porcentaje de reducción del DPPH del extracto metanólico de la corteza de *S. skinneri* se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 5. Porcentaje de reducción de la absorbancia del DPPH del extracto de *S. skinneri*.

<b>Concentración final (ppm)</b>	<b>Porcentaje de reducción de la quercetina</b>	<b>Porcentaje de reducción de <i>s. skinneri</i></b>
2	33.0	22.84
4	47.0	29.15
6	57.8	35.64
8	79.8	50.04
10	88.9	57.61
12	90.4	58.74
14	90.3	59.08
16	91.1	53.94
18	92.6	54.02
20	91.3	51.39

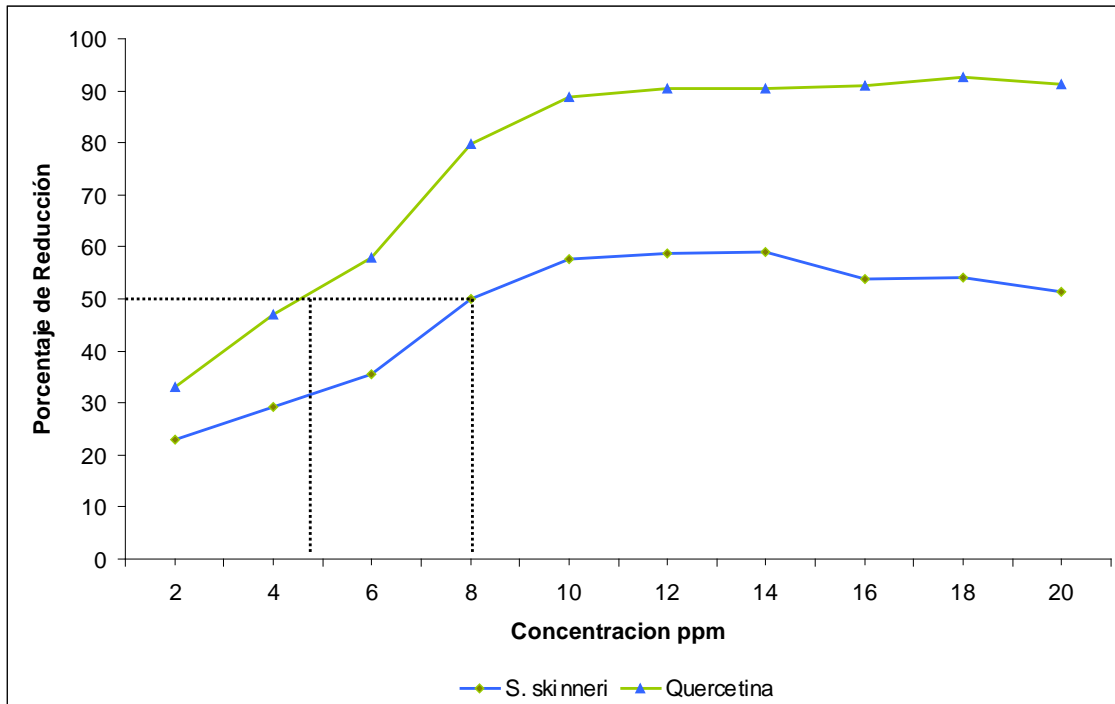


Figura 11. Porcentaje de reducción del extracto de *Senna skinneri*.

En la figura 11, se observa que el 50% de reducción se logra a una concentración de 8 ppm, que comparado con el control positivo se puede considerar un valor adecuado ya que el valor de la quercetina CE<sub>50</sub> es de 5.3 ppm y es considerada como un buen antioxidante.

### TOXICIDAD GENERAL

Los resultados obtenidos en la evaluación para toxicidad general del extracto metanólico de la corteza de *S. skinneri* se observan en el cuadro 10.

Cuadro 6. Porcentaje de sobrevivencia de *Artemia salina* a diferentes concentraciones (ppm) del extracto de *Senna skinneri*.

Concentración (ppm)	Promedio de Sobrevivientes	% Sobrevivientes
CONTROL	10	100
10	4.7	46.7
100	3	30
1000	0	0

