



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

**Evaluación de algunas propiedades medicinales de  
*Argemone mexicana.***

T E S I S   P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

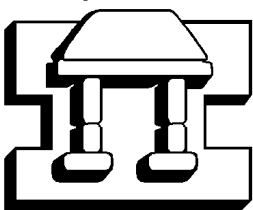
B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

JIMÉNEZ CANO MARÍA GUADALUPE

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO 2013



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.

## **RECONOCIMIENTO**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por:

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dr. César Mateo Flores Ortiz

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

M. en C. Ángel Durán Díaz

Biól. Luis Barbo Hernández Portilla

Para la realización de esta Tesis se contó con el apoyo de:

UNAM PAPIIT 218511-3

Plantas útiles de San Rafael, Coxcatlán (MGU/Useful Plants Project México).

*Dedicada con todo mi amor a: Sergio y Alan*

*Espero poder enseñarles a no renunciar a sus sueños jamás.*

*“Un gran guerrero, no es aquel que gana la batalla, si no el que vuelve a ella sin importar su desventaja”*

*Me desperté...*

*Un día me desperté dudando de mí, porque vi el sueño y me pareció una fantasía, porque vi el camino y no era recto; era un camino lleno de trabas y que aun con el paso firme podías tropezar en él.*

*Me desperté dudando de mí porque era débil, porque lograron herirme y me dolía un ala para volver alzar el vuelo y desde el suelo, el cielo parecía tan lejano e inalcanzable.*

*Me desperté dudando de mí, porque quise abrazar una estrella y ni siquiera su brillo toco mi piel.*

*Un día me desperté creyendo que jamás lograría llegar, que sin importar cuánto luchara la batalla ya estaba pérdida.*

*Y justo cuando pensaba que sería así, una voz muy dentro de mí me hizo mirar hacia delante y entonces note, que las piedras que había en el camino no eran muy pesadas y podía moverlas con mis propias fuerzas, que aunque mi ala estaba rota, sanaría y que uno jamás olvida como volar una vez que aprendió, que el cielo estaba ahí esperando por mí, que esa estrella sería mía y que yo la ayudaría a brillar a un mas y que no puedes dar por perdida una batalla si no has perecido en ella.*

*Entonces un día me desperté y decíde caminar de nuevo, para llegar al final...*

*Ma. Guadalupe Jimenez*

## **AGRADECIMIENTOS**

*A cada una de las personas que revisaron y enriquecieron con sus comentarios y aportaciones este trabajo, para hacerlo mejor.*

*A mi papá y mi mamá, por creer en mí cuando les di motivos para dudar, porque me impulsaron siempre a mantenerme en pie y estuvieron conmigo en los momentos más difíciles.*

*A mis hermanas Anabel y Mariela, por su cariño, ha sido un honor compartir con ustedes esta batalla y saben que cuando me necesiten ahí estaré.*

*A mi querido Jesús compañero de vida, y amigo del alma, por motivarme a continuar.*

*A la luz de mi vida, mis amados hijos, Sergio y Alan, por aguantar mis ausencias, por despertar en mí el coraje para seguir cuando deseaba rendirme.*

*A mi querida amiga Elizabeth, por su gran apoyo desde que comencé la carrera, gracias por estar conmigo a cada momento.*

*A los amigos que se cruzaron en mi camino; Norma, Mary, Martha, Noe, Juan Carlos, Miguel, José Luis, Rosy, Cinthya, Lupita, Juan Manuel, Dianalu, Julieta, Angy, Adriana, gracias por su amistad y sus palabras de apoyo.*

*A mi tía Francisca por alentarme y siempre escucharme.*

*A toda mi hermosa familia, tios, tias, primas, primos y muy especialmente a mis abuelitas.*

*A mi segunda familia, Gloria, Abigail, Rebeca y Samuel.*

*A todos mis compañeros de laboratorio, gracias por haberme hecho parte de este gran equipo de trabajo; gracias Rebe por ayudarme a enriquecer mi trabajo y gracias Ana por escucharme.*

*A mi asesora, por mostrarme lo grande que puede llegar a ser una persona, por alentarme, dedicarme su tiempo y compartir conmigo un poco del enorme conocimiento que posee.*

*Por último debo confesar que encontrar las palabras precisas que expresen mi sentir hacia todas las personas que creyeron en mí, me resulta complicado porque un simple gracias no bastaría ni podría conjuntar los sentimientos que se desbordan de mí y que motivan.*

## INDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>2</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>7</b>
<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>8</b>
Colecta del material.....	8
Obtención del extracto metanólico (MeOH 1).....	8
Obtención de la fracción metanólica libre de compuestos no polares (MeOH2) y la fracción hexánica (H).....	8
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	8
Evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana.....	9
Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana .....	9
Efecto del extracto activo sobre la curva del crecimiento bacteriano .....	9
Evaluación de la actividad antifúngica (levaduras y hongos filamentosos). .....	9
Evaluación cualitativa para levaduras .....	10
Evaluación cuantitativa para levaduras .....	10
Evaluación cualitativa para hongos filamentosos .....	10
Evaluación cuantitativa para hongos filamentosos .....	10
Actividad antioxidante .....	11
Caracterización química de Argemone mexicana .....	11
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>13</b>
Colecta y obtención del extracto y sus fracciones.....	13



<b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....</b>	<b>14</b>
Evaluación cualitativa.....	14
Evaluación cuantitativa.....	18
Actividad del extracto (MeOH 1) y su fracción (MeOH 2), sobre la curva de crecimiento bacteriano. ....	20
 <b>EVALUACION DE LA ANTIVIDAD ANTIFÚNGICA EN LEVADURAS.....</b>	 <b>22</b>
Evaluación cualitativa.....	22
Evaluacion cuantitativa.....	25
Actvidad de MeOH 2 sobre la curva de crecimiento en levadura.....	26
 <b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA EN HONGOS FILAMENTOSOS.....</b>	 <b>28</b>
Evaluacion cualitativa.....	28
Evaluacion cuantitativa.....	29
<i>Aspergillus niger</i> .....	29
<i>Aspergillus sp.</i> .....	30
<i>Fusarium moniliforme</i> .....	32
<i>Fusarium sporotrichioides</i> .....	34
<i>Tricophyton mentagrophytes</i> .....	36
Comparación del efecto del extracto y sus fracciones sobre las cepas de hongos.....	39
 <b>EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MeOH 1 Y MeOH 2.</b>	 <b>44</b>
 <b>CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE <i>Argemone mexicana</i>.....</b>	 <b>45</b>
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	45
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). ....	52
 <b>DISCUSIÓN .....</b>	 <b>56</b>

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>63</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>64</b>
<b>APENDICES .....</b>	<b>65</b>
APÉNDICE 1 .....	65
APÉNDICE 2 .....	67
APÉNDICE 3.....	70
APÉNDICE 4 .....	70
APÉNDICE 5 .....	72
APÉNDICE 6 .....	73
APÉNDICE 7 .....	74
APÉNDICE 8 .....	75
APÉNDICE 9 .....	77
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>REFERENCIAS DIGITALES.....</b>	<b>96</b>

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Halos de inhibición de <b>MeOH 1</b> : Extracto metanólico, <b>H</b> : Fracción hexánica y <b>MeOH 2</b> : Fracción metanólica libre de compuestos no polares. ...	15
Fig. 2. Halos de inhibición de cada una de las cepas de bacterias. ....	16
Fig. 3. Halos de inhibición que presentaron las cepas de bacterias ante el extracto y cada una de las fracciones. <b>MeOH 1</b> : Metanólico crudo, <b>MeOH 2</b> : Metanólico libre de compuestos no polares y <b>H</b> : Hexánico. ....	17
Fig. 4 Actividad del extracto <b>MeOH 1</b> sobre la curva de crecimiento de <i>Staphylococcus epidermidis</i> FES-C .....	20
Fig. 5 Actividad de la fracción <b>MeOH 2</b> sobre la curva de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> 29213. ....	21
Fig. 6 Actividad de la fracción <b>MeOH 2</b> sobre la curva de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	21
Fig. 7. Halos de inhibición que presentaron <b>MeOH 1</b> : Extracto metanólico, <b>MeOH 2</b> : Fracción metanólica libre de compuestos no polares, (*); dato atípico. ....	23
Fig.8. Halos de inhibición de las cepas de levadura para cada extracto y fracción. <b>MeOH 1</b> : Metanólico, <b>MeOH 2</b> : Fracción metanólica. ....	24
Fig.9. Halos de inhibición de las cepas de levadura,.....	25
Fig. 10. Actividad de <b>MeOH 2</b> sobre la curva de crecimiento de <i>Candida albicans</i> urocultivo.....	27
Fig. 11. Actividad de <b>MeOH 2</b> sobre la curva de crecimiento de <i>Candida tropicalis</i> .....	27

Fig.12. Porcentaje de inhibición del extracto <b>MeOH 1</b> , sobre <i>Aspergillus sp...</i>	31
Fig.13. Porcentaje de inhibición de la fracción, <b>MeOH 2</b> sobre <i>Aspergillus sp.</i>	31
Fig.14 Porcentaje de inhibición del extracto <b>MeOH 1</b> sobre <i>Fusarium moniliforme</i> .....	33
Fig.15. Porcentaje de inhibición de la fracción metanólica <b>MeOH 2</b> sobre <i>Fusarium moniliforme</i> .....	33
Fig.16. Porcentaje de inhibición de la fracción hexánica <b>H</b> , sobre <i>Fusarium moniliforme</i> .....	33
Fig.17.Porcentaje de inhibición del extracto <b>MeOH 1</b> , sobre <i>Fusarium sporotrichioides</i> . ....	35
Fig.18.Porcentaje de inhibición de la fracción metanólica <b>MeOH 2</b> , sobre <i>Fusarium sporotrichioides</i> . ....	35
Fig.19. Porcentaje de inhibición de la fracción hexánica <b>H</b> , sobre <i>Fusarium sporotrichioides</i> . ....	35
Fig.20. Porcentaje de inhibición del extracto <b>MeOH 1</b> , sobre <i>Tricophyton mentagrophyte</i> . ....	37
Fig.21. Porcentaje de inhibición de la fracción metanólica <b>MeOH 2</b> , sobre <i>Tricophyton mentagrophyte</i> .....	37
Fig.22. Porcentaje de inhibición de la fracción hexánica <b>H</b> , sobre <i>Tricophyton mentagrophyte</i> . ....	37
Fig. 23. Porcentaje de inhibición de <b>MeOH 1</b> : Extracto metanólico, <b>H</b> : Fracción hexánica y <b>MeOH 2</b> : Fracción metanólica.....	39

Fig. 24. Porcentaje de inhibición de cada una de las cepas de hongos filamentosos. (*) Dato atípico. ....	41
Fig.25. Porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto y cada una de las fracciones.....	41
Fig. 26. Porcentaje de inhibición de cada una de las cepas probadas con <b>MeOH 1</b> : Extracto metanólico, <b>H</b> : Fracción hexánica y <b>MeOH 2</b> : Fracción metanólica y a diferentes Concentraciones de cada uno que van desde 0.25-4.....	43
Fig.27. Porcentaje de reducción del DPPH en relación a la concentración del extracto <b>MeOH 1</b> . ....	44
Fig.28 Porcentaje de reducción del DPPH en relación a la concentración de la fracción <b>MeOH 2</b> . ....	44
Fig. 29. Cromatografía de gases de <b>MeOH 1</b> .....	46
Fig.30. Cromatografía de gases de <b>MeOH 2</b> .....	47
Fig.31. Cromatografía de gases de <b>H</b> .....	47
Fig. 32. Cromatograma de HPLC del extracto <b>MeOH 1</b> de <i>A. mexicana</i> .....	52
Fig. 33. Cromatograma de HPLC de la fracción metanólica, <b>MeOH 2</b> de <i>A. mexicana</i> .....	54
Fig. 34. Cromatografía de HPLC de la fracción hexánica, <b>H</b> de <i>A. mexicana</i> .....	55
Fig.35. <i>Argemone mexicana</i> .....	65
Fig. 36. Ubicación geográfica del poblado de San Rafael .....	67

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estudios realizados sobre <i>Argemone mexicana</i> .....	5
Cuadro 1. Continuación.....	6
Cuadro 2. Datos etnobotánicos de <i>A. mexicana</i> .....	13
Cuadro 3. Rendimiento del extracto de <i>A. mexicana</i> .....	13
Cuadro 4. Actividad antimicrobiana del extracto y fracciones de <i>A. mexicana</i> .....	14
Cuadro 5. Determinación de CMI y CMB del extracto y fracciones de <i>A. mexicana</i> .....	19
Cuadro 6. Actividad antifúngica de <i>A. mexicana</i> sobre levaduras.....	22
Cuadro 7. Determinación de la CMI y CFM, de las cepas de levaduras que presentaron inhibición del crecimiento con <b>MeOH 2</b> .....	26
Cuadro 8. Actividad del extracto y las fracciones de <i>A. mexicana</i> sobre hongos filamentosos.....	28
Cuadro 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Aspergillus niger</i> , a diferentes concentraciones de <b>MeOH 1</b> .....	29
Cuadro 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Aspergillus sp.</i> .....	30
Cuadro 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium moniliforme</i> , a diferentes concentraciones.....	32
Cuadro 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium sporotrichiodes</i> .....	34

Cuadro 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de <i>Tricophyton mentagrophytes</i> .....	36
Cuadro 14. Concentración Fungicida media para las diferentes cepas de hongos.....	38
Cuadro 15. Actividad antioxidante del extracto <b>MeOH 1</b> y su fracción <b>MeOH 2</b> .....	45
Cuadro 16. Compuestos que integran al extracto <b>MeOH 1</b> y la fracción <b>MeOH 2</b> de <i>A. mexicana</i> .....	48
Cuadro 17. Tiempo de retención y UV máxima del extracto <b>MeOH 1</b> de <i>A. mexicana</i> .....	53
Cuadro 18. Tiempo de retención y UV máxima de la fracción <b>MeOH 2</b> de <i>A. mexicana</i> .....	54
Cuadro 19. Tiempo de retención y UV máxima de la fracción hexánica <b>H</b> de <i>A. mexicana</i> .....	55

## RESUMEN:

Actualmente, las plantas promisoras de uso etnofarmacológico se han convertido en fuente de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica y dentro de las varias familias de plantas empleadas terapéuticamente, en nuestro país, se encuentra la *Papaveraceae* a la cual pertenecen especies de notable interés, como plantas medicinales, sobre todo por la presencia de alcaloides, familia a la que pertenece *Argemone mexicana*, de la cual se obtuvo el extracto **MeOH 1** y posterior a esto se realizó una partición obteniendo así las fracciones **MeOH 2** y **H**, con las cuales se llevaron a cabo ensayos para determinar su actividad antimicrobiana en bacterias, levaduras y hongos. Se determinó que presentaron mayor actividad sobre *Staphylococcus epidermidis* (**MeOH 1**) con una  $M_e = 12$  y CMI=0.5 mg/mL, CMB= 1mg/mL: *Staphylococcus aureus* CMI=1mg/mL, CMB=2mg/mL y *Pseudomonas aureoginosa* con una  $M_e = 9$  y CMI=0.25mg/mL, CMB=1mg/mL (**MeOH 2**). En levaduras sólo la fracción **MeOH** presentó actividad sobre *Candida albicans* aislada de un urocultivo y *Candida tropicalis*. En cuanto a hongos filamentosos *Tricophytum mentagrophyte* fue el más sensible, ya que su crecimiento fue inhibido con las concentraciones menores de: **MeOH 1**( $CF_{50}=1.41$  mg/mL), **MeOH 2**( $CF_{50}=3.91$ ) y **H** ( $CF_{50}=4.53$ ), alcanzó el 82% de inhibición y presentó la mediana más alta dentro del análisis estadístico ( $M_e = 80$ ).

Se llevó a cabo también la prueba de antioxidante con DPPH, en donde se determinó que el extracto **MeOH 1** es quien presenta la mayor actividad antioxidante con una  $CA_{50} = 1.98$   $\mu$ g/mL. En cuanto a la caracterización del contenido químico, se realizó una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y un HPLC, y se identificaron compuestos de importancia como Cis- Pinano (2.17%) y *p*-Vinilguayacol (1.58%) en **MeOH 1**; Cafeína (11.38%) y Ácido hexanodecanoico (14.61%), en **MeOH 2**, siendo este último el único compuesto en común entre el extracto y la fracción.

Concluyendo así que tanto el extracto como sus fracciones poseen actividad antimicrobiana y antifúngica, lo cual se puede atribuir al contenido químico de la planta



## **INTRODUCCIÓN:**

En las últimas décadas es evidente el enorme desarrollo tecnológico que ha tenido la industria farmacéutica, sin embargo el excesivo uso de medicamentos conllevan a un gran problema que al parecer va aumentando, ya que los microorganismos causantes de varias enfermedades han ido desarrollando resistencia a estos medicamentos, sobre todo a los antibióticos, empleados en los tratamientos de las enfermedades (Embidi, 2007). Un informe de la OMS reconocía que las cepas de microbios farmacorresistentes tienen un impacto mortal sobre la lucha contra la tuberculosis, el paludismo, el cólera, la diarrea y la neumonía; todas ellas enfermedades importantes que han matado juntas a más de 10 millones de personas, tan sólo en 1996. Además algunas de estas bacterias ya eran resistentes por lo menos a 10 medicamentos diferentes. (OMS, 1997). Lo anterior nos lleva a la búsqueda de nuevas fuentes para aliviar nuestras enfermedades.

Por esta razón, las plantas medicinales se han convertido en una buena alternativa, pues se trata de cualquier tipo de vegetal que contenga en cualquiera de sus órganos alguna sustancia con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos (Kuklinski, 2000), es decir la presencia de metabolitos secundarios, tales como los terpenos, los glicósidos, compuestos fenólicos y alcaloides, los cuales son compuestos que sin ser esenciales para la supervivencia de células individuales tienen un papel importante en la vida y supervivencia del organismo en su entorno ecológico y que se encuentran restringidos a ciertas zonas de la planta (Walton et al., 1999), esto representa una fuente natural, para el desarrollo de la medicina moderna.

En la actualidad, los usos de la herbolaria nativa persisten en distintas partes de la Tierra donde los compuestos farmacológicos químico-industriales no llegan, (Madaleno, 2004). También los compuestos de las plantas continúan jugando un papel importante en la atención primaria de salud como remedios terapéuticos en muchos de los países en desarrollo (Bobbarala et al., 2011). Sin embargo, se calcula que menos del 10% de las plantas han sido evaluadas en la búsqueda de actividad biológica (Harvey, 2000).

Es por eso que es indudable la importancia de las plantas y los árboles para la medicina moderna, ya que durante mucho tiempo los remedios naturales y las plantas medicinales fueron el principal e incluso el único recurso del que disponía el médico; todas las culturas, a lo largo y ancho del planeta y en todos los tiempos, han usado las plantas medicinales como base de su propia medicina (Núñez, 1982). Pues se sabe que ya desde antes de la llegada de Hernán Cortés y del establecimiento del Virreinato de Nueva España, los indios mesoamericanos y suramericanos usaban todo tipo de hierbas y animales para sanar sus males. El ser humano ha hecho uso práctico de plantas para alimentarse y curarse, desde tiempos inmemoriales. Los tallos, hojas, flores, semillas, raíces o frutos no pierden, por norma, sus propiedades y fuerza medicinal al secarse, siguiendo inalterables hasta un año después de la cosecha. Sin pretender debatir los beneficios y avances de la medicina moderna, no se debe olvidar que la farmacopea de nuestras culturas postmodernas está basada sobre conocimientos ancestrales. La flora medicinal de las culturas iberoamericanas está ampliamente reconocida y está referenciada en numerosos documentos históricos como códices y libros sagrados, pudiendo apreciarse incluso en esculturas y pinturas murales, sin olvidar las ricas tradiciones milenarias que demuestran la importancia de la fitoterapia (Madaleno, 2004). A pesar de esto la diversidad de plantas medicinales disponible varía según las regiones y los ecosistemas de cada zona donde habitan (Núñez, 1982).

Se puede decir entonces que la existencia de la medicina tradicional mexicana se debe sin duda a la gran diversidad biológica de nuestro país. México es reconocido como un país megadiverso, en el cual están representados casi todos los tipos de vegetación del planeta. Se ha calculado que nuestro país contiene 10% de la flora del mundo (Aguilar et al., 1994.). Entre las varias familias de plantas empleadas terapéuticamente, dentro de nuestro país, encontramos las *Papaveraceae* a la cual pertenecen especies de notable interés, como plantas medicinales sobre todo por la presencia de alcaloides, ya que estos metabolitos a dosis altas son muy tóxicos pero en dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante,

antitusivo o analgésico. La familia *Papaveraceae* comprende cerca de 700 especies localizadas en regiones templadas y frías. Se trata sobre todo, de plantas herbáceas y raramente arbustivas. Dentro de esta familia se encuentra *Argemone mexicana* (Apéndice 1), también conocida como chicalote, cuyo uso medicinal se registra desde el siglo XVI. Varias de sus aplicaciones de entonces persisten hasta nuestros días (Argeta y Cano 1994). Algunas de ellas son empleadas como hipnóticas y calmantes de la tos, para combatir convulsiones y afecciones espasmódicas también se recomienda para afecciones de la piel. La emulsión de semillas se emplea contra los cólicos intestinales, las hojas hervidas con arroz tostado y molido se usan contra las diarreas. Se dice que los aztecas aplicaban el zumo de chicalote con agua en los ojos “para consumir las nubes incipientes y destruir las carnosidades que suelen salir de ellos” (Ochoa y Alonso 1996). En otros países como la India los zumos de las semillas se utilizan para aliviar el dolor de muelas, el látex que secreta es usado en el tratamiento de las verrugas, herpes labial, infecciones cutáneas, enfermedades de la piel, picores, así como la hidropesía y la ictericia (Chopra et al., 1986). Un buen número de estudios farmacológicos, han demostrado acciones que validan en gran medida sus usos. Sin embargo, también se han demostrado experimentalmente efectos tóxicos (Argeta y Cano 1994) por ejemplo, los alcaloides como la sanguinarina y dehidrosanguinarina poseen efecto irritante especialmente en zonas cutáneas y mucosas. La berberina administrada a conejos causa disnea, hipotensión, paresia, congestión pulmonar y lesiones en los riñones. La protopina en pequeñas cantidades posee acción narcótica (Ochoa y Alonso 1996).

*Argemone mexicana* es una de las especies pertenecientes a la flora medicinal de San Rafael, municipio de Coxcatlan, Puebla, donde es utilizada para aliviar las infecciones de los ojos (“ojos con exceso de lagañas”) (Canales et al., 2005 y 2006).

## ANTECEDENTES

Sobre esta especie se han realizado diversos estudios (*cuadro 1 y 2*), pero ninguno de estos es reportado de *A. mexicana* colectada en San Rafael, municipio de Coxcatlán, Puebla.

Cuadro 1. Estudios realizados sobre *Argemone mexicana*

CITA	LUGAR DE COLECTA	ESTUDIO
Flores et al., 2001.	Estado de Yucatán.	Realizaron un estudio, donde midieron la toxicidad de algunas plantas medicinales, usadas en la región. Donde incluyeron a <i>A. mexicana</i> , y probaron que las raíces hojas y semillas presentan toxicidad.
Indranil et al., 2006.	Río de Janeiro, Brasil.	Realizaron un estudio comparativo de las fracciones del extracto de <i>A. mexicana</i> , diluidas en diferentes solventes. Concluyeron que el extracto diluido en metanol tuvo mayor actividad sobre diferentes cepas de bacterias.
González et al., 2005	Estado de Durango	Realizaron un estudio de plantas medicinales, donde encontraron entre algunas Papaveraceas a <i>A. mexicana</i> , de estas plantas obtuvieron los extractos realizaron pruebas microbiológicas y probaron su efectividad antibacteriana cualitativamente.
Fernández, 2005	Estado de México	Realizó un estudio donde concluyó que los extractos metanólicos de las flores y hojas de <i>A. platyceras</i> tuvieron actividad antiespasmódica. Y que los extractos metanólicos de las flores y hojas de <i>A. platyceras</i> mostraron actividad antialérgica

Cuadro 1. Continuación...

CITA	LUGAR DE COLECTA	ESTUDIO
Garduño, 2009	Morelos	Analizó la actividad fungicida de <i>A. mexicana</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i> considerado este último como una plaga y concluyó que tiene efecto fungicida sobre esta especie debido a la presencia de alcaloides.
Santosh et al., 2009	Comprada en un mercado de hierbas locales ubicado en la India.	Realizaron un estudio del extracto de <i>A. mexicana</i> en tres diferentes solventes, para analizar su actividad antibacteriana y su contenido químico. Concluyeron que el contenido químico depende del solvente usado y que el extracto diluido en cloroformo presenta mayor actividad.
Báez, 2010	Tlaxcala	Estudió la actividad que tienen diferentes extractos de semillas, entre ellos el de <i>A. mexicana</i> , como plaguicidas de <i>Aedes aegypti</i> , y concluyó que el extracto de la planta tiene una letalidad alta en las larvas, debido a la presencia elevada de alcaloides.
Avila, 2009	Sinaloa	Realizó un estudio, para evaluar el contenido de metabolitos secundarios en cuatro diferentes especies de plantas, entre ellas <i>A. mexicana</i> , identificó la presencia de ácidos grasos y alcaloides mediante Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), dichos compuestos tienen actividad antibacteriana, antifúngica y plaguicida.

Por lo antes mencionado y dentro del proyecto de investigación sobre la flora medicinal de San Rafael, municipio de Coxcatlán, Puebla, este trabajo tuvo como objeto de estudio a la especie *Argemone mexicana*.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar algunas propiedades medicinales de *Argemone mexicana* de San Rafael, Coxcatlán, Puebla.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Obtener el extracto metanólico (**MeOH1**) de *A. mexicana* por maceración
- ❖ Realizar el fraccionamiento del extracto de *A. mexicana*, en **MeOH 2 y H**, por medio de una partición.
- ❖ Evaluar cualitativamente (método de difusión en agar) la actividad antimicrobiana del extracto y sus fracciones de *A. mexicana*.
- ❖ Determinar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y la CMB (Concentración Mínima Bactericida) del extracto de *A. mexicana*.
- ❖ Determinar la actividad bactericida o bacteriostática de *A. mexicana* sobre las cepas de bacterias más sensibles.
- ❖ Determinar cualitativamente (por inhibición del crecimiento radial) la actividad antifúngica del extracto de *A. mexicana*, sobre levaduras.
- ❖ Determinar la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) y la CFM (Concentración Fungicida Mínima) sobre levaduras.
- ❖ Determinar cualitativamente (por inhibición del crecimiento radial) la actividad antifúngica del extracto de *A. mexicana*, sobre hongos filamentosos
- ❖ Determinar la CF<sub>50</sub> (Concentración Fungicida media) y la CFM, para los hongos filamentosos.
- ❖ Determinar la actividad antioxidante (mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH))
- ❖ Caracterizar la composición química de *A. mexicana*: por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Colecta del material.**

La planta se colectó en San Rafael, municipio de Coxcatlán, Puebla (Apéndice 2), para posteriormente llevarla a identificar, al herbario IZTA, donde se depositó un ejemplar con el número MCM37.

### **Obtención del extracto metanólico (MeOH 1)**

Una vez seca la planta (1060 g), se realizó una maceración para obtener el extracto metanólico de la planta (Apéndice 3).

### **Obtención de la fracción metanólica libre de compuestos no polares (MeOH2) y la fracción hexánica (H)**

Para la obtención de las fracciones se realizó una partición del extracto metanólico. De esta forma se obtuvo la fracción hexánica (H) y la fracción metanólica libre de compuestos no polares (MeOH2) (Domínguez, 1973).

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

Los microorganismos empleados para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos fueron: *Vibrio cholerae* No.01, *Vibrio cholerae* INDRE 206 (aislada de agua contaminada), *V. cholerae* aislada de un caso clínico, correspondiente al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba, biotipo El Tor, *V. cholerae* CDC V 12, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Enterobacter aerogenes* y *Bacillus subtilis* (donadas por el laboratorio de microbiología de la FES-Cuatitlán), *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa* (donadas por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES-Iztacala), *Salmonella typhimurum*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* ATCC 12398 y ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* y *Sarcina lutea* (donadas por la FES-Cuatitlán). *Proteus mirabilis* (aislada de un caso clínico), *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* (estas cuatro donadas por el hospital "Los Ángeles").

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

La actividad antibacteriana fue evaluada mediante el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietink, 1991). Los sensidiscos que se usaron se impregnaron con 2 mg en el caso de las bacterias y con 4 mg para las levaduras. Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con 25 µg de cloranfenicol (bacterias) y 25 µg de nistatina (hongos) y como controles negativos los sensidiscos fueron impregnados con 10 µL del solvente respectivo. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 4).

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

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se utilizó el método modificado de dilución en agar (Koneman, 1996). Las Concentraciones utilizadas para los bioensayos fueron de: 3.0, 2.5, 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50, 0.25, y 0.125 mg/mL del extracto que presentó actividad antimicrobiana. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice 5).

### **Efecto del extracto activo sobre la curva del crecimiento bacteriano**

El estudio se determinó de acuerdo al método propuesto por Muroi et al., 1993 (Apéndice 6). Las Concentraciones evaluadas fueron 1/2 CMI, CMI CBM del extracto activo y llevando a cabo el seguimiento del crecimiento bacteriano durante 24 horas.

### **Evaluación de la actividad antifúngica (levaduras y hongos filamentosos).**

Las especies que se utilizaron para evaluar la actividad antifúngica fueron:

Levaduras

Se utilizaron *Candida albicans* (caso clínico) (donada por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES-Iztacala), *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 14065, *Cryptococcus neoformans* (donadas por el laboratorio de microbiología de la FES-Cuautitlán). *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. albicans*



(aislada de un urocultivo) (estas tres especies fueron donadas por el hospital “Los Ángeles”). *C. albicans*\* (donada por la FES-Cuautitlán).

Hongos filamentosos

Se usaron *Aspergillus niger* CDBB-H-179, *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112, *Fusarium sporotrichioides* ATCC NRLL 3299 (donadas por el laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, FES-Iztacala, *Fusarium moniliforme* CDBB-H-265 y *Rhizoctonia lilacina* CDBB-H-306). *Aspergillus sp.* (Donada por el Laboratorio de Microbiología de la UBIPRO, FES- Iztacala).

### **Evaluación cualitativa para levaduras**

Para determinar la actividad antifúngica en levaduras se llevó a cabo el mismo ensayo que en las bacterias, mediante el método de difusión en agar de Kirby-Bauer (Vanden Berghe, y Vlietinck, 1991) (Apéndice 4).

### **Evaluación cuantitativa para levaduras**

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) se usó el mismo método que en las bacterias (Apéndice 5).

### **Evaluación cualitativa para hongos filamentosos**

Para evaluar la actividad antifúngica se empleó el método de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002) para ello se impregnaron sensidiscos con 2 mg del extracto y sus diferentes fracciones. Como control positivo se usaron sensidiscos con Ketoconazol (7 µg). Todos los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 7).

### **Evaluación cuantitativa para hongos filamentosos**

Para determinar la Concentración Fungicida Media (CF<sub>50</sub>) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) se empleó el método de inhibición del crecimiento radial, para lo cual el extracto se diluyó en el agar (Wang y Bun, 2002). Las concentraciones empleadas para los ensayos fueron: 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, mg/mL. Cada ensayo se realizó por triplicado (Apéndice 5).

### **Actividad antioxidante**

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) método modificado de Murillo, 2006 (Apéndice 8).

Se determinó la Concentración Antioxidante Media ( $CA_{50}$ ), utilizando las siguientes Concentraciones: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20  $\mu\text{g/mL}$ . Como control positivo se usó la catequina a las mismas concentraciones que el compuesto problema. Como blanco se utilizaron pozos con 200  $\mu\text{L}$  de MeOH grado HPLC (Okusa et al., 2007) (Apéndice 8).

### **Caracterización química de Argemone mexicana**

Se realizó una caracterización química por medio de:

***Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas***: Utilizando un Cromatografo de Gases Modelo 6850 y un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C. Columna RTX 30 m. de largo por 0.25 mm de diámetro interno por 25 micras de película.

Condiciones de corrida:

- Temperatura del inyector: 250°C.
- Modo de inyección: Split.
- Radio: 33.5:1
- Flujo del Split: 29.9 ml/mn.
- Flujo de corrida: 35 cm/seg

Horno:

- Temperatura inicial: 70°C
- Rampa de calentamiento: 8°C por minuto hasta 270°C., segunda rampa: 10°C por minuto hasta 290°C, se mantiene 6 min.
- Tiempo de corrida total: 35 minutos.
- Línea de transferencia: 290°C.

**Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés):** utilizando una columna Discovery C-18, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm. Corrida isocrática con mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua (25-25-50), flujo de 1 mL/min. Detector de arreglo de diodos (DAD) a longitud de onda de 260 nm con barrido completo de 200-400 nm.

### **Análisis estadístico**

A los datos recopilados se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores en el caso de bacterias y levaduras, y un ANOVA de tres factores para hongos filamentosos (sólo en aquellos donde las cepas de hongos fueron sensibles al extracto **MeOH 1** y alguna de las fracciones (**MeOH 2** o **H**)).

Para la estadística descriptiva se obtuvieron las medidas descriptivas (media, desviación estándar, cuartiles: 1, 2, 3 y coeficiente de variación) de los halos generados por tratamiento, cepa de bacteria y concentraciones, se elaboraron diagramas de caja con base a esta información en minitab v.16. (Apéndice 9).

En cuanto a la capacidad antioxidante se llevó a cabo un análisis de regresión, para ajustar una hipérbola rectangular.

## RESULTADOS

### Colecta y obtención del extracto y sus fracciones

En el cuadro 2 se muestran los datos etnobotánicos de la planta *A. mexicana*, la cual fue colectada durante el mes de Abril del año 2011 en el poblado de San Rafael, del municipio de Coxcatlán en el estado de Puebla

Cuadro 2. Datos etnobotánicos de *A. mexicana*.

Nombre científico	<i>Argemone mexicana</i>
Nombre común	Chicalote
Familia	Papaveracea.
Parte utilizada.	Parte aérea
Forma de uso	Infusión y tópica

A partir del extracto Metanólico crudo (**MeOH 1**), el cual se obtuvo de un total de 1060 g de la planta en seco, se extrajeron tres fracciones; la fracción metanólica libre de compuestos no polares (**MeOH 2**) y la fracción hexánica (**H**) y una fracción que se diluía en agua (**A**). En el cuadro 3 se observa el porcentaje de rendimiento del extracto y cada una de las fracciones, también es de notar que de las tres fracciones obtenidas, la fracción **MeOH 2** (metanólico libre de compuestos no polares), es la que presentó un mayor rendimiento con 1.09 %, lo cual indica que este extracto presenta un mayor número de compuestos con polaridad alta.