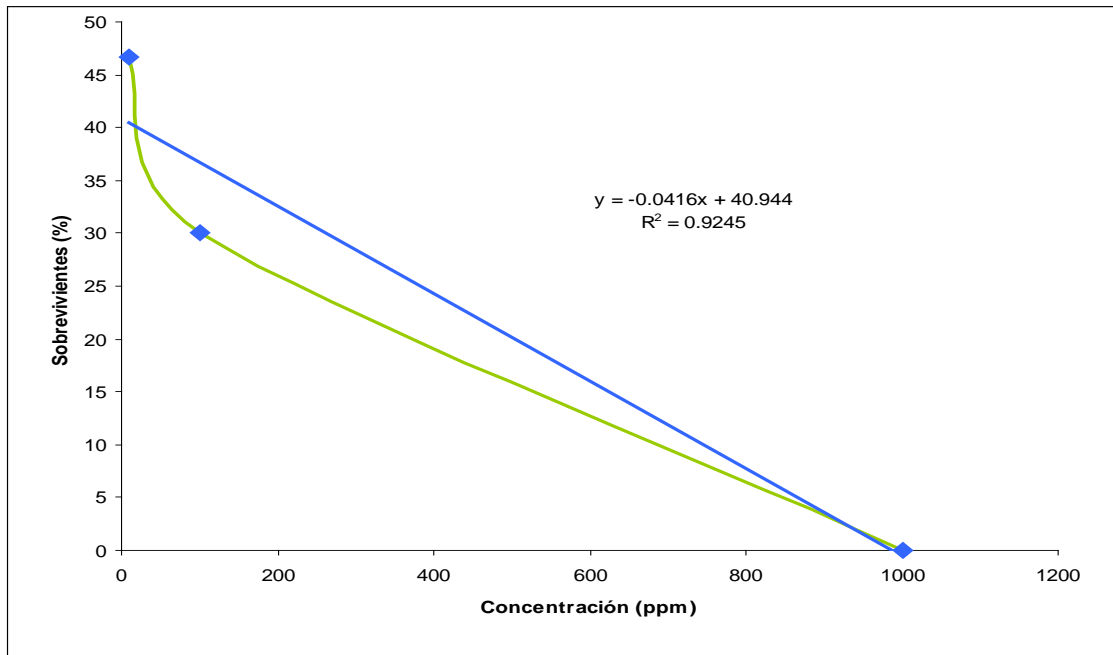


Figura 12. Porcentaje de sobrevivencia de *Artemia salina* a diferentes concentraciones (ppm) del extracto de *S. skinneri*.

Como se observa en la Figura 12 el extracto metanólico de la corteza de *S. skinneri* presentó una toxicidad general alta, ya que se requieren concentraciones menores a 10 ppm para que sobreviva el 50% de la población.



## DISCUSIÓN GENERAL

El rendimiento del extracto metanólico de la corteza de *S. skinneri* (Paraca) fue de 88.82 g, a partir de 328.9 g de corteza. De la partición del extracto, la fase metanólica obtuvo un mayor rendimiento con 81.27 g mientras que la fase hexánica obtuvo solamente 4.62 g, esto indica que la mayoría de los componentes son de origen polar. Respecto a esto Preston en 1974 menciona que la mayoría de las cortezas se componen por: aldehído cinámico, propenilbencenos, cumarinas, fenilpropanos, prelignanos, lignanos, ligninas, flavonoides, taninos entre otras sustancias más, las cuales son polares, por lo que esta información explica el rendimiento encontrado.

En relación a la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana, el extracto metanólico de *S. skinneri* presentó actividad en ambos tipos de bacterias, 4 Gram positivas y 3 Gram negativas, siendo *S. lutea* la cepa con halos de inhibición más grandes ( $21.66 \pm 2.08$  mm) y *V. cholerae* (INDRE 206 aislado de agua contaminada) fue la que mostró los halos de inhibición más pequeños ( $10.66 \pm 1.52$  mm). Cabe mencionar que el tamaño de los halos es solo un dato cualitativo, que indica si hay o no actividad antibacteriana. Es por esto que una vez realizadas las pruebas cualitativas se procede a la evaluación cuantitativa, ya que arroja resultados más precisos y confiables. Con estos resultados podemos saber las concentraciones, tanto del extracto como del control positivo, a las cuales se inhibe drásticamente su crecimiento (CMI) y a las cuales ya no crecen bacterias (CBM) (Alvarado, 2007). En los resultados obtenidos se observa que las bacterias más sensibles al extracto metanólico de la corteza de *S. skinneri* son; *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. lutea* con una CMI de 0.125 mg/mL y que las más resistentes al mismo son *V. cholerae* CC y *Y. enterocolitica* (CMI= 0.75 mg/mL).

En general las bacterias Gram positivas presentaron mayores halos de inhibición ( $15.83 \pm 3.82$  mm), que las bacterias Gram negativas ( $12.11 \pm 1.69$  mm) encontrándose diferencias significativas entre estas ( $F=31.98$ ;  $p<0.05$ ). Esto puede ser debido a que se sabe que una bacteria gram negativa,

presentaría mayor resistencia frente al extracto que es casi en su totalidad de origen polar, ya que estas bacterias además de presentar una membrana interna, tiene en su estructura otra externa, separadas por una capa delgada de peptidoglucano. Ambas membranas por ser hidrofóbicas impiden que los compuestos polares del extracto puedan ser transportados al interior de la bacteria para ejercer su efecto. En cambio las gram positivas solo por tener una gruesa capa de peptidoglucano, seguida de una membrana interna, permiten con mayor facilidad una penetración de sustancias al interior de la bacteria, ocasionándole pérdida de la estabilidad o alteración en alguna vía metabólica, según el mecanismo de acción de el o los compuestos activos. Prescott y colaboradores en 1999 mencionan que las bacterias gram positivas son más sensibles a los metabolitos de naturaleza polar, dejando difundir con mayor facilidad sustancias hidrofílicas. Tales sustancias también pueden interaccionar con los constituyentes de la capa de peptidoglucano que son de naturaleza polar, por ser derivados de azúcares (Jehl et al., 2004).

En cuanto a el efecto del extracto metanólico de la corteza de *S. skinneri* sobre las curvas de sobrevivencia, se observó para ambas bacterias (Gram positivas y Gram negativas), que concentraciones menores o iguales a CMI tienen un efecto bacteriostático, mientras que concentraciones mayores o iguales a CBM presentan un efecto bactericida, ocurriendo la muerte bacteriana a las 12 horas. En este caso se puede deducir que el efecto es multiimpacto, es decir que está afectando a diferentes estructuras de la bacteria no solo a un blanco, como se podría inferir si las gráficas mostraran una muerte en las primeras horas (Hernández, 2004 ).

El extracto metanólico presentó actividad antifúngica, en 2 cepas *F. moniliforme* y *T. mentagrophytes*, este último, en el análisis cuantitativo presentó mayor sensibilidad frente al extracto probado, logrando 100% de inhibición del crecimiento a una concentración de 1.5 mg/mL, mientras que en *F. moniliforme*, inhibe a esa misma concentración solo un 62%. Respecto al control positivo las concentraciones del extracto son elevadas, sin embargo hay que tomar en cuenta que en la mezcla del extracto, el o los principios activos pueden estar en

concentraciones muy pequeñas y es por ello que se requiere a nivel de extracto estos valores (Domínguez, 1979). Las dos especies sensibles al extracto son de importancia clínica. Argueta y Cano en 1994 señalan que la corteza se usa contra afecciones de la piel, lo cual se puede relacionar con el efecto sobre *T. mentagrophytes*. Estudios realizados por Kim et al., en 2004 y Rogers et al., en 2005 reportan la presencia de emodin en *S. obtusifolia* y en *S. tora*, además Kim et al. (2004) demuestran las propiedades antimicóticas del emodin. Debido a que estos metabolitos son comunes en el género *Senna*, (Harborne y William, 2000) es posible que el emodin también se encuentre en *S. skinneri*. Con respecto a las CFM y CF<sub>50</sub> de el extracto metanólico es evidente que *T. mentagrophytes* es más sensible que *F. moniliforme*.

En cuanto al aislamiento parcial, la fracción con mayor actividad presentó halos de inhibición de 16 mm, en la caracterización de esta fracción (1) se mostró que hay presencia de alcaloides y fenoles lo cual concuerda con otros estudios realizados para el género en años anteriores, tal es el caso de Ingkaninan et al, quienes en el 2000 reportaron la presencia de estos metabolitos en *S. siamea*.

En el cromatograma (HPLC) de la fracción activa, el valor del pico máximo de absorción, para todos, corresponde a 280 nm, que es característico de fenoles. En la cuantificación de fenoles totales se encontró la presencia de 0.75 equivalentes de ácido gálico. Si se convierte en porcentaje las unidades equivalentes de ácido gálico del presente extracto, nos muestra que la fracción activa (F-1) está constituida en un 60% de fenoles (0.6 g por gramo de extracto), en comparación con otros trabajos es un porcentaje muy alto ya que González y colaboradores en 2006 reportan 2.5 % de taninos y 6.9 % de fenoles en *S. skinneri*.

En lo referente al tipo de fenoles de la especie, Arrieta, en 1999 realizó un estudio fitoquímico de *S. skinneri*, donde reporta la presencia de rutina, quercetina y el piceatanol, estos compuestos fenólicos presentan en mayor o en menor grado propiedades antioxidantes, es decir tienen la capacidad de captar radicales libres (Arnao et al., 1998). En otras palabras los antioxidantes

son sustancias que detienen o previenen una cadena de propagación oxidativa, mediante la estabilización del radical generado (radical libre) (Treviño, 2009). Del mismo modo que Arrieta en 1999 y Agnes et al., 2004, reportan esta actividad, relacionándola con la presencia del piceatanol y la quercetina. En el presente estudio el extracto metanólico de *S. skinneri* presentó actividad antioxidante, logrando un 50% de reducción a una concentración de 8 ppm que, comparado con el control positivo y otras sustancias de la misma actividad, se puede considerar un valor adecuado, ya que por ejemplo el valor de la vitamina C es de 6 ppm (Cantú, 2001) y el de la quercetina es de 5.3 ppm para la CE<sub>50</sub>, esta última sustancia se han reportado anteriormente como un fuerte antioxidante (Ku et al., 2005). Sánchez y colaboradores en 1999 encontraron una relación directa entre el contenido de fenoles totales y la eficiencia antioxidante.