Cuadro 3. Rendimiento del extracto de *A. mexicana*.

Extracto	Extracto (g)	%
<b>MeOH 1</b>	69.27	6.53%
<b>MeOH 2</b>	11.6	1.09%
<b>H</b>	3.2	0.30%
<b>A</b>	1.7	0.16%

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

### Evaluación cualitativa.

Se llevaron a cabo las pruebas cualitativas en cada fracción, así como en el extracto sin embargo, se descartó para el análisis la fracción que se diluía en agua debido a que este no mostró actividad sobre ninguna de las cepas. La evaluación de la actividad antimicrobiana del resto se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4. Actividad antimicrobiana del extracto y fracciones de *A. mexicana*.

Bacteria	MeOH 1 (mm)	MeOH 2 (mm)	H (mm)	Cloranfenicol (25µg/sensidisco)
<i>Bacillus subtilis</i>	7 ± 0	8.7 ± 0.6	N.A	32.6 ± 0.57
<i>Enterobacter aerogenes</i>	8 ± 0	6.3 ± 0.6	6.7 ± 2	22 ± 0
<i>Enterococcus faecalis</i>	10 ± 2	7.3 ± 0.6	N.A	24.3 ± 0.57
<i>Escherichia coli</i> ATCC 27155	9.3 ± 0.6	N.A	N.A	32 ± 0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 53228	N.A	9±1	N.A	30 ± 0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N.A	5.7 ± 0.6	N.A	30 ± 0
<i>Proteus mirabilis</i>	N.A	N.A	6.3 ± 0.6	14.6 ± 0.57
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8 ± 0	6.7 ± 1.2	8.3 ± 1.2	20 ± 0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398	7 ± 0	6.3 ± 1.2	N.A	28 ± 0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	9.3 ± 0.6	7.3 ± 1.2	N.A	20 ± 0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FES-C	11.7 ± 1.5	N.A	N.A	30.3 ± 0.57
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	8 ± 2.7	N.A	N.A	30 ± 0
<i>Vibrio cholerae</i> CDC V 12	11.7 ± 0.6	8.7 ± 1.5	N.A	25 ± 0
<i>Vibrio cholerae</i> INDRE 206	9.3 ± 3.8	6.3 ± 0.6	6 ± 1	22 ± 0
<i>Vibrio cholerae</i> CC	N.A	7.3 ± 1.2	N.A	23.3 ± 1
<i>Yersinia enterocolitica</i> Los Angeles.	9.3 ± 1.5	N.A	N.A	20 ± 0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	7 ± 1.7	N.A	N.A	23.5 ± 0.7

MeOH 1: Metanólico crudo. MeOH 2: Metanólico libre de compuestos no polares. H: hexánico, N.A: no activo.

De los resultados obtenidos en la prueba cualitativa de la actividad antibacteriana del extracto y sus fracciones, se observó que las cepas bacterianas que no presentaron sensibilidad fueron: *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Sarcina lutea*, *Salmonella typhimurum*, *Vibrio cholerae* No.01. Como control positivo se usó cloranfenicol, todas las bacterias mostraron sensibilidad al control positivo, con halos de inhibición de 25 mm a 30 mm. Del análisis estadístico realizado (ANOVA de dos factores) con los resultados de las cepas bacterianas que fueron sensibles a un extracto ó a alguna de las fracciones, se puede afirmar que existieron diferencias significativas entre la actividad antibacteriana del extracto y cada una de sus fracciones ( $F= 7.63$ ,  $P=0.001$ ). De éstos, el que presentó la mediana más alta fue el **MeOH 1** ( $M_e=8.857$ ), lo cual nos indica mayor actividad, mientras que **MeOH 2** tuvo una  $M_e=7.242$  y **H** una  $M_e=6.833$  Fig.1.

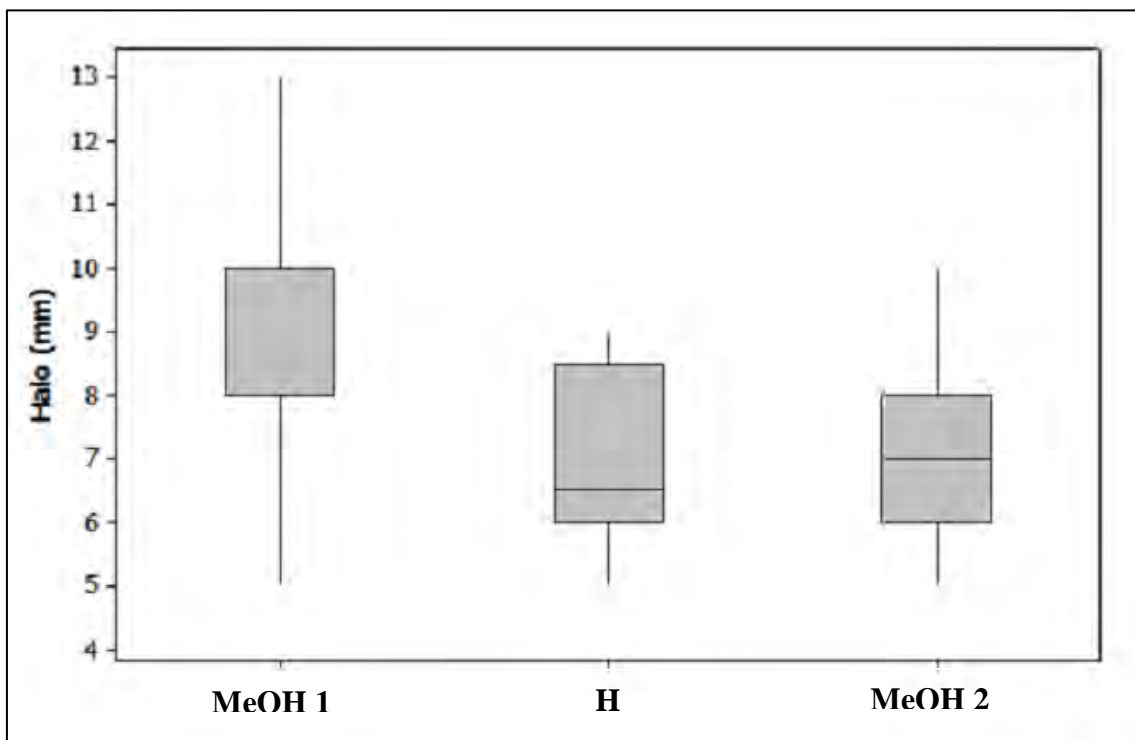


Fig. 1. Halos de inhibición de **MeOH 1**: Extracto metanólico, **H**: Fracción hexánica y **MeOH 2**: Fracción metanólica libre de compuestos no polares.

Se puede observar que el extracto con mayor actividad fue el **MeOH 1** ya que un mayor número de cepas presentaron sensibilidad a él, además de que se registraron las medianas más altas: *Staphylococcus epidermidis* FES-C y *Vibrio cholerae* CDC V 12 ambas con una  $M_e = 12$ . **MeOH 2**, mostró actividad relevante sobre *Bacillus subtilis* y *Vibrio cholerae* CDC V 12 ambas con una  $M_e = 9$ . Mientras **H**, tuvo muy poca actividad sobre las cepas de bacterias, de hecho dicha actividad sólo fue visible en cuatro de las veinticuatro cepas y resultó relevante sólo sobre *Pseudomonas aeruginosa* ( $M_e = 9$ ) ( Fig. 3).

Las cepas bacterianas que mostraron los mayores halos de inhibición ante el extracto y cada fracción fueron: *Staphylococcus epidermidis* FES-C con una  $M_e = 12$  y *Vibrio cholerae* CDC V 12 cuya  $M_e = 10$ , lo que indica que estas son las más sensibles y en contraparte *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Vibrio cholerae* INDRE 206 fueron las que mostraron los halos de inhibición de menor diámetro todas con una  $M_e = 6$ . Por otra parte se puede apreciar que las demás cepas bacterianas muestran un comportamiento casi homogéneo, lo cual quiere decir que la mediana de sus halos de inhibición fue similar, entre 6 y 8 (Fig.2).

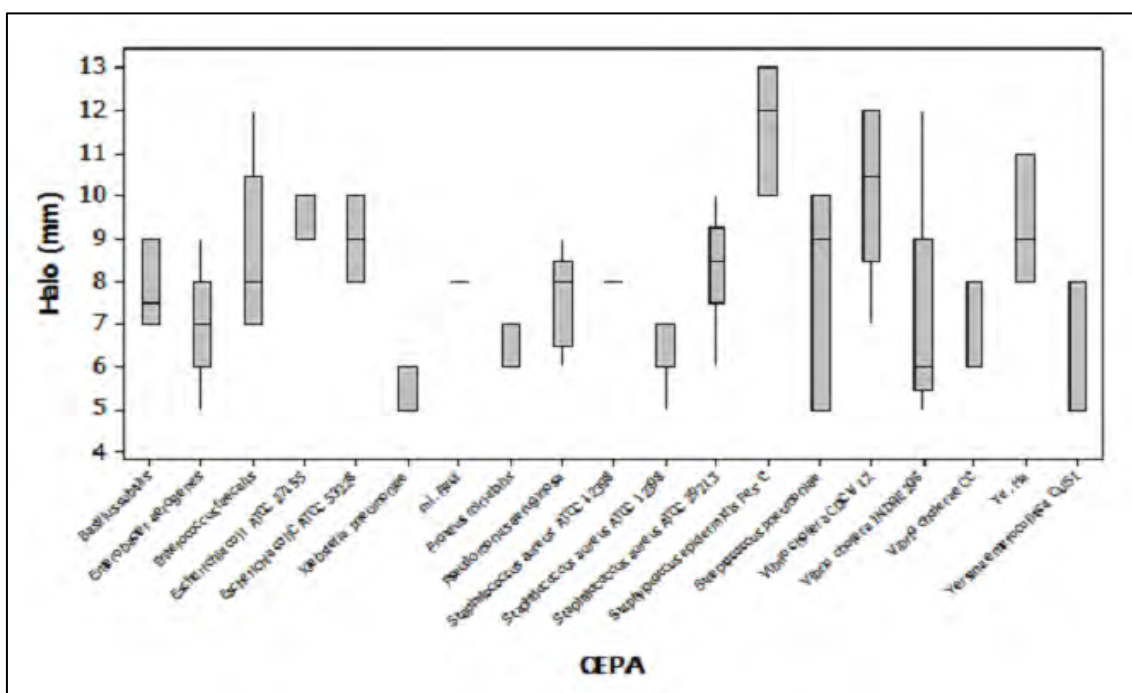


Fig. 2. Halos de inhibición de cada una de las cepas de bacterias.

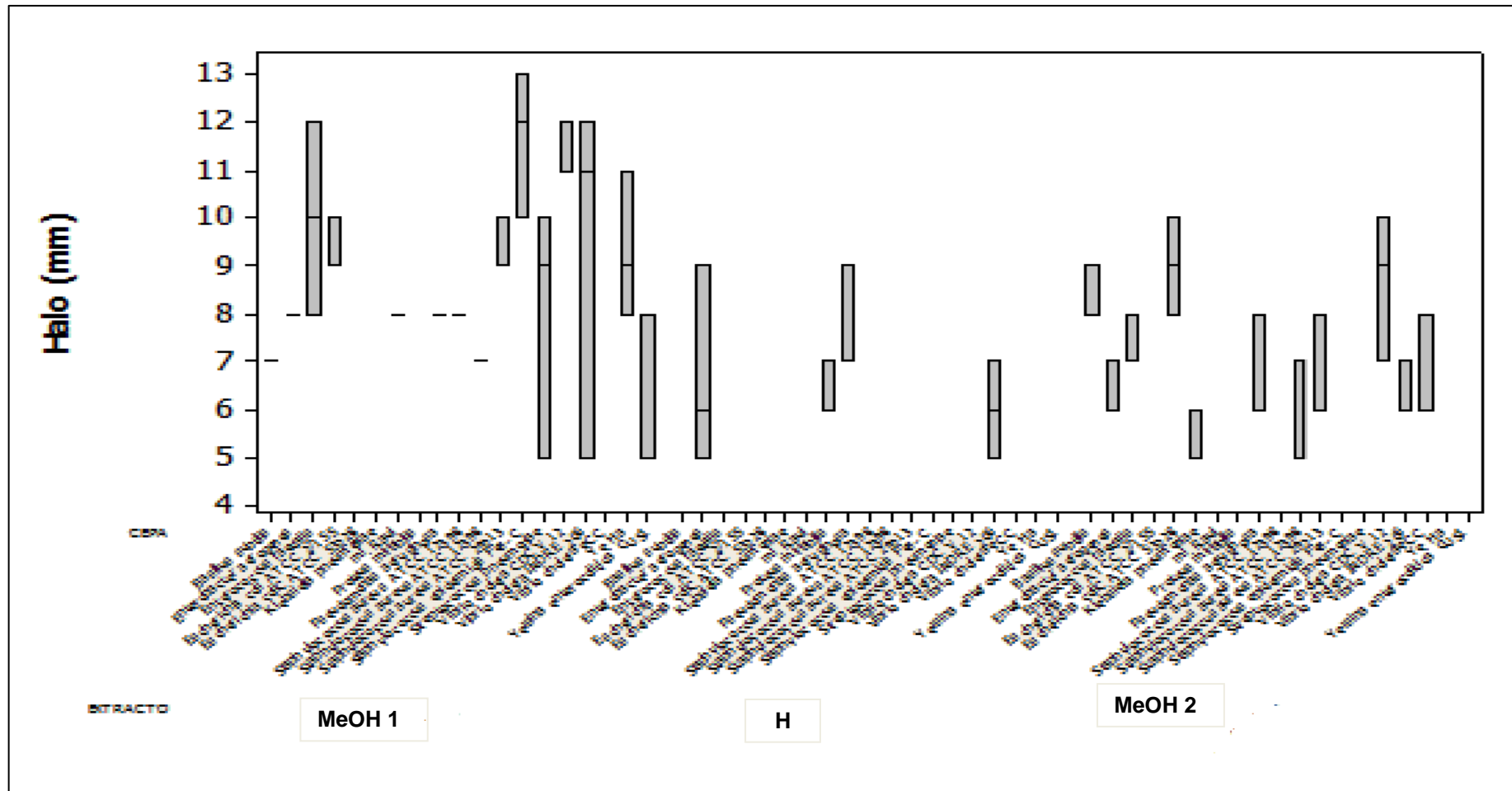


Fig. 3. Halos de inhibición que presentaron las cepas de bacterias ante el extracto y cada una de las fracciones. **MeOH 1:** Metanólico crudo, **MeOH 2:** Metanólico libre de compuestos no polares y **H:** Hexánico.



Con base al análisis de los datos se puede decir entonces que estadísticamente existieron diferencias significativas entre la sensibilidad que presentaron cada una de las cepas de bacterias al extracto y cada una de sus fracciones ( $F=2.84$ ,  $P=0.001$ ). Lo cual quiere decir que cada uno actúa de manera diferente sobre las cepas.

### **Evaluación cuantitativa.**

Los resultados obtenidos de la prueba de CMI y CMB, para el extracto **MeOH 1** y su fracción **MeOH 2**, se muestran en el Cuadro 5, cabe mencionar que para este ensayo no se consideró a la fracción **H** debido al bajo rendimiento que presentó.

Con relación a los datos que se presentan, se pudo observar que las bacterias más sensibles a **MeOH 1** son *Pseudomonas aeruginosa*, pues requiere de bajas concentraciones para inhibir su crecimiento (CMI= 0.25 mg/mL; CMB= 1 mg/mL), así como *Staphylococcus epidermidis* FES-C (CMI= 0.5 mg/mL; CMB= 1 mg/mL). En cuanto a *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Vibrio cholerae* CDC V 12, se puede ver en el cuadro que su crecimiento fue inhibido a la misma concentración la cual es relativamente baja (CMI= 1 mg/mL; CMB= 2 mg/mL). El resto de las cepas tuvo un comportamiento similar, ya que necesitan de concentraciones que van de 1 mg/mL a 2 mg/mL para la CMI y de 2 mg/mL a 4 mg/mL para la CMB.

Igual que en **MeOH 1** en **MeOH 2**, la bacteria que mostró ser inhibida a la concentración más baja de la fracción del extracto fue *Pseudomonas aeruginosa* (CMI= 0.25 mg/mL; CMB= 1 mg/mL), seguida por *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, debido a que ambas presentaron inhibición del crecimiento a concentraciones relativamente bajas de **MeOH 2** (CMI= 1 mg/mL; CMB= 2 mg/mL). Por otra parte las cepas de bacteria que requirieron de concentraciones altas de **MeOH 2** para inhibir su crecimiento fueron *Streptococcus pneumoniae* y *Vibrio cholerae* CC (CMI= 4 mg/mL; CMB= 6 mg/mL). Los demás grupos de bacterias mostraron inhibición a

concentraciones que van de 2 mg/mL. a 4 mg/mL. para la CMI y de 4 mg/ml a 6 mg/ml. para la CMB.

Cuadro 5. Determinación de CMI y CMB del extracto y fracciones de *A. mexicana*.

	MeOH 1		MeOH 2	
	CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>Bacillus subtilis</i>	1	2	1	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	4	2	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	2	4	4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 27155	1	4	–	–
<i>Escherichia coli</i> ATCC 53228	–	–	2	2
<i>Klebsiella pneumonia</i>	–	–	2	4
<i>Proteus mirabilis</i>	–	–	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.25	2	0.25	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 12398	2	4	2	4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	1	4	1	2
<i>Staphylococcus epidermidis</i> FES-C	0.5	1	–	–
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	4	4	6
<i>Vibrio cholerae</i> CDC V 12 (el Tor)	1	2	2	2
<i>Vibrio cholerae</i> INDRE 206	1	4	4	4
<i>Vibrio cholerae</i> CC	–	–	4	6
<i>Yersinia enterocolitica</i> Los Angeles	1	4	–	–
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	4	–	–

MeOH 1: Metanólico crudo. MeOH 2: Fracción metanólica libre de compuestos no polares.

### Actividad del extracto (MeOH 1) y su fracción (MeOH 2), sobre la curva de crecimiento bacteriano.

De acuerdo al seguimiento que se le dió al crecimiento bacteriano de la cepa de *Staphylococcus epidermidis* FES-C, expuesta a **MeOH 1**, se determinó que el extracto posee ligero efecto sobre la curva de crecimiento, como se muestra en la Fig.4 donde se puede ver que no hay una disminución considerable de la población bacteriana, respecto al tiempo.

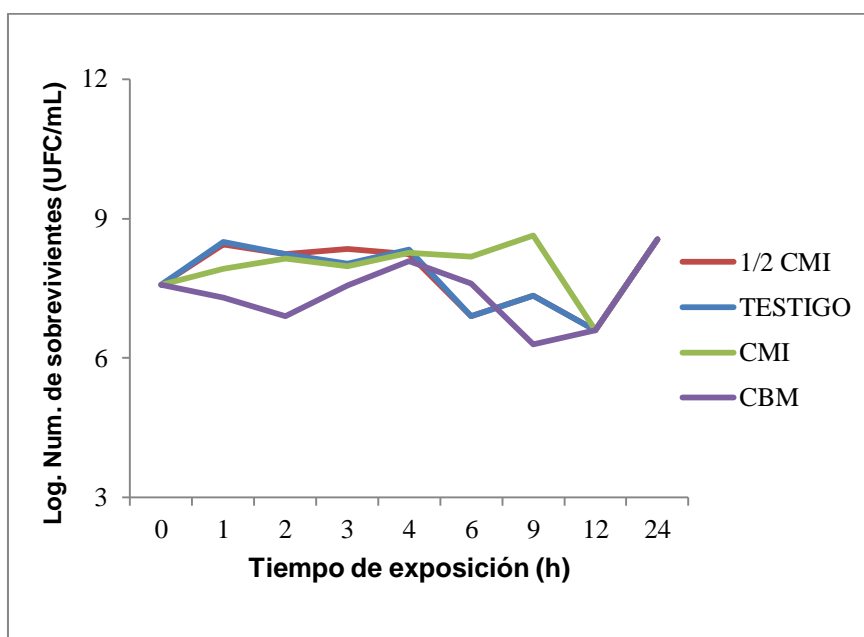


Fig. 4 Actividad del extracto **MeOH 1** sobre la curva de crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* FES-C

En la Fig.5 se puede ver el efecto de la fracción **MeOH 2** sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* 29213, en donde la fracción **MeOH 2** tiene un efecto muy poco evidente sobre el crecimiento de las bacterias, pues la disminución de la población no fue significativa, de hecho ocurrió un descenso muy leve, de 1 a las 3 horas, que posteriormente fue en aumento. Lo mismo ocurre cuando sometemos a *Pseudomonas aeruginosa* para medir los efectos de la fracción **MeOH 2**, como se puede ver en la Fig.6, aquí también la actividad es muy poca, en esta curva se ve la disminución de la población en la hora 3 y posteriormente va aumentando.

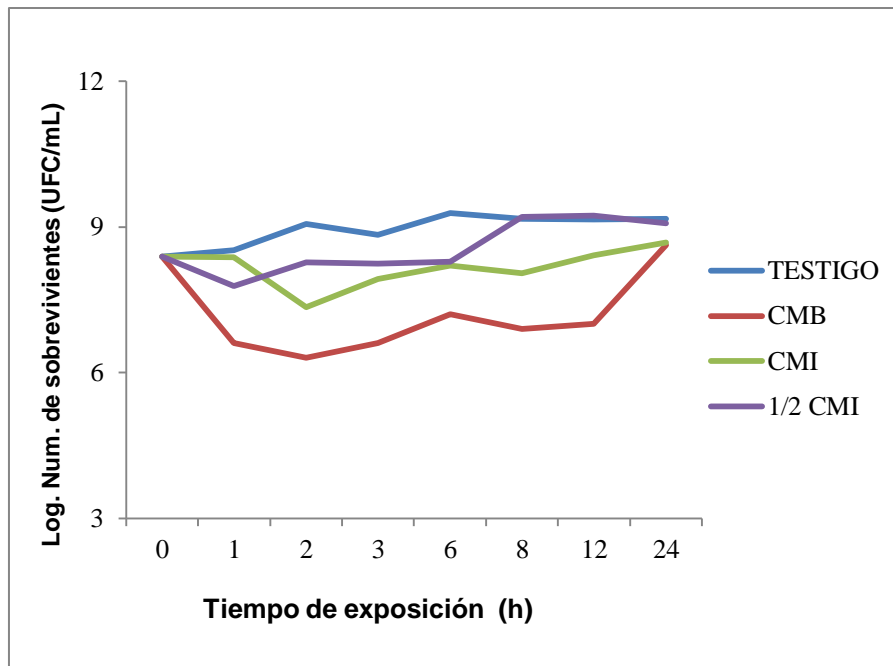


Fig. 5. Actividad de la fracción **MeOH 2** sobre la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* 29213.

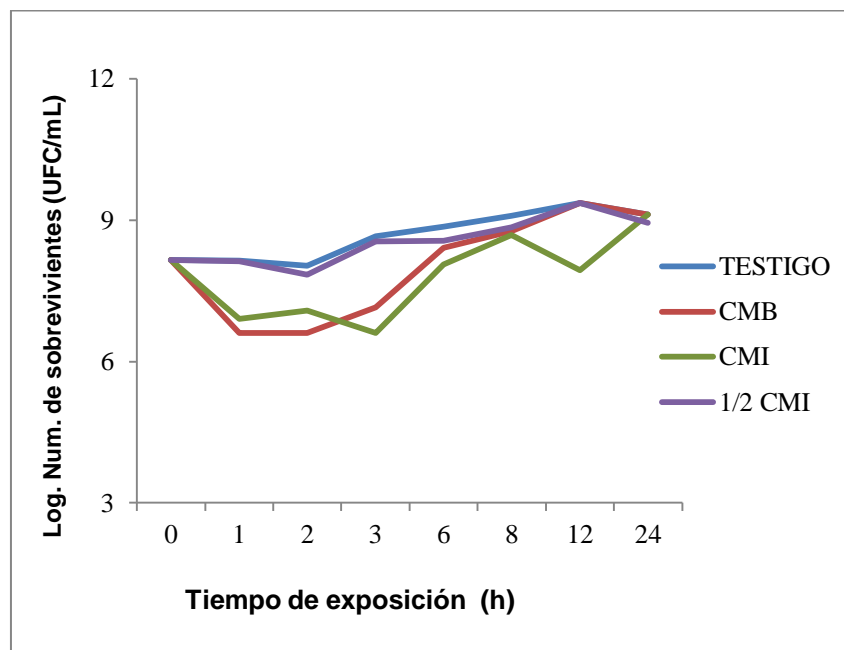


Fig. 6. Actividad de la fracción **MeOH 2** sobre la curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*

## EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA EN LEVADURAS

### Evaluación cualitativa

Los resultado del ensayo de **MeOH 1** y **MeOH 2** se muestran en el cuadro 6, se eliminó a **H**, debido a que no mostró actividad sobre ninguna de las cepas.

Cuadro 6. Actividad antifúngica de *A. mexicana* sobre levaduras.

Levadura	MeOH 1 (mm)	MeOH 2 (mm)	KETOCONAZOL $\mu\text{g/mL}$
<i>Candida albicans</i> Hosp. Los Angeles	6.8 $\pm$ 0.8	8.3 $\pm$ 0.6	9.3 $\pm$ 2.89
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	14.5 $\pm$ 0.9	12.7 $\pm$ 1.5	N. A
<i>Candida albicans</i> ATCC 14065	12 $\pm$ 2.7	12 $\pm$ 1	36.6 $\pm$ 2.89
<i>Candida albicans</i> CUSI	8.8 $\pm$ 0.3	8 $\pm$ 3	N. A
<i>Candida albicans</i> UROCULTIVO	8.8 $\pm$ 0.8	10.3 $\pm$ 2.3	33.3 $\pm$ 2.89
<i>Candida glabrata</i>	14 $\pm$ 1.4	19 $\pm$ 1.4	29.6 $\pm$ 2.89
<i>Candida tropicalis</i>	14 $\pm$ 1	10.3 $\pm$ 1.5	-
<i>Criptococcus neoformans</i>	9.7 $\pm$ 1.5	N.A	-

**MeOH 1:** Metanólico crudo; **MeOH 2:** Fracción metanólica libre de compuestos no polares; **N.A:** no activo.

De acuerdo a lo anterior **MeOH 1** mostró actividad sobre siete de las ocho cepas de levaduras, pues *Candida albicans* FES-Cuautitlán no fue sensible al extracto. En cuanto a **MeOH 2** tuvo actividad sólo sobre seis de las ocho, en este caso *Candida albicans* FES-CUATITLAN y *Criptococcus neoformans*, no presentaron inhibición de su crecimiento.

Con base al análisis estadístico se puede decir que la fracción **MeOH 2** tuvo más actividad sobre las levaduras, ya que presentó una  $M_e = 11$  sin embargo, la diferencia con el extracto **MeOH 1** fue mínima, ya que éste tiene una  $M_e = 10.5$  (Fig.7) y de acuerdo a el análisis se puede argumentar que no existirón

diferencias significativas ( $F= 0.22$ ,  $P=0.640$ ) entre la manera en la que se comporta **MeOH 1** y **MeOH 2**.

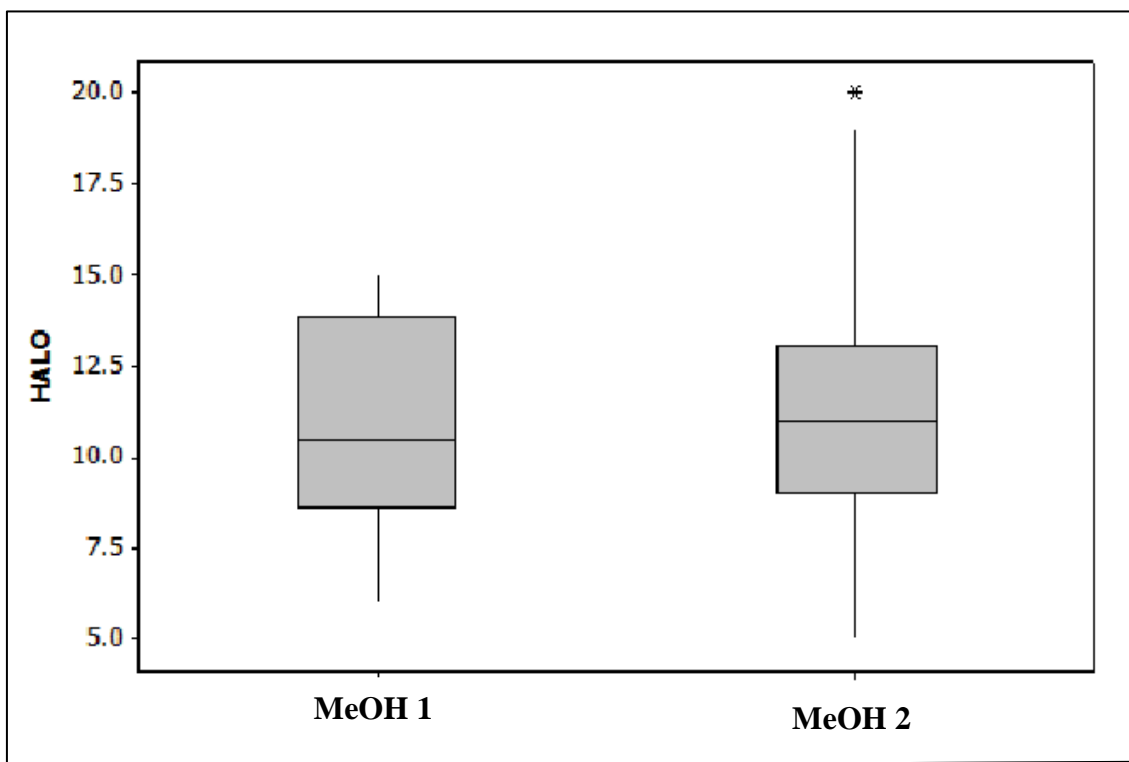


Fig. 7. Halos de inhibición que presentaron **MeOH 1**: Extracto metanólico, **MeOH 2**: Fracción metanólica libre de compuestos no polares, (\*); dato atípico.

Las cepas de levaduras que presentaron los halos de inhibición de mayor tamaño, fueron cuando se aplicó la fracción **MeOH 2**, donde la cepa de levadura que mostró los halos de inhibición mayores en esta fracción fue *Candida glabrata* pues tuvo una  $M_e = 19$ , seguida de *Cándida albicans* ATCC 10231 con una  $M_e = 13$  y la levadura que resultó ser la que presentó los menores halos, fue *Candida albicans* con una  $M_e = 8$  el resto de tuvieron un comportamiento similar. Por otra parte, el extracto **MeOH 1** sobre *Candida albicans* ATCC 10231 presentó los halos de inhibición más grandes con una  $M_e = 15$  y en contraste *Candida albicans* fue la que mostró mayor resistencia con una  $M_e = 7$ , Fig. 8.

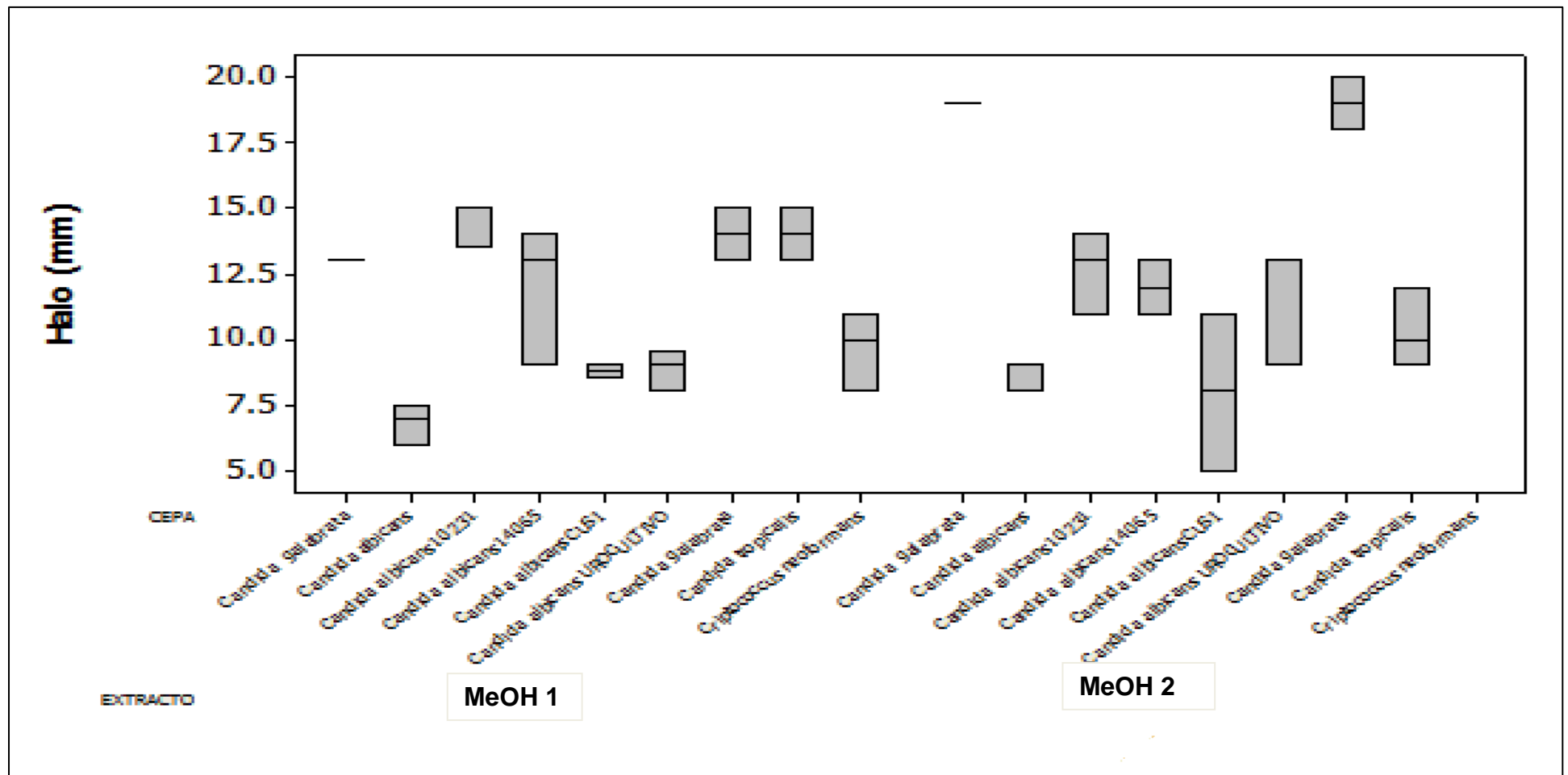


Fig.8. Halos de inhibición de las cepas de levadura para cada extracto y fracción. **MeOH 1**: Metanólico, **MeOH 2**: Fracción metanólica.