Finalmente, en la prueba de toxicidad general, el porcentaje de sobrevivencia es menor a un 50% en concentraciones menores a 10 ppm, por lo tanto según Mc Lauglil (1991), el extracto presenta una toxicidad general alta.

## CONCLUSIONES:

- El extracto metanólico de la corteza de *S. skinneri* (paraca) presentó actividad antibacteriana.
- Las bacterias Gram positivas son más sensibles al extracto metanólico de *S. skinneri*.
- El extracto metanólico de la corteza de paraca presentó actividad antifúngica.
- El hongo *T. mentagrophytes* es más sensible al extracto metanólico de la corteza de *S. skinneri* que el hongo *F. moniliforme*.
- La fracción activa del extracto metanólico de la corteza de *S. skinneri* (paraca) posee alcaloides y fenoles en su composición química.
- La corteza de paraca presentó actividad antioxidante.
- La corteza de *S. skinneri* (paraca) presentó una toxicidad general alta.
- Los resultados obtenidos validan científicamente el uso de *S. skinneri* en la medicina tradicional.

**APÉNDICE 1.**  
**Técnica de maceración**  
(Domínguez 1979).

Fueron macerados en 2 litros de metanol 350 g de corteza seca y molida de *Senna skinneri*, el extracto obtenido se filtró y se concentró a presión reducida, el proceso se realizó 3 veces. Los sólidos solubles se cuantificaron por diferencia de peso.

## APÉNDICE 2.

### Método de Difusión en Agar de Kirby-Baüer

(Vanden Berghe y Vlietinck, 1991)

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos, compuestos puros y de las fracciones obtenidas de las separaciones cromatográficas, la metodología es la siguiente:

#### **Medio de cultivo.**

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 estéril se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en un tubo con 10 mL de caldo Müller-Hinton y se descarga el material. El tubo de cultivo se incuba a 37°C de 18 a 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias/mL. El estándar 0.5 de MacFarland se prepara añadiendo 0.5mL de sulfato de bario a 99.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.36 N. La comparación de la turbidez entre el estándar y el caldo con el organismo en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales o en un espectrofotómetro (Spectronic 21 Milton Roy) a 640 nm (Hendrickson, 1987 citado en Goldhaber, 2004).

Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina hasta igualarla. Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlo 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 Müller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance la temperatura ambiente, es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se siembra mediante estría en al menos tres direcciones, girando la placa en ángulos de 60° después de cada estría.

Se permite que la capa de bacterias se adhiera a la superficie de agar durante un periodo de 5 minutos, después se aplican los sensidiscos con las muestras a las cuales se les evaluará su actividad antibacteriana. Una vez seco el inóculo, la placa de Müller-Hinton está lista para la aplicación de las muestras a las que se les evalúa la actividad antibacteriana.

#### **Aplicación de sustancias.**

Para este caso se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman No.5. En todos los casos se hacen diluciones para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada del producto. Se utilizan 2 mg de los extractos disueltos en 10 mL del solvente correspondiente a cada extracto. Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril y deben colocarse por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa, Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración de cada extracto a evaluar. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo.



### **Preparación de muestras.**

En cuanto a la evaluación de las fracciones, los sensidiscos se impregnan con soluciones valoradas de las muestras hasta llegar a la concentración deseada de sustancia por disco; en este caso, se utilizan diferentes solventes para solubilizar los compuestos y posteriormente impregnar los discos con 2mg cada uno, dejando evaporar el solvente durante 12 horas.

### **Controles negativos.**

A estos discos se les agrega 10  $\mu$ L del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 24 horas (al igual que los experimentales).

### **Control positivo.**

Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos impregnados con 25  $\mu$ g de cloramfenicol (Barry y Thornsberry, 1987 citados en Goldhaber, 2004).

### **Incubación.**

Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 37°C sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>. Es preciso evitar presión de CO<sub>2</sub> debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del 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 negativo.

### **Interpretación de resultados.**

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

### **APÉNDICE 3.**

#### **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).**

##### **Método Modificado de Macrodilución en Agar**

(Koneman 1985).

##### **Preparación de reactivos y diluciones.**

La solución antimicrobiana de trabajo se prepara diluyendo la cantidad correspondiente de la fracción en agar de Müller Hinton, para obtener la concentración final deseada. La prueba se realiza en cajas de petri. Las concentraciones utilizadas son 0.075, 0.125, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL. En cada caja se colocarán 5 mL de agar con la concentración del extracto correspondiente. Cada ensayo se realiza por triplicado.