El comportamiento individual de cada una de las cepas, es el que se muestra en el diagrama de caja de la Fig.9, *Candida glabrata* y *Candida tropicalis* son las que presentan los mayores halos de inhibición y ambas tienen una  $M_e = 16$ , mientras que *Cándida albicans* es la que muestra los menores halos de inhibición cuya  $M_e = 7.750$ , Fig. 11. El ANOVA mostró diferencias significativas entre la relación que tiene cada cepa al extracto y su fracción. (( $F = 10.58$ ;  $P=0$ ).

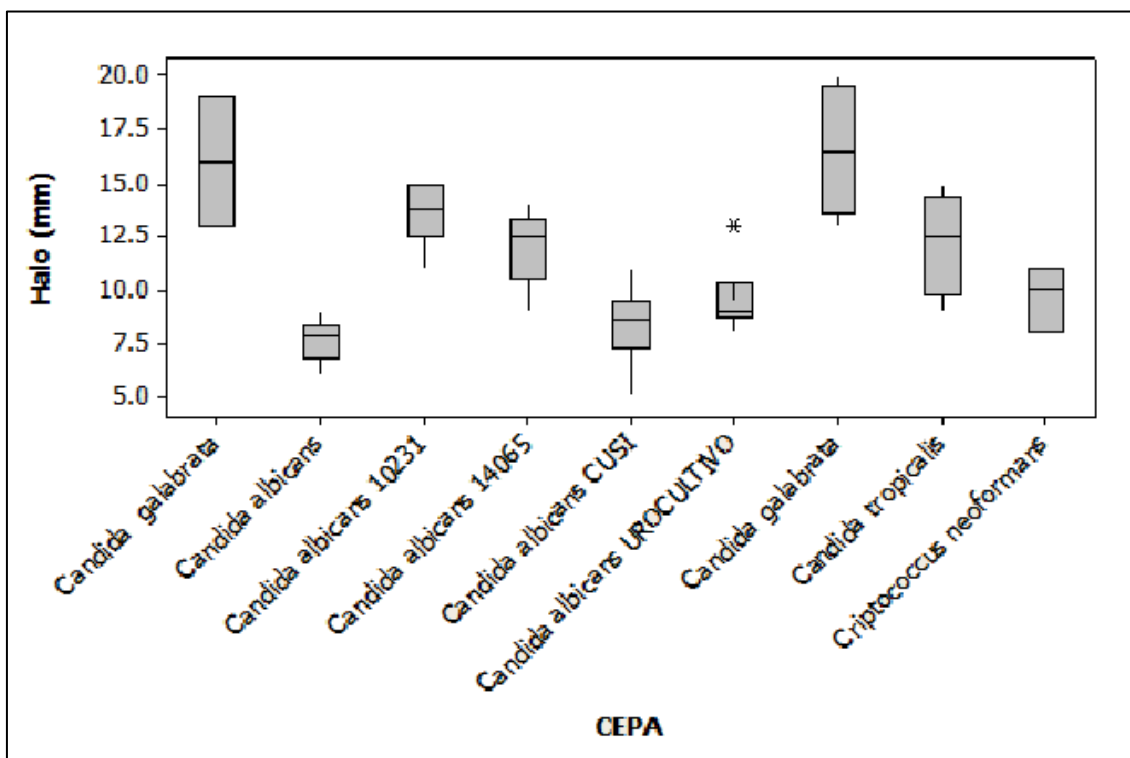


Fig.9. Halos de inhibición de las cepas de levadura,

### Evaluación cuantitativa

Los resultados de las pruebas de CMI y CFM (concentración fungicida media), para las cepas de levaduras se muestran en el cuadro 7, la prueba se realizó únicamente para **MeOH 2**. De acuerdo a los resultados, se encontró que las cepas de levaduras que mostraron ser más sensibles a la fracción del extracto **MeOH 2** fueron, *Candida albicans* urocultivo y *Candida tropicalis* ambas con una CMI= 0.5 mg/mL; CFM= 2 mg/mL, mientras que *Candida albicans* ATCC 14065 fue la cepa más resistente con CMI= 2 mg/ml; CFM= 4 mg/ml.



Cuadro 7. Determinación de la CMI y CFM, de las cepas de levaduras que presentaron inhibición del crecimiento con **MeOH 2**.

Levadura	MeOH 2 (mg/mL)	
	CMI	CFM
<i>Candida albicans</i>	1	2
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1	2
<i>Candida albicans</i> ATCC 14065	2	4
<i>Candida albicans</i> CUSI	1	2
<i>Candida albicans</i> UROCULTIVO	0.5	2
<i>Candida glabrata</i>	1	4
<i>Candida tropicalis</i>	0.5	2

#### **Actividad de MeOH 2 sobre la curva de crecimiento en levadura**

La fracción **MeOH 2** tuvo un efecto muy pobre sobre la curva de crecimiento de *Candida albicans* urocultivo, de acuerdo a la Fig.10, la población sólo disminuyó a las 4 y 12 horas del tratamiento. En el caso de *Candida tropicalis* el comportamiento de la fracción **MeOH 2** también fue similar, como se puede ver en la Fig. 11, a pesar de esto no existió un descenso en la población en ninguno momento, es decir que el crecimiento se mantuvo constante y homogéneo.

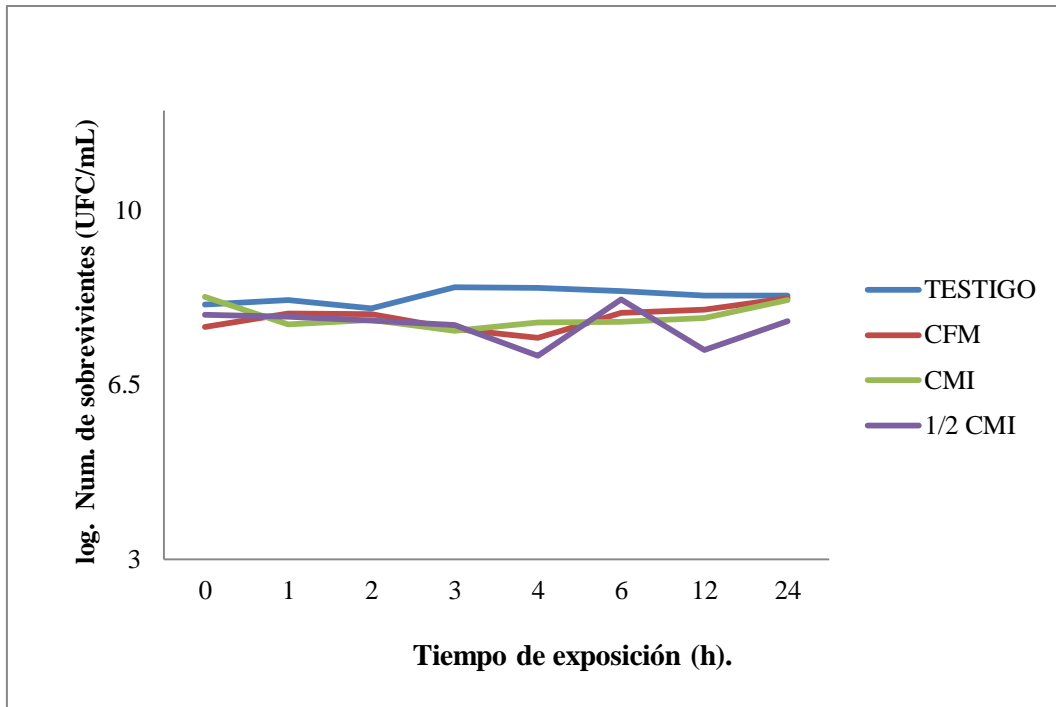


Fig. 10. Actividad de **MeOH 2** sobre la curva de crecimiento de *Candida albicans* urocultivo.

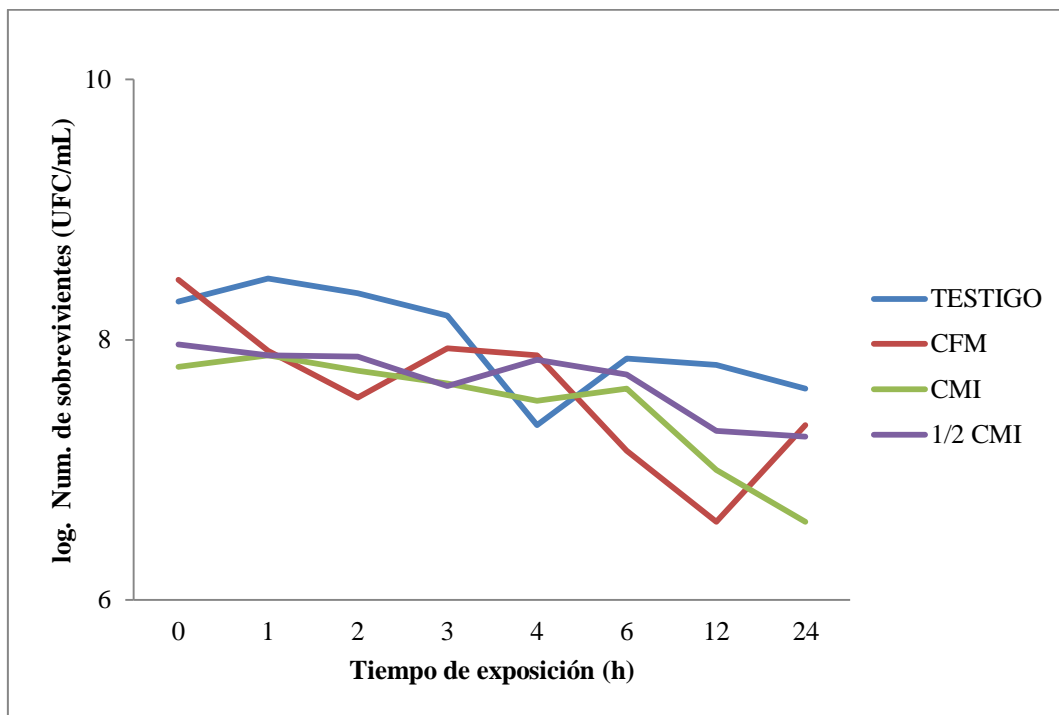


Fig. 11. Actividad de **MeOH 2** sobre la curva de crecimiento de *Candida tropicalis*

## EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA EN HONGOS FILAMENTOSOS

### Evaluación cualitativa

Los resultados de las pruebas cualitativas se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8. Actividad del extracto y las fracciones de *A. mexicana* sobre hongos filamentosos.

Cepa fúngica	MeOH 1	MeOH 2	H
<i>Aspergillus niger</i>	A	N.A	N.A
<i>Aspergillus sp.</i>	A	A	N.A
<i>Fusarium moniliforme</i>	A	A	A
<i>Fusarium moniliforme</i> CDBB-H-265.	N.A	N.A	N.A
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	A	A	A
<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	A	A	A
<i>Tricophyton mentagrophytes</i> CDBB-H-1112	N.A	N.A	N.A
<i>Rhizoctonia solani</i>	A	N.A	N.A
<i>Rhizoctonia lilacina</i>	N.A	N.A	N.A

MeOH 1: extracto metanólico crudo, MeOH 2: Fracción metololica libre de compuestos no polares,, H: fracción hexánica, N.A: no activo y A: con actividad.

De las nueve cepas de hongos filamentosos sobre las que se evaluó la actividad de **MeOH 1**, **MeOH 2** y **H**, sólo *Tricophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112 y *Fusarium moniliforme* CDBB-H-265, no presentaron sensibilidad a ninguno de estos. Mientras que en contraparte *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichioides* y *Tricophyton mentagrophyte* fueron sensibles a estos tres, el resto de las cepas sólo mostraron sensibilidad a una o dos de las muestras.

### Evaluación cuantitativa.

#### *Aspergillus niger*

Las concentraciones bajas del extracto **MeOH 1** no presentaron actividad alguna sobre *Aspergillus niger*, la inhibición del crecimiento se presenta a partir de los 3 mg/mL. el porcentaje de inhibición más alto ocurre en la concentración de 4 mg/mL con apenas un 31.3%, (Cuadro 9) . Se puede decir entonces que la  $CF_{50}$  se encuentra por arriba de la concentración más alta que se aplicó.

Cuadro 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Aspergillus niger*, a diferentes concentraciones de **MeOH 1**.

Concentración (mg/mL)	% de Inhibición para MeOH1
0.25	0 ± 0
0.5	0 ± 0
1	0 ± 0
2	0 ± 0
3	29.3 ± 0.577
4	31.3 ± 0.577

### ***Aspergillus sp.***

Al probar el efecto de **MeOH 1** y **MeOH 2** sobre *Aspergillus sp* se puede ver que el porcentaje de inhibición es mayor en **MeOH 2** ya que con esta fracción el crecimiento del hongo comienza a disminuir desde la concentración más baja de 0.25 mg/mL con un 6.67% y en donde el porcentaje de inhibición más alto ocurre en la concentración de 4 mg/mL con un 40%, en contraparte en **MeOH1** esta disminución del crecimiento se da a partir de la concentración de 3 mg/mL. y al igual que en **MeOH 1** la inhibición más alta está en la concentración de 4 mg/mL con un 29.3 % (Cuadro 10), esta disminución se ilustra en las Fig.12 y Fig.13. Por lo tanto en ambos casos la  $CF_{50}$  se encuentra por arriba de la concentración más alta, es decir que es mayor a 4 mg/mL.

Cuadro 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Aspergillus sp*

Concentración (mg/mL)	% de Inhibición	
	MeOH 1	MeOH 2
0.25	0 ± 0	6.67 ± 0
0.5	0 ± 0	31.11 ± 1.527
1	0 ± 0	35.56 ± 0.577
2	0 ± 0	37.78 ± 0.577
3	24.7 ± 0.577	37.78 ± 0.577
4	29.3 ± 0.577	40 ± 0

MeOH 1: extracto crudo y MeOH 2: fracción metanólica.

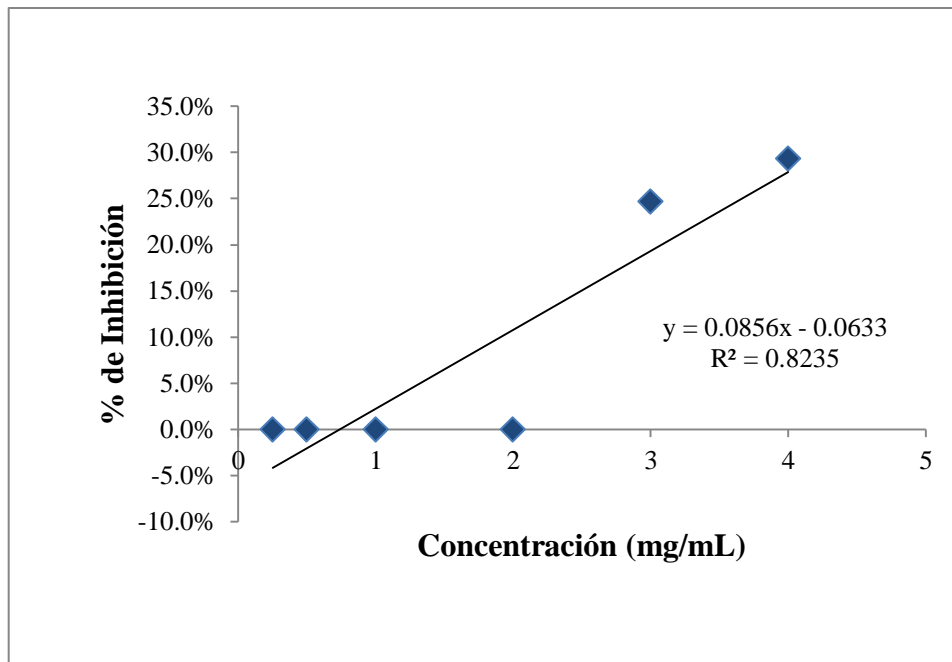


Fig.12. Porcentaje de inhibición del extracto **MeOH 1**, sobre *Aspergillus sp.*

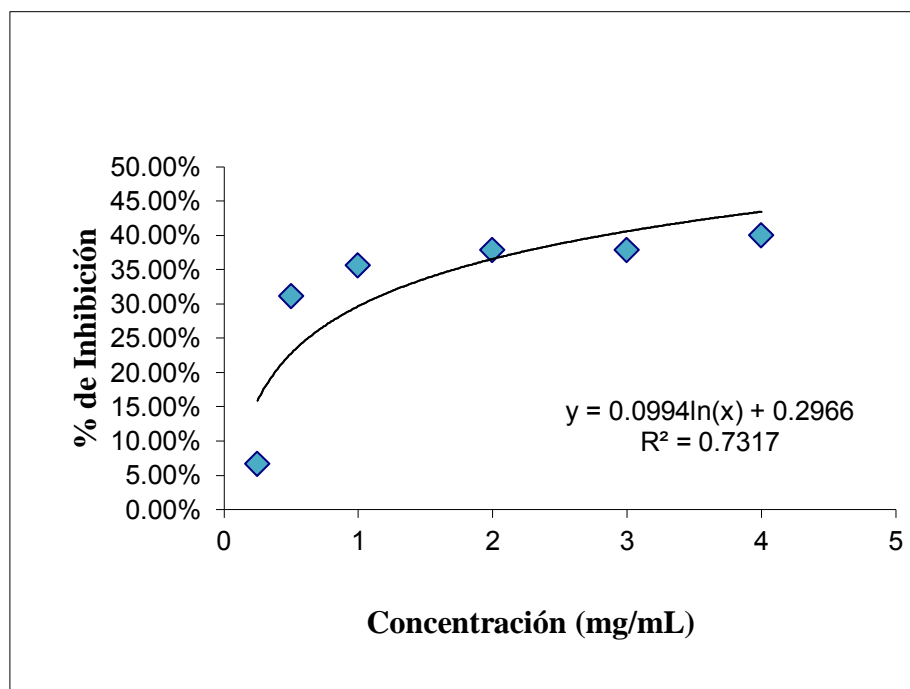


Fig.13. Porcentaje de inhibición de la fracción, **MeOH 2** sobre *Aspergillus sp.*

### ***Fusarium moniliforme***

Tanto el extracto **MeOH 1**, así como sus fracciones **MeOH 2** y **H** inhibieron el crecimiento de *Fusarium moniliforme*. En el caso de **MeOH 1** sólo alcanzó, con la concentración más alta (4mg/mL), a inhibir el 42.7% de la cepa de hongo (Fig. 15). Por otro lado **MeOH 2** y **H** mostraron tener actividad desde la concentración de 1mg/mL y de 2mg/ml, respectivamente, y ambas fracciones sobrepasaron el 50% de inhibición del crecimiento de la cepa Fig. 14 y Fig. 15. Sin embargo la fracción **H**, mostró tener mayor actividad para inhibir el crecimiento, alcanzando en 4mg/mL un 53.33% de inhibición cuadro 11, Fig.18. Las  $CF_{50}$  para cada uno son **MeOH 2**= 3.49 mg/mL y **H**= 3.66 mg/mL, como se puede ver en el Cuadro 15.

Cuadro 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium moniliforme*, a diferentes concentraciones

Concentración (mg/mL)	% de Inhibición		
	MeOH 1	MeOH 2	H
0.25	0±0	0±0	0±0
0.5	0±0	0±0	0±0
1	16±0.577	37.78±0.577	0±0
2	23.3±0.577	42.22±0.577	42.22±1.527
3	33.3±0	42.22±0.577	51.11±1.527
4	42.7±0.577	51.11±1.527	53.33±1

MeOH 1: Extracto metanólico; MeOH 2: fracción metanólica; H: fracción hexánica.

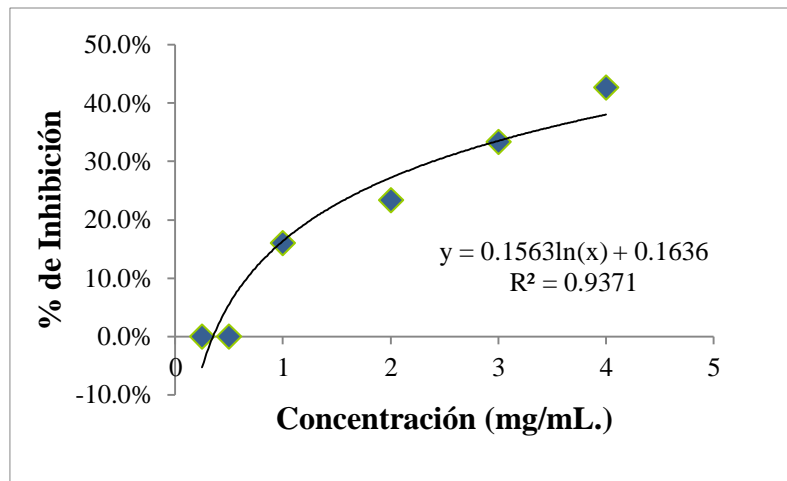


Fig.14 Porcentaje de inhibición del extracto **MeOH 1** sobre *Fusarium moniliforme*.

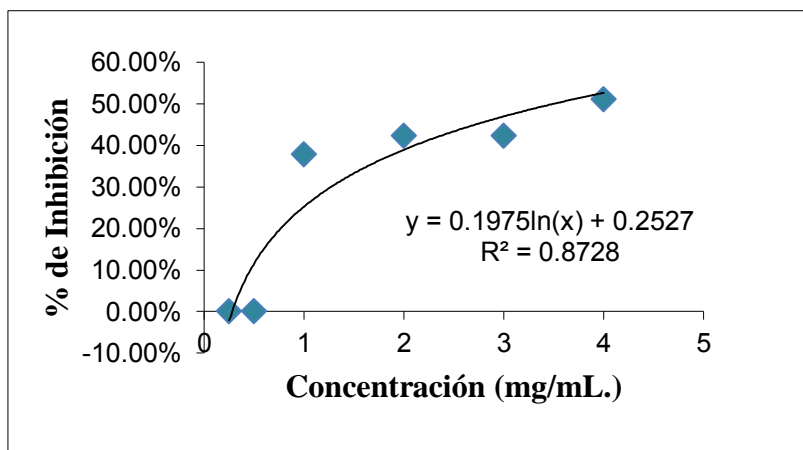


Fig.15. Porcentaje de inhibición de la fracción metanólica **MeOH 2** sobre *Fusarium moniliforme*.

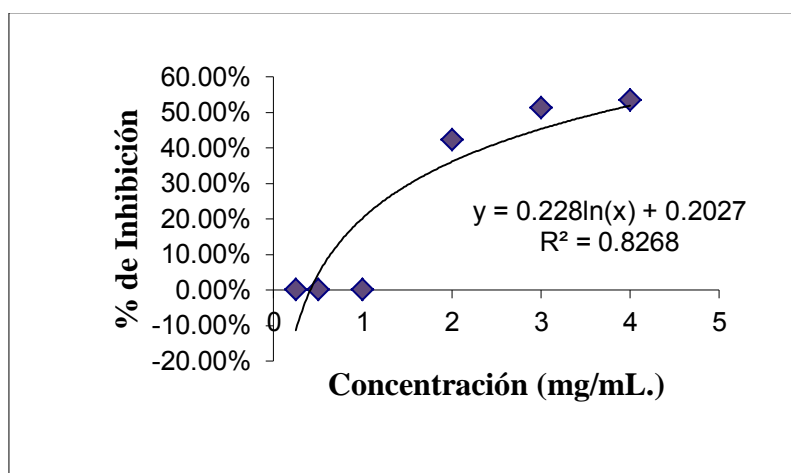


Fig.16. Porcentaje de inhibición de la fracción hexánica H, sobre *Fusarium moniliforme*.



### ***Fusarium sporotrichioides***

El extracto **MeOH 1** así como las fracciones **MeOH 2** y **H** mostraron actividad sobre el crecimiento del hongo, los tres presentaron el más alto porcentaje de inhibición en la concentración más alta (4mg/mL), siendo **MeOH 2** el que logró inhibir el 75.56% de la cepa (Fig.18), este resultado es muy similar al de **H** donde se inhibió el 73.33 % (Fig. 19) mientras que en **MeOH 1** sólo se alcanzó el 51.3% (Fig.17). Por otra parte ni **MeOH 1** ni **H** mostraron actividad en las primeras concentraciones mientras que **MeOH 2** sólo presentó actividad en la última concentración, Cuadro 12

Las  $CF_{50}$  para cada uno son **MeOH 1**= 4.39 mg/mL, **MeOH 2**= 4.26 mg/mL y **H**= 2.41 mg/mL, como se puede ver en el Cuadro 15.

Cuadro 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Fusarium sporotrichioides*

Concentración (mg/mL)	% de Inhibición		
	MeOH 1	MeOH 2	H
0.25	0±0	0±0	0±0
0.5	0±0	0±0	0±0
1	16±0.577	0±0	0±0
2	29.3±0.577	0±0	48.89±0.577
3	46.7±0	0±0	57.78±0.577
4	51.3±0.577	75.56±0.577	73.33±1

MeOH 1: Extracto metanólico; MeOH 2: fracción metanólica; H: fracción hexánica.

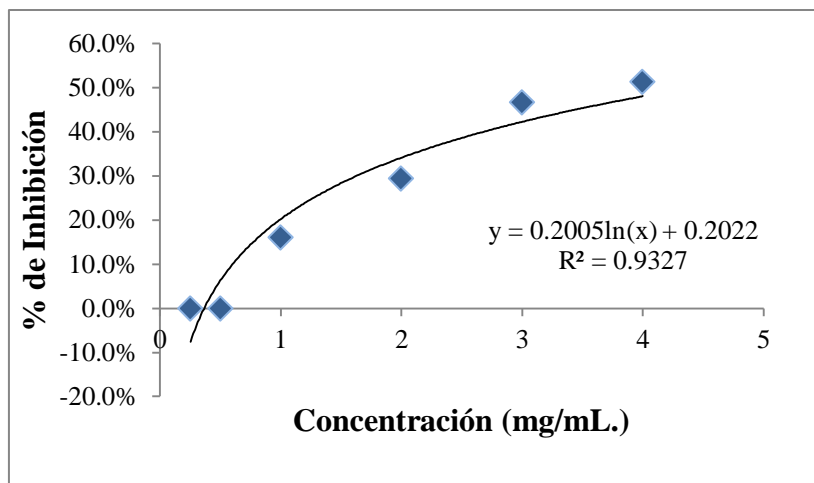


Fig.17. Porcentaje de inhibición del extracto **MeOH 1**, sobre *Fusarium sporotrichioides*.

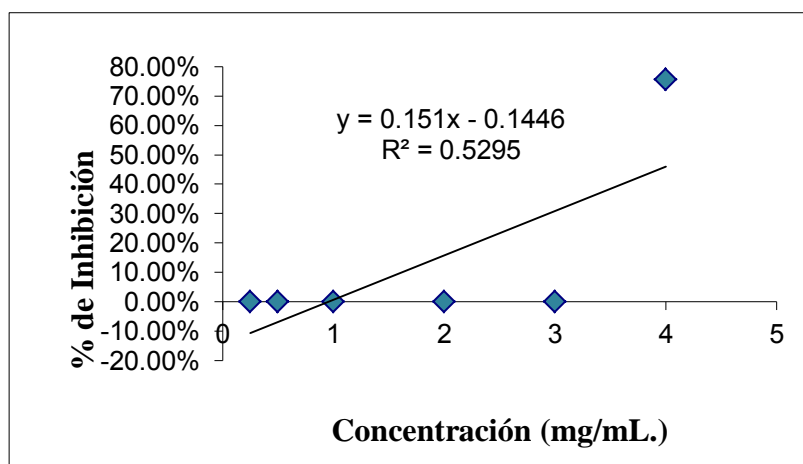


Fig.18. Porcentaje de inhibición de la fracción metanólica **MeOH 2**, sobre *Fusarium sporotrichioides*.

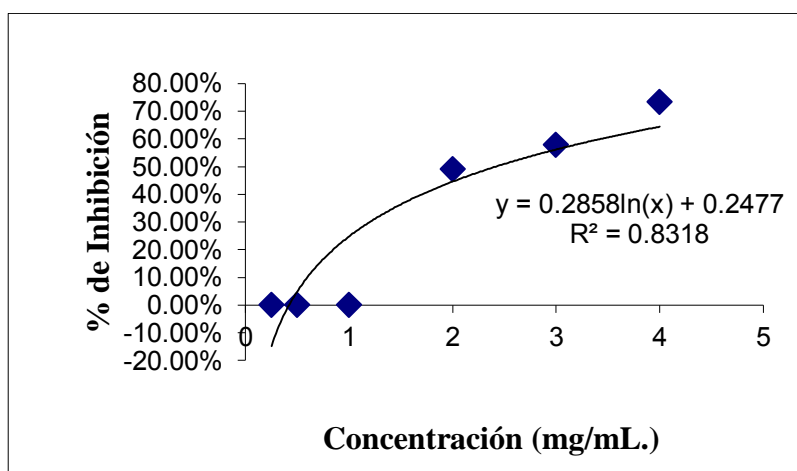


Fig.19. Porcentaje de inhibición de la fracción hexánica **H**, sobre *Fusarium sporotrichioides*.

### ***Tricophyton mentagrophytes***

La cepa mostró sensibilidad al extracto **MeOH 1** y sus fracciones **MeOH 2** y **H**, sin embargo esta sensibilidad fue mayor en **MeOH 1**, ya que se inhibió el 82% de la cepa total (Fig.20), mientras que en **MeOH 2** y **H** sólo se inhibió el 53.33% y el 51.11% respectivamente Fig. 21 y Fig. 22, estos resultados se muestran en la concentración más alta de cada uno, pero la actividad se presentó, en cada uno de los casos, desde la concentración más baja (0.25mg/mL) tomando en cuenta esto, se puede decir que en la fracción **H** es donde se muestra la actividad más baja (Cuadro 13).

Las  $CF_{50}$  para cada uno fueron **MeOH 1**= 1.41 mg/mL **MeOH 2**= 3.91 mg/mL y **H**= 4.83 mg/mL, como se puede ver en el Cuadro 15.

Cuadro 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Tricophyton mentagrophytes*.

Concentración (mg/mL)	% de Inhibición		
	MeOH 1	MeOH 2	H
0.25	24±1.15	20±0	17.78±2.30
0.5	27±1	24.44±0.57	17.78±0.57
1	31±0.57	28.89±0	22.22±5.77
2	49±0.57	35.56±0.57	33.33±1
3	67±0	51.11±0.57	48.89±1.15
4	82±0.57	53.33±6.35	51.11±0.57

MeOH 1: Extracto metanólico; MeOH 2: fracción metanólica; H: fracción hexánica.

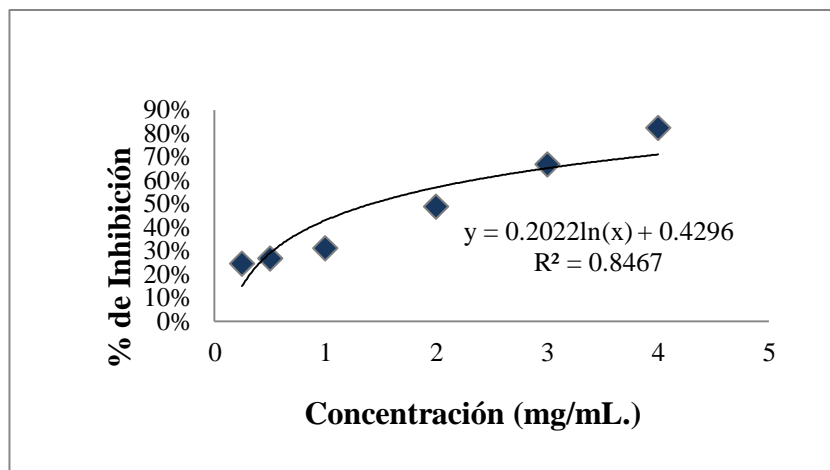


Fig.20. Porcentaje de inhibición del extracto **MeOH 1**, sobre *Tricophyton mentagrophyte*.

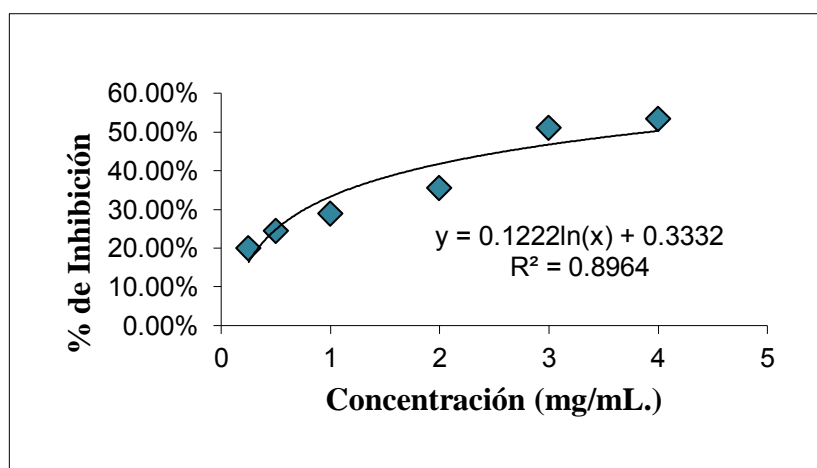


Fig.21. Porcentaje de inhibición de la fracción metanólica **MeOH 2**, sobre *Tricophyton mentagrophyte*.

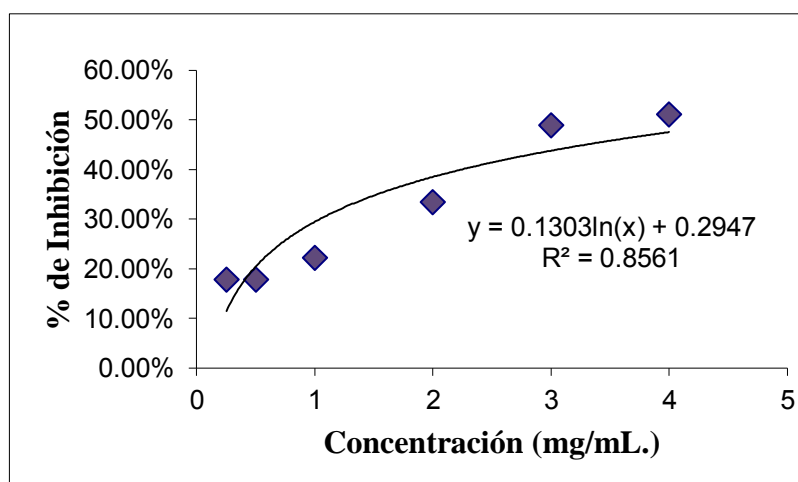


Fig.22. Porcentaje de inhibición de la fracción hexánica **H**, sobre *Tricophyton mentagrophyte*.