##### **Inoculación e incubación.**

Se prepara un inóculo que contenga  $10^5$  UFC/mL (unidades formadoras de colonia/mL) agregando a cada caja 0.1 ml de este inóculo. Incubar las cajas a 35 °C durante 16 a 20 horas. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO<sub>2</sub> a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo.

##### **Interpretación de resultados.**

La menor concentración de antimicrobiano a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la concentración que produce una inhibición completa del desarrollo representa la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

## APÉNDICE 4

### Curva Letal (curva de supervivencia y efecto sobre el crecimiento)

(Kubo 1993 et al., citado en Ávila, 1996)

1. Preparar y rotular por lo menos un tubo con el extracto problema, para muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de dos horas, hasta las primeras ocho horas. A partir de este muestreo, se preparan tubos para realizar lecturas cada seis horas.
2. Preparar y rotular un tubo sin antídoto que sirva como control del desarrollo.
3. Preparar el inóculo, con aproximadamente  $1 \times 10^8$  bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL del caldo Muller- Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 12-18 horas de incubación).
4. Inocular, con ayuda de una micropipeta, 0.1 mL de la suspensión de bacterias en los tubos que contienen el antimicrobiano, el cual estará a una concentración igual a la concentración bactericida mínima y sus múltiplos medios; esto es, la MIC, la mitad de MIC. La concentración final debe ser aproximadamente de  $1 \times 10^5$  bacterias/mL de caldo en cada tubo. Incubar en una estufa sin presión de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ .
5. Muestrear cada dos horas durante los primeros 4 tiempos ( $T_0-0, T_1-1, T_2-2, T_3-3, T_4-4$ ) (Tiempo-Horas transcurridas ), a partir del tiempo 5 se muestrea cada seis horas. Se realizan diluciones para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo, una vez incubadas durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ .
6. Se grafica el Log del número de sobrevivientes Vs. tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenas (Davis y Dulbecco 1996).

## **APÉNDICE 5**

### **Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos**

(Wang y Bun, 2002).

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas petri, que contienen 20 mL de agar Czapek, en el cual se inocula un botón de 0.5 cm de diámetro. Después que el micelio se ha desarrollado, los sensidiscos se colocan a una distancia de 5 mm del límite micelial.

#### **Incubación.**

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

#### **Control positivo.**

Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de Ketoconazol de 7 µg/disco.

#### **Interpretación de resultados.**

En caso de que existan zonas de inhibición el extracto se reporta como activo, en todos los casos esta prueba se realiza por triplicado.

## APÉNDICE 6

### **Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial de hongos**

(Wang y Bun, 2002)

#### **(Método Modificado por Serrano, 2007)**

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas petri, que contienen 20 mL de agar Czapek, con las siguientes concentraciones del extracto activo 0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL, posteriormente se inoculan 5 mm de diámetro de micelio del hongo a ensayar.

#### **Incubación.**

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

#### **Control positivo.**

Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de Ketoconazol a las siguientes concentraciones 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.70, 14.00, 28.00 µg/mL.

#### **Interpretación de resultados.**

Con una regla se medirá el crecimiento del hongo para calcular el porcentaje de inhibición. En todos los casos esta prueba se realiza por triplicado.

## **APÉNDICE 7**

### **Técnicas Cromatográficas**

#### **Cromatografía por filtración en gel**

La cromatografía por filtración en gel se utiliza para separar los compuestos con base al peso molecular de cada uno de ellos, obteniéndose entre las primeras fracciones los compuestos de mayor peso molecular y siendo los más pequeños los que se encuentren en fracciones finales de la filtración.

Se deja reposar un día antes algodón en hexano para evitar la formación de otros compuestos que pueden ser revelados en la cromatografía de capa fina y que, en realidad, no corresponden a la muestra que se desea separar.

Como fase estacionaria se utiliza sephadex LH20 el cual se hidrata antes de ser utilizado. Para separar una muestra de 500 mg, se coloca en un vaso de precipitados 5 g de sephadex, al cual se le agrega agua por arriba del nivel que ocupa en el vaso.

Posteriormente se monta la columna colocando en la punta de la columna el algodón (4 cm aproximadamente) el cual debe estar muy compacto, después se agrega el gel sephadex hidratado el cual debió ser lavado 2 o 3 veces con el solvente del extracto que presentó mayor actividad, para evitar la formación de burbujas en la columna. Una vez contenido en la columna se vuelve a lavar 2 o 3 veces más. Finalmente, se agrega la muestra del extracto una vez solubilizada y agregando constantemente solvente para evitar así que se seque la columna se comienzan a obtener las diferentes fracciones, las cuales se analizan en cromatografía de capa fina para agrupar aquellas que sean semejantes, es decir, que posean los mismos compuestos.