Cuadro 14. Concentración Fungicida media para las diferentes cepas de hongos

Cepa fúngica	CF <sub>50</sub> (mg/mL)			KETOKONAZOL μg/mL (Control)
	MeOH 1	MeOH 2	H	
<i>Aspergillus niger</i>	>4	-	-	15.297
<i>Aspergillus sp.</i>	>4	>4	-	9.757
<i>Fusarium moniliforme</i>	>4	3.49	3.66	7.55
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	4.39	4.26	2.41	3.90
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1.41	3.91	4.83	19.677

MeOH 1: Extracto metanólico, MeOH 2: fracción metanólica y H: fracción hexánica

### Comparación del efecto del extracto y sus fracciones sobre las cepas de hongos.

Para poder hacer la comparación de la efectividad de los diferentes extractos, en sus diferentes concentraciones sobre las cepas de hongos en los que se inhibió más del 50% del crecimiento de la cepa (las cuales fueron: *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichioides* y *Tricophyton mentagrophytes*, se llevó a cabo un análisis de varianza de tres factores.

Los resultado del análisis mostraron que la fracción **MeOH 2**, presentó el porcentaje de inhibición más alto con una  $M_e = 33.30$ , sin embargo no existieron diferencias significativas entre el extracto y cada una de las fracciones ( $F=0.86$ ,  $P=0.423$ ) (Fig. 24).

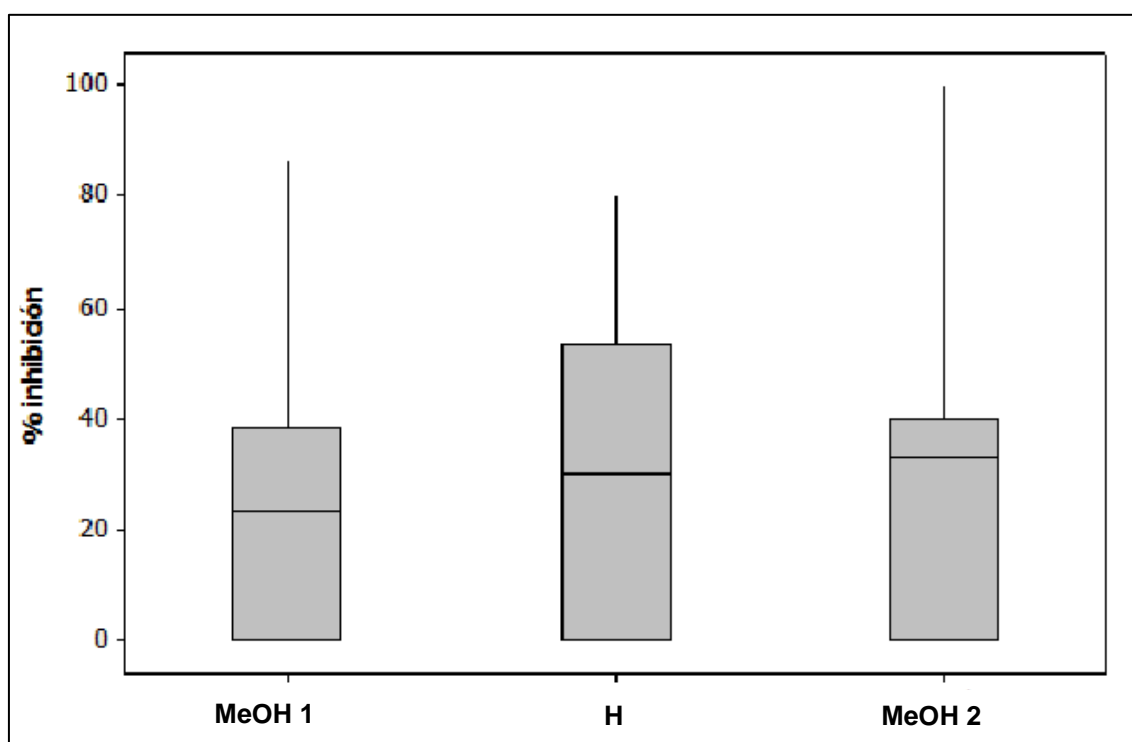


Fig. 23. Porcentaje de inhibición de **MeOH 1**: Extracto metanólico, **H**: Fracción hexánica y **MeOH 2**: Fracción metanólica.

De las cepas de hongos sobre las que se probó el extracto y cada una de sus fracciones, la cepa más sensible a estos fue *T. mentagrophytes* ( $M_e = 33.30$ ), al presentar el mayor porcentaje de inhibición, por otra parte la cepa con el porcentaje de inhibición menor fue *F. sporotrichoides* con una  $M_e = 0.00$ , (Fig.25).

Los resultados del análisis de varianza muestran que si existieron diferencias significativas ( $F=19.10$ ,  $P=0.00$ ), entre el porcentaje de inhibición de cada una de las cepas, probadas ante el extracto y cada una de sus fracciones.

Por otro lado el efecto que tiene el aumento en la concentración del extracto y de cada fracción contra el porcentaje de inhibición es directamente proporcional, es decir a mayor concentración mayor es el porcentaje de inhibición de la cepa, en la Fig. 26 se puede ver así que la concentración de 4mg/mL es en la que presento mayor porcentaje de inhibición con una  $M_e = 53.30$ , mientras que en la concentración de 0.25mg/mL no hubo inhibición.

De acuerdo a el análisis de varianza, se puede decir entonces que si existen diferencias significativas ( $F=64.50$ ,  $P=0.00$ ), entre cada una de las concentraciones y el efecto que tuvieron sobre el crecimiento de las diferentes cepas.

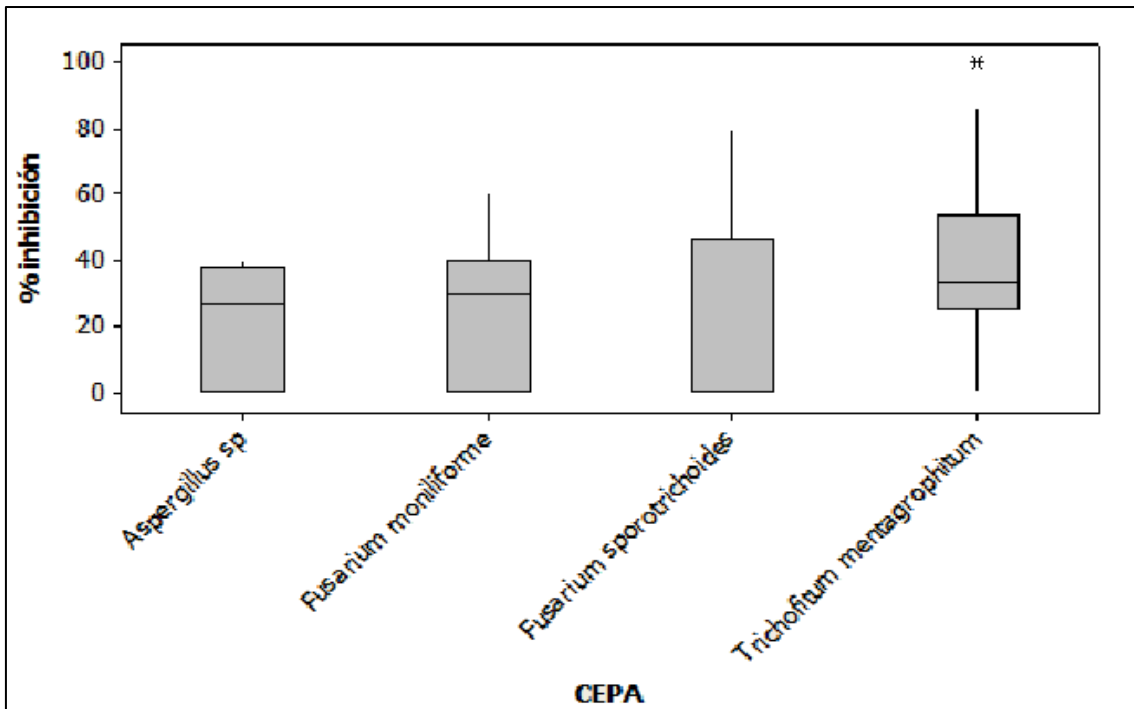


Fig. 24. Porcentaje de inhibición de cada una de las cepas de hongos filamentosos. (\*) Dato atípico.

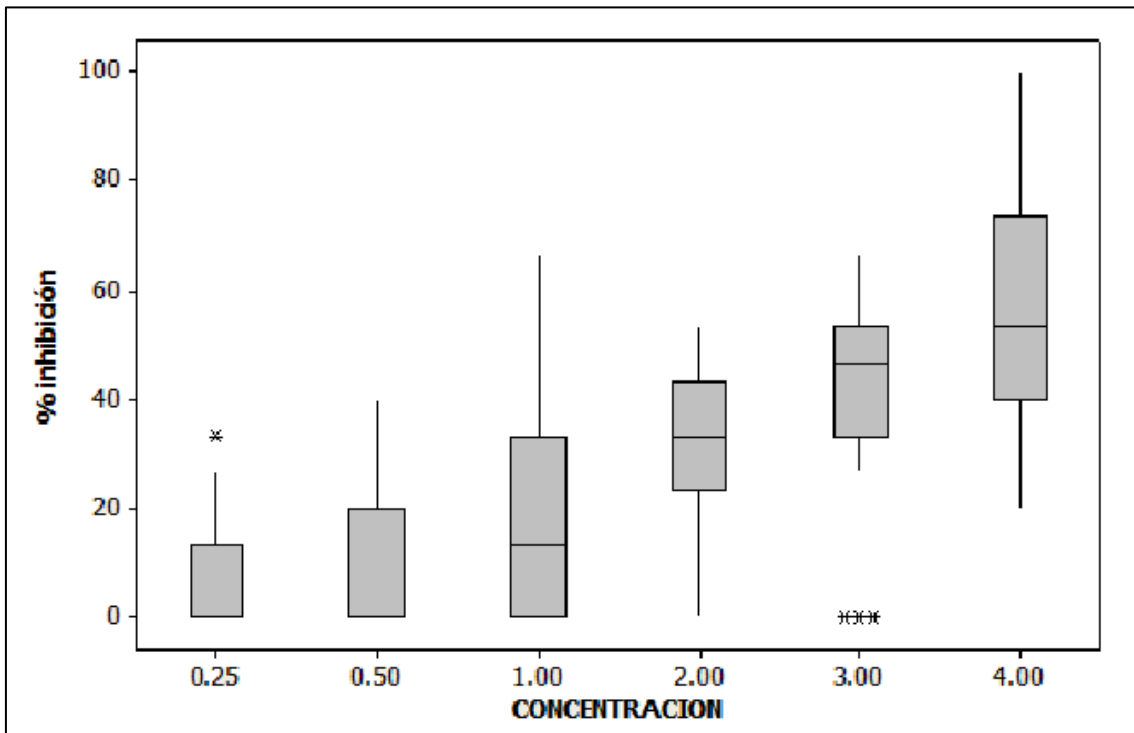


Fig.25. Porcentaje de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto y cada una de las fracciones.



La fracción **MeOH 2** mostró el mejor resultado, pues las medianas de las cepas están por arriba de cero a partir de la concentración más baja de 0.25mg/mL, mientras que en **MeOH 1** y **H** no sucede así, en esta fracción la mediana más alta fue de *Fusarium moniliforme*,  $M_e = 73.3$  en la concentración de 4mg/mL. Sin embargo es en el extracto **MeOH 1** donde se encontró la mediana más alta de *Tricophyton mentagrophytes*,  $M_e = 80$  en la concentración de 4mg/mL en contra parte las medianas mas bajas son aquellas cuyo valor fue cero y estas se encuentran tanto en el extracto como en sus fracciones. (Fig.27).

Con base al análisis de varianza de tres factores se puede decir entonces que si existieron diferencias significativas ( $P=2.72$ :  $F=0.004$ ), entre la interacción que hay entre las cepa, el extracto o fracciones y la concentración que se aplicó de cada uno de estos.

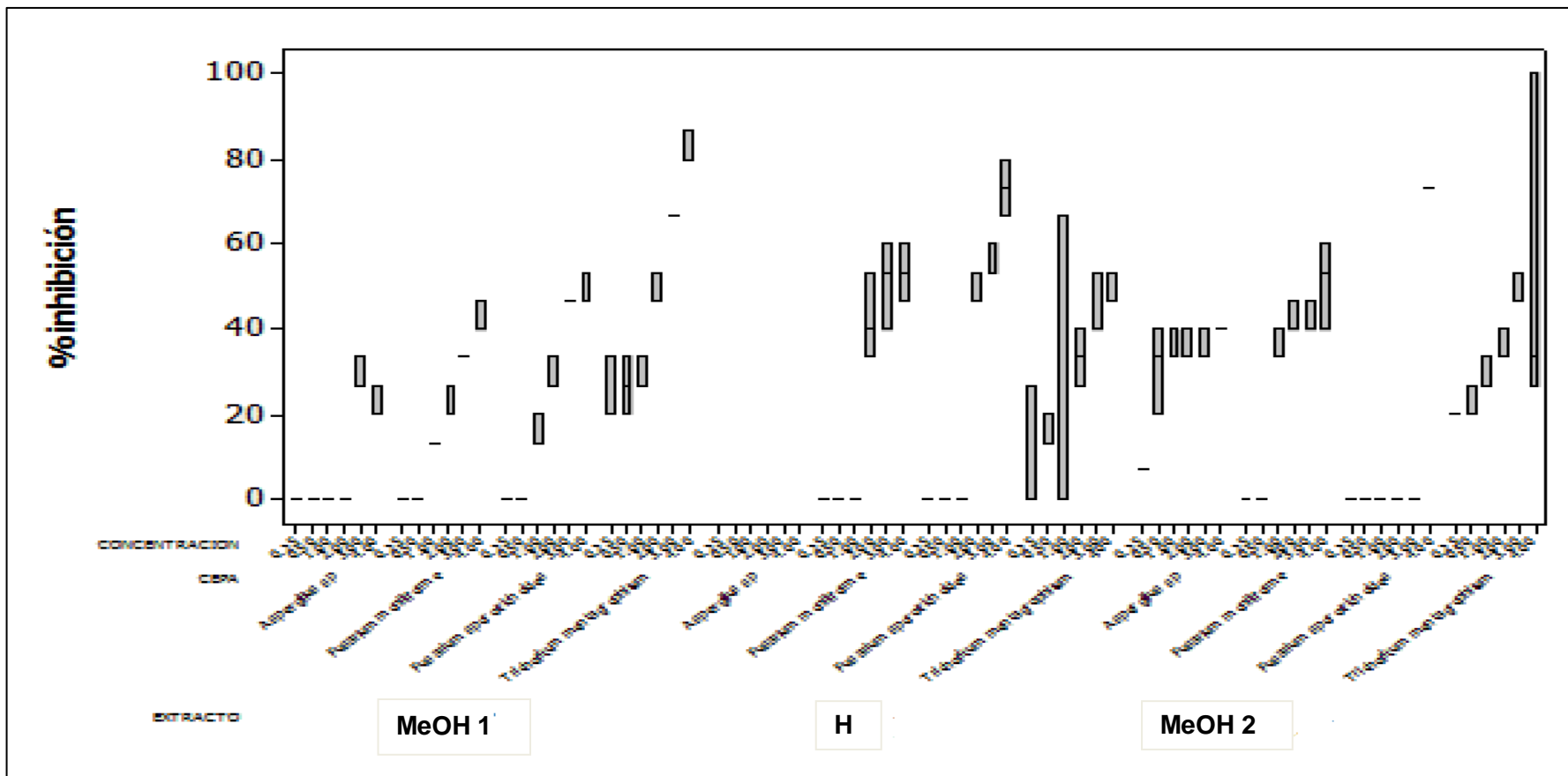


Fig. 26. Porcentaje de inhibición de cada una de las cepas probadas con **MeOH 1**: Extracto metanólico, **H**: Fracción hexánica y **MeOH 2**: Fracción metanólica y a diferentes Concentraciones de cada uno que van desde 0.25-4.

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE MeOH 1 Y MeOH 2.

Tanto las concentraciones que se usaron del extracto **MeOH 1** Fig.28 así como de su fracción **MeOH 2** Fig.29, tienen una relación directamente proporcional con el porcentaje de reducción del DPPH, es decir que a medida que se incrementa la concentración del extracto o la fracción aumenta el porcentaje de reducción, además en ambos casos los valores comienzan a mantenerse constantes cerca del 80% de reducción, lo cual indica que aunque incrementemos la concentración del extracto o la fracción, los valores que obtengamos van a fluctuar entre el 70% y el 80%, y no va a haber un incremento significativo en la reducción.