## APÉNDICE 8

### Método Cualitativo para Alcaloides.

#### Reactivo Dragendorff, Mayer

(Wagner, 2001).

Por la gran heterogeneidad de los alcaloides aparecen numerosas pruebas coloridas o de precipitación que sólo son positivas con ciertos grupos de alcaloides, por lo que se han propuesto, para clasificaciones parciales; aunque no son suficientes para una identificación definitiva.

Reactivos generales de alcaloides (reactivo de Mayer). Se disuelven 1.36 g de  $\text{HgCl}_2$  en 60 mL de agua y 5 g de KI en 10 mL de agua. Se juntan las dos disoluciones y se aforan a 100 mL. El reactivo sólo debe añadirse a disoluciones previamente aciduladas con HCl o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluidos. La disolución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Sólo deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.

Reactivo de Dragendorff. Se disuelven 8.0 g de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  en 20 mL de  $\text{HNO}_3$  (dens 1.18, al 30 %) y 27.2 g de KI en 50 mL de agua. Se mezclan las dos disoluciones y se dejan reposar 24 horas. Se decanta la disolución y se afora con agua a 100 mL. Se usa sobre disoluciones aciduladas. Se puede recoger el precipitado anaranjado-marrón, liberar los alcaloides con solución de carbonato de sodio y extraerse con éter etílico o un disolvente similar.

Las anteriores disoluciones, preparadas en condiciones específicas, forman parte de los llamados reactivos de alcaloides, aunque los precipitados también pueden ser causados por proteínas, purinas, betaínas, cumarinas y algunos polifenoles. Como la ausencia de precipitados es indicativa de que no hay alcaloides, se usan estos reactivos como prueba presuntiva de su presencia.

## APÉNDICE 9

### Método Cualitativo para Fenoles.

Se emplea una solución de Cloruro Férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 1%

(Dey y Harborne, 1989)

La "prueba del cloruro férrico" es una prueba cualitativa tradicional para determinar la presencia de fenoles.

-Se utiliza una disolución al 1% de cloruro de hierro (III) la cual es neutralizada con hidróxido sódico hasta formar un ligero precipitado de  $\text{FeO}(\text{OH})$ . [4], que debe ser filtrada antes de usarla.

-La muestra del extracto se disuelve en agua, metanol o etanol según su solubilidad.

-Luego se añade la disolución neutra de cloruro férrico: una coloración transitoria o permanente (normalmente púrpura, verde o azul) indica la presencia de un fenol o enol.



## APÉNDICE 10

### Contenido Total de Fenoles.

(Método modificado de Vernon et al., 1999)

La concentración de fenoles totales se mide por espectrofotometría en base a una reacción colorimétrica de oxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Se prepara una curva de calibración con ácido gálico, (el ácido gálico es una pequeña molécula que por su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo OH. Se utiliza para evaluar la cuantificación de fenoles totales) (Aguilar, 1999).

Se utiliza una solución estándar de este (0.2 mg/mL). A partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se prepara una solución estándar (0.2 mg/mL), se toma una alícuota de 250 µL de esta y se agregan 750 µL de agua destilada, para obtener un volumen final de 1 mL a una concentración de 0.05 mg/mL.

Se toma 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfiere a un tubo de ensayo con 6 mL de agua destilada a continuación se adicionan 500 µL de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añaden 1.5 mL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL.

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se determina por triplicado.

Finalmente se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

## APÉNDICE 11

### Método de Reducción del Radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH).

(Rivero y Betancort 2006).

Por medio de espectrometría UV-VIS, este método permite evaluar la actividad antioxidante, ya que se mide el grado de decoloración de una solución metanólica de 2,2 difenil-1-picrilhidracil (DPPH) esto a causa de la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-20 ppm).

A partir de una solución stock de 10 mg de extracto disueltos en 10 mL de metanol, se preparan las diluciones a diferentes concentraciones (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20.) (Cuadro 9.1), cada concentración es multiplicada por 4 y el resultado es la cantidad que se toma de la solución stock para llevar a 1mL con MeOH grado HPLC, esto es para que al mezclar con la solución de DPPH las concentraciones finales sean las correspondientes.

Cuadro 9.1 valores correspondientes para cada dilución.

Stock (µL)	MeOH grado HPLC(µL)	Concentración final (ppm)
8	992	2
16	984	4
24	976	6
32	968	8
40	960	10
48	952	12
56	944	14
64	936	16
72	928	18
80	920	20

Posteriormente en una placa de ELISA se adicionan 50  $\mu\text{L}$  de solución problema a diferentes concentraciones (2-20 ppm) por triplicado, una vez colocados los 50  $\mu\text{L}$  son adicionados 150  $\mu\text{L}$  de solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 100  $\mu\text{M}$ ; inmediatamente se protege de la luz envolviendo la placa con papel aluminio, y se mantiene en agitación constante durante 30 minutos a 37°C. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA.

### **CONTROL NEGATIVO**

Pozos con 200  $\mu\text{L}$  de metanol.

### **CONTROL POSITIVO**

Se utiliza quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

### **INTERPRETACION DE RESULTADOS**

Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C-E/C) \cdot 100$$

En donde:

C= Absorbancia del control positivo.

E=absorbancia del experimental (Mezcla DPPH + compuesto problema).

**APÉNDICE 12**  
**Método de Toxicidad General**  
(McLaughlin, 1991)

Se lleva a cabo con larvas Nauplio II de *Artemia salina* (Leach), colocando 10 organismos en frascos de vidrio transparente con 10mL de una solución al 0.5% de NaCl; las concentración del problema a ensayar son 1000, 100 y 10 µg/mL.

**Control negativo**

Como control negativo se utiliza el solvente empleado para disolver el problema, en este caso dimetilsulfóxido (DMSO), se emplea el mismo volumen en que se disolvió la concentración más alta del extracto o compuesto a evaluar.

**Incubación**

Los cultivos se mantienen bajo luz blanca a una temperatura de 23-25 °C durante 24 horas.

**Interpretación**

Se cuenta el número de larvas sobrevivientes, es importante que estas se desplacen de la misma manera que las del grupo testigo.

La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) se determina para cada extracto interpolando en gráficas de porcentaje de sobrevivencia contra la concentración en µg/mL, a través del análisis de regresión lineal.

La actividad tóxica general se considera débil cuando la CL<sub>50</sub> se encuentra entre 500 y 1000 µg/mL, moderada cuando se encuentra entre 100 y 500 µg/mL, y fuerte entre 0 y 100 µg/mL (McLaughlin, 1991).

## Literatura Citada

- Agnes, M., Kalt, W., Magee, J., Dewey, J., Ballington, J.** (2004). Resveratrol, Pterostilbene, and Piceatannol in *Vaccinium* Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 4713-4719.
- Aguilar A, Camacho J. R., Chino S. V., Jacquez P., López M. E.** (1994). Plantas medicinales del herbario del IMSS. Instituto Mexicano del Seguro Social. México, pp 17-137.
- Aguilar C. N., Augur, C., González, V. G. y Favela T. E.** (1999). Efecto De los ácidos gálico y tánico en la producción de tanasa de *Aspergillus niger* Aa-20. México, D.F. 09340 México. pp 5.
- Alvarado, H, M.** (2007). Comparación de la composición y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Lippia Graveolens* H.B.K. en dos zonas de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Licenciatura. FESI UNAM. México, pp. 75.
- Argueta, V. A. y Cano, A. J.** (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Volumen 2. Instituto Nacional Indigenista. México. 11020p.
- Arnao, M.B., Cano, A.; Acosta, M.** (1998). Total anioxidant activity in plant material and its interest in food technology. *Recen.Res.Devel.in Agricultural and Food Chem*, 2.893-904.
- Arrieta, D., Zepeda, I., Jiménez, M.** (1999). Phytochemical studies on *Senna skinneri* and *Senna wislizeni*. *Natural Products Letters*. 13 (3): 223-228.
- Ávila J. G.** (1996). Actividad anti-Vibrio Cholerae de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de maestría. FES- Cuatitlán. UNAM. México.
- Cantú Cabello G. M.** (2001). Actividad antioxidante de 15 plantas nativas del Estado de Nuevo León. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas UANL. pp 55
- Davis B. D. y Dulbecco R.** (1996). Tratado de Microbiología. 4<sup>o</sup> ed. Ed. Davis B. D. y Dulbecco R. Eisen H. N. Ginsberg H. S. Masson S. A. México.
- Dey P. M. and Harborne J. B.** (1989). *Methods in Plant Biochemistry*. Volume1. Academic Press Limited. pp 552

- Domínguez, A. X.** (1979). Métodos de investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México, pp 189-200.
- Fusco, M. R., Petenatti E., Inostroza, P. N., San Martín B. A., Rivera L. P.** (2004). Principies Actives of *Ligaria cuneifolia*. A Medicinal Plant. Ciencia & Trabajo. 6(12): 79-82.
- Goldhaber, P.** (2004). Actividad antimicrobiana de *Piquería trinervia* Cav. Sobre algunas bacterias entero patógenas. Tesis Licenciatura. FESI UNAM. México. pp. 70-72.
- González, J., Ayala, A., Gutiérrez, E.** (2006). Determinación de fenoles totales y taninos condensados en especies arbóreas con potencial forrajero de la región de tierra caliente Michoacán, México. Livestock Research for Rural Development. 18 (11): 8.
- Harbone, J. B.** (1988). Introduction to Ecological Biochemistry, 3<sup>ra</sup> edition, Academic Press Harcourt Brace Jovanovich, publications Londres.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A.** (2000). Advances in favonoid research since 1992. Phytochemistry 55: 481-504.
- Hernandez D. C. T.** 2004. Etnobotanica y Actividad Antimicrobiana de Algunas Plantas Utilizadas en la Medicina Tradicional del Valle de Zapotitlan Salinas, Puebla. Tesis de Doctorado en Ciencias FESI. UNAM. México, pp. 163.
- Ingkaninan, K., Jezerman, A., Verpoorte, R.** (2000). Luteolin, a Compound with Adenosine A<sub>1</sub> Receptor-Binding Activity, and Chromone end Dihydronaphthalenone Constituents from *Senna siamea*. Journal of Natural Products. 63: 315-317.
- Jehl, F., Chomarar, M., Weber, M., Gérard, A.** (2004). Del Antibiograma a la Prescripción. Éditions Biomérieux. España, pp.136.
- James, G., Zhang, H., Pendland, L., Santarsiero, D., Mesecar, D., Cabieses, F., Farnsworth, R.** (2004). Antimycobacterial Naphthopyrones from *Senna obliqua*. Journal Natural Products. 67: 225-227.
- Kim, Y., Lee, C., Kim, H., Lee, H.** (2004). Anthraquinones isolated from *Cassia obtusifolia* (Leguminosae) seed shows an antifungal property against phytopathogenic fungi. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 6096-6100.
- Koneman E.W.** (1985), Diagnóstico microbiológico. Editorial Panamericana.

México DF, pp. 386-393.

**-Ku, K., Chang, P., Cheng, Y., Lien, C.** (2005). Production of Stilbenoids from the Callus of *Archis hypogaea*: a Novel Source of the Anticancer Compound Piceatannol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 3877-3881.

**-McLaughlin,** (1991). Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation. In: Dey, P. M., Harbone, J. B., Hostettman, K. (Ed.), *Methods in plant Biochemistry Assays for Bioactivity*. Vol. 6. Academic Press, U.S.A. pp. 1-32.

**-Prescot, M., Harley, P., Klein, A.** (1999). *Microbiología*. Cuarta edición. Mc Graw-Hill interamericana. España. pp.1005.

**-Preston, R. D.** (1974). *The Physical Biology of Plant Cell Walls*. Editorial. Chapman and Hall. México. pp. 491.

**-Rivero R. A. y Betancort R. J. R.** (2006). Evaluación de la actividad antioxidante de polifenoles de algas marinas. *Medicinal Chemistry*. pp. 10.

**-Rogers, E., Wu, Y., Evangelista, R., Vaughn, F., Raydford, W., Wilson, F.** (2005). Sicklepod (*Senna obtusifolia*) Seed Processing and Potential Utilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 4784- 4787.

**-Sanchez Moreno, C; Larrauri, J.; Saura Calixto, F.** (1999). Free radical scavenging capacity of selected red, rosé and white wines. *Journal Science of Food and Agriculture*. 79: 1301-1304.

**-Serrano, P. R.** (2007). Variación espacio temporal de metabolitos con actividad antifúngica de *Gymnosperma glutinosum*, (Spreng) Less. (Asteraceae), del valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, FESI. UNAM. México, pp. 113.

**-Trease G. E. y Evans W. C.** (1993). *Tratado de Farmacognosia*. 15º ed. Ed. Interamericana. México. pp 845.

**-Treviño N. J. F., Oranday C. A., Rivas M. C., Verde S. M. J., Núñez G. M. A. y Morales R. M. A.**(2009). Potencial antioxidante en Cactáceas. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. pp 1.

**-Vanden Berghe, D. A. & Vlietinck, A. J.** (1991). Screening methods for antibacterial agents from higher plants. In: Hostettman, K. (Ed). *Methods in Plant Biochemistry*. Assay for bioactivity, Vol. 6. Academic press, London, pp. 47-69.

**-Vernon, L. S., Rudolf, O. & Rosa M. L. R.** (1999). *Analysis of Total Phenols*



and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin—Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*, Vol., 299.152-178pp.

**-Wagner, H.** (2001). *Plant drug analyses*, Second Edition, edit. Springer. Germany, pp. 15-29.

**-Wang H. y Tzi Bun, N.** (2002). Isolation of an Antifungal Thaumatin-like protein from kiwin fruits. *Phytochemistry*. 61: 1-6.

**-Zamora, N.** (2001). *Especies de Costa Rica, Senna skinneri*. Instituto Nacional de Biodiversidad (Costa Rica). pp.3