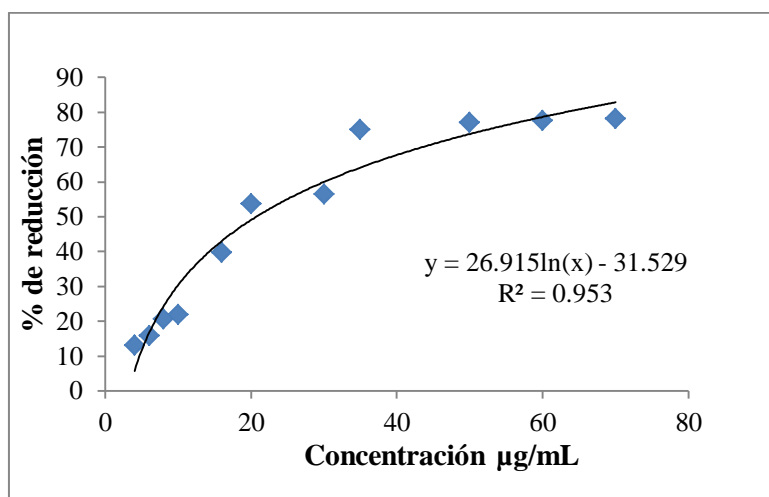


Fig.27. Porcentaje de reducción del DPPH en relación a la concentración del extracto **MeOH 1**.

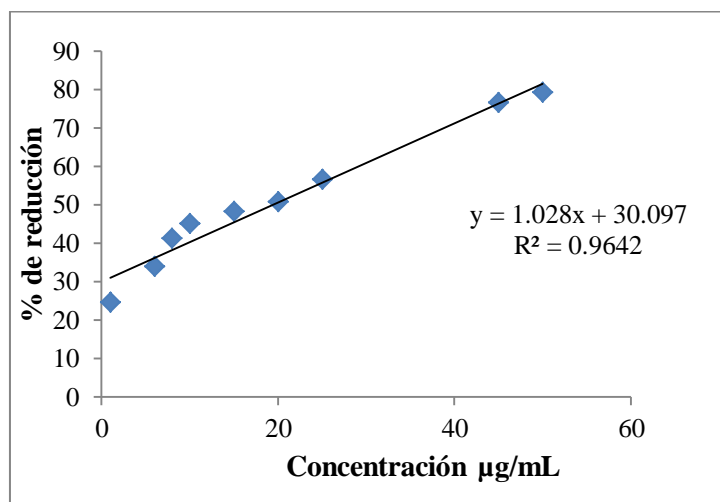


Fig. 28. Porcentaje de reducción del DPPH en relación a la concentración de la fracción **MeOH 2**.

Por otra parte entre el extracto **MeOH 1** y su fracción **MeOH 2**, el que presento mejor actividad antioxidante fue el extracto **MeOH 1** con una  $CA_{50} = 1.98 \mu\text{g/mL}$ , lo cual quiere decir que se necesita menor concentración del extracto para reducir en un 50% el DPPH (Cuadro 16).

Cuadro 15. Actividad antioxidante del extracto MeOH 1 y su fracción **MeOH 2**

Extracto	$CA_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>MeOH 1</b>	1.98
<b>MeOH 2</b>	19.36
<b>Catequina</b>	2.83

## CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE *Argemone mexicana*

### Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

Se lograron identificar un total de 20 compuestos químicos que forman parte del extracto **MeOH 1** y la fracción **MeOH 2** de *A. mexicana*, por otra parte la fracción **H** aunque también fue inyectada no se logró identificar ningún compuesto, tal vez porque los compuestos que contiene no sean volátiles (Fig.31).

De los compuestos identificados, de acuerdo al tiempo de retención, se identificaron 3 compuestos con algún reporte de actividad antimicrobiana en **MeOH 1** los cuales fueron, Ácido  $\alpha$ -Linolénico con un 19.9%, Ácido Linoleico con el 6.87% y Cis-Pinano con 2.17% (Rivera, 2012) (Fig. 29 y cuadro 16).

En cuanto a la fracción **MeOH 2** sólo se identificaron 4 compuestos de los cuales solo la cafeína con 11.38 % ha sido reportada con actividad antimicrobiana, y de los compuestos presentes el más abundante fue el ácido hexadecanoico con 14.61% (Thomson, 1978) (Fig. 30 y cuadro16).

Del total de los compuestos identificados, se encontró que el extracto y su fracción solo coinciden en uno, se trata del Acido hexadecanoico el cual se encuentra en ambos en el mismo porcentaje.

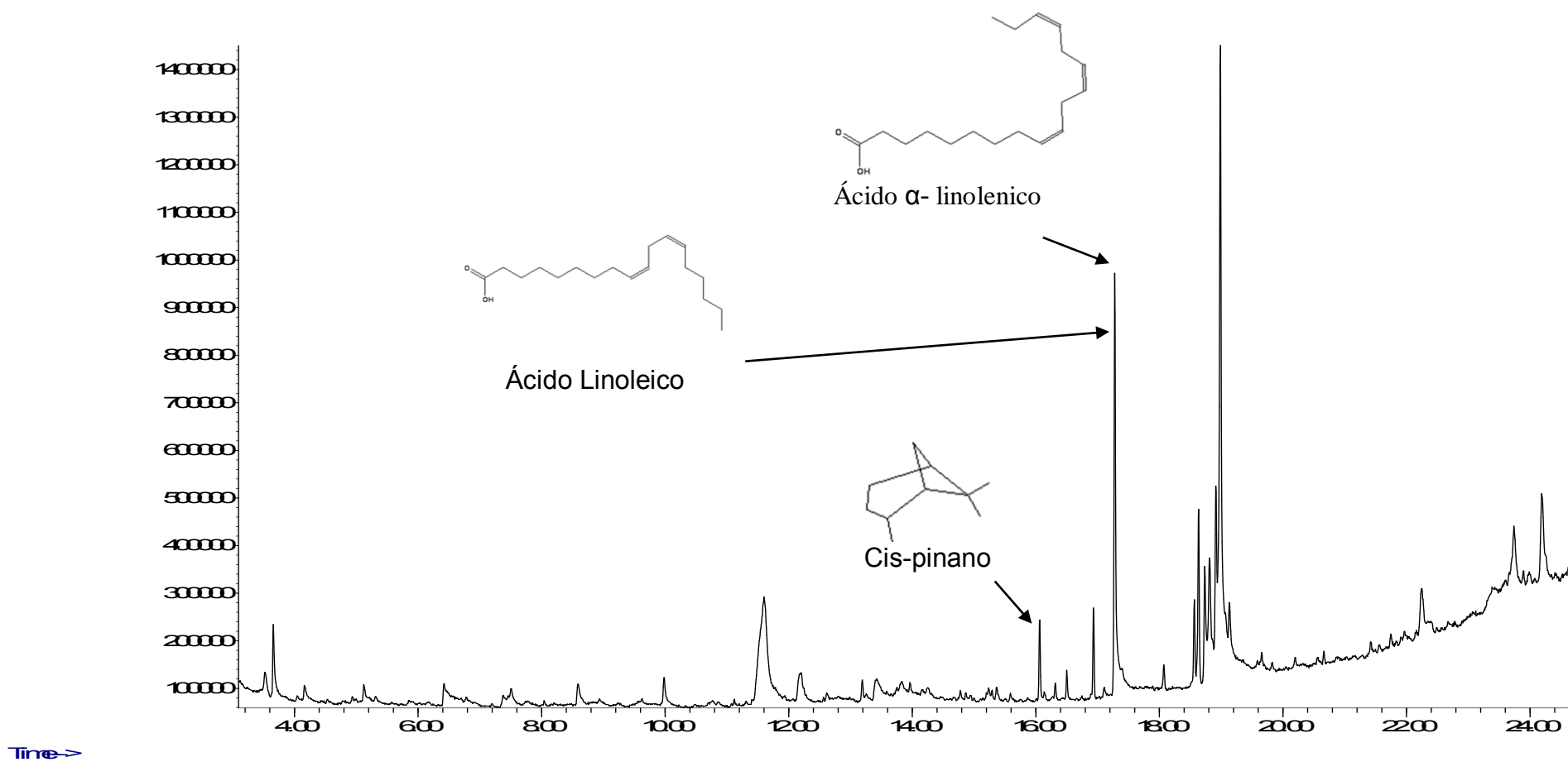


Fig. 29. Cromatografía de gases de **MeOH 1**.

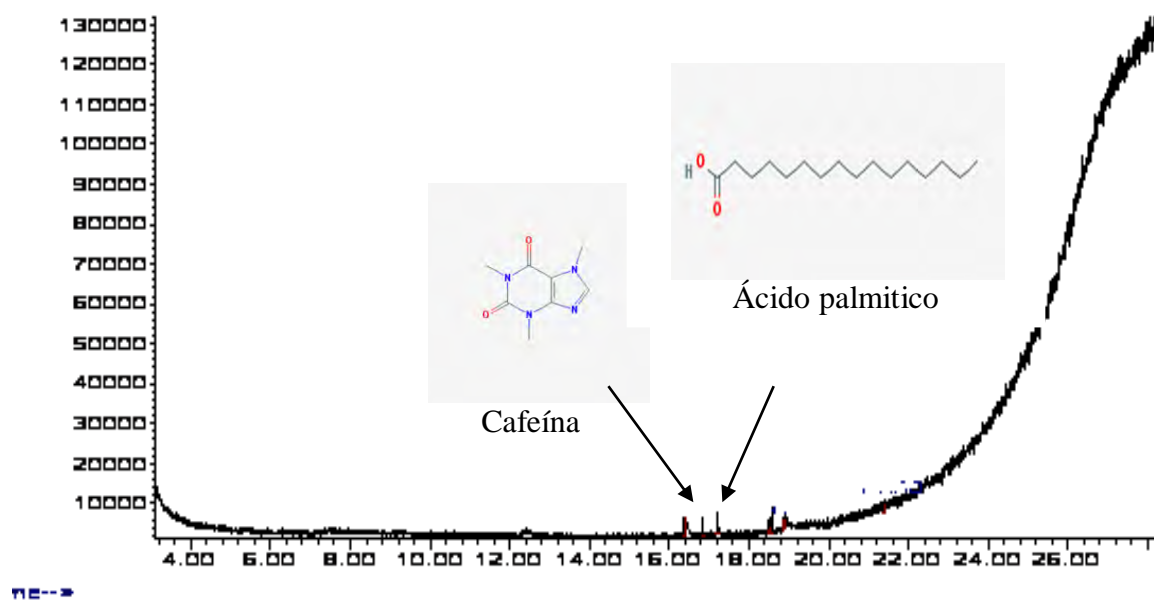


Fig.30. Cromatografía de gases de **MeOH 2**

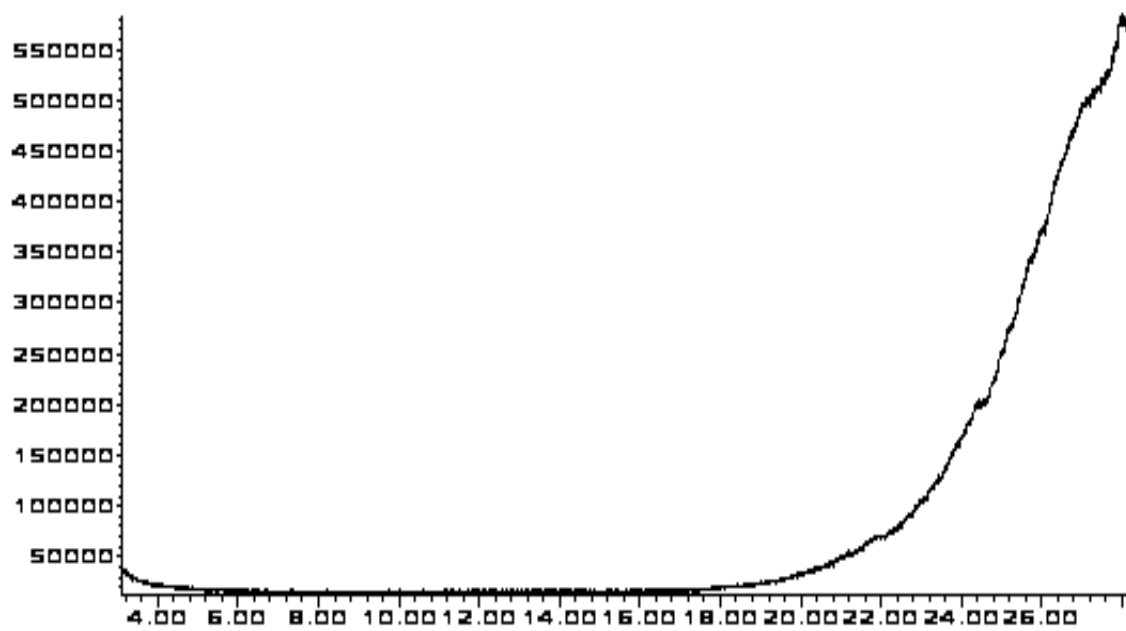
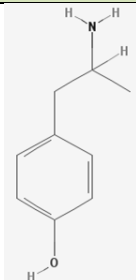

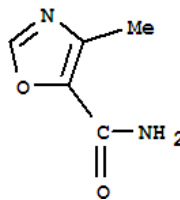
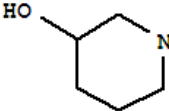
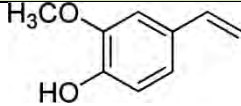
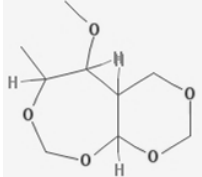
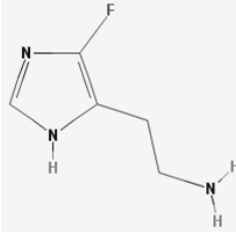
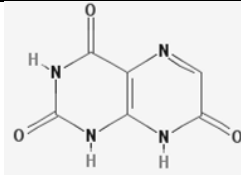
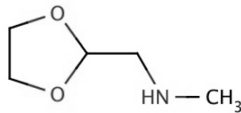


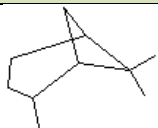
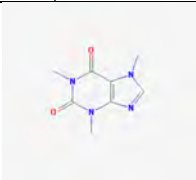
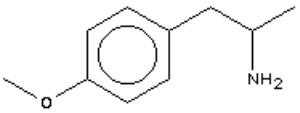
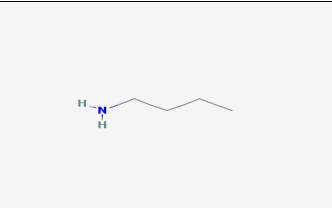

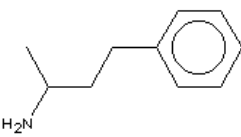
Fig.31. Cromatografía de gases de **H.**

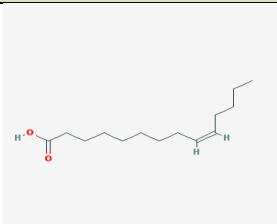
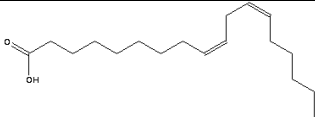
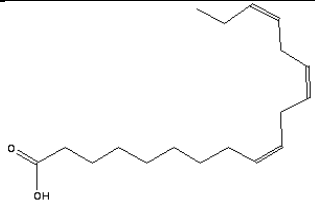
Cuadro 16 Compuestos que integran al extracto **MeOH 1** y la fracción **MeOH 2** de *A. mexicana*.

COMPOSICION QUIMICA DE <i>Argemone mexicana</i>				Tiempo de retención	
Nombre en Español	Nombre en Inglés	Porcentaje Total	Estructura Química	MeOH 1	MeOH 2
2-Amino-1-(o-hidroxifenil)propano	2-Amino-1-(o-hydroxyphenyl)propane	0.65		4.158	
Pentanal	Pentanal	0.67		5.121	
4 metil-5-oxazolcarboxamida,	5-Oxazolecarboxamide, 4-methyl-	1.00		6.423	
3- Piperidinol	3-Piperidinol	0.77		7.507	

Nombre en Español	Nombre en Inglés	Porcentaje Total	Estructura Química	MeOH 1	MeOH 2
p-Vinilguayacol	p-Vinylguaiacol	1.58		9.983	
1,3;2,5-Dimetileno-L-ramnitol	1,3;2,5-Dimethylene-L-rhamnitol	15.34		11.600	
4-Flourohistamina	4-Fluorohistamine	1.30		12.184	
Violapterina	violapterin	0.70		13.191	
2-Metilaminometil-1,3-dioxolano	2-Methylaminomethyl-1,3-dioxolane	0.92		13.409	



Nombre en Español	Nombre en Inglés	Porcentaje Total	Estructura Química	MeOH 1	MeOH 2
Cis-Pinano	cis-Pinane	2.17		16.065	
cafeína	caffeine	11.38			16.379
4-metoxiamfetamina	4-methoxyamphetamine	0.67		16.501	
3-metil, 1-butamina	1-butamina,3-methyl	8.78			16.841
Ácido palmítico	n-hexadecanoic acid	14.61		17.194	17.193
Metilbenceno $\alpha$ -propanamida	$\alpha$ -Methylbenzenepropanamine	0.79		18.073	

Nombre en Español	Nombre en Inglés	Porcentaje Total	Estructura Química	MeOH 1	MeOH 2
Ácido miristoleico	Myristoleic acid	12.76			18.894
Ácido Linoleico	Linoleic acid	6.87		18.913	
Ácido $\alpha$ -Linolénico	$\alpha$ -Linolenic acid	19.9		18.990	

### Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Para obtener un panorama más amplio del contenido químico de la planta, debido a que la CG-EM nos muestra sólo los compuestos volátiles, fue necesario analizar el extracto y sus fracciones por medio de HPLC, con base a esto se lograron identificar compuestos como, flavonoides, flavonas, cumarinas, fenoles, los espectros obtenidos del HPLC tanto del extracto como de sus fracciones se muestran en las figuras 33, 34 y 36, y la interpretación de estos se encuentra en los cuadros 18, 19 y 20 respectivamente,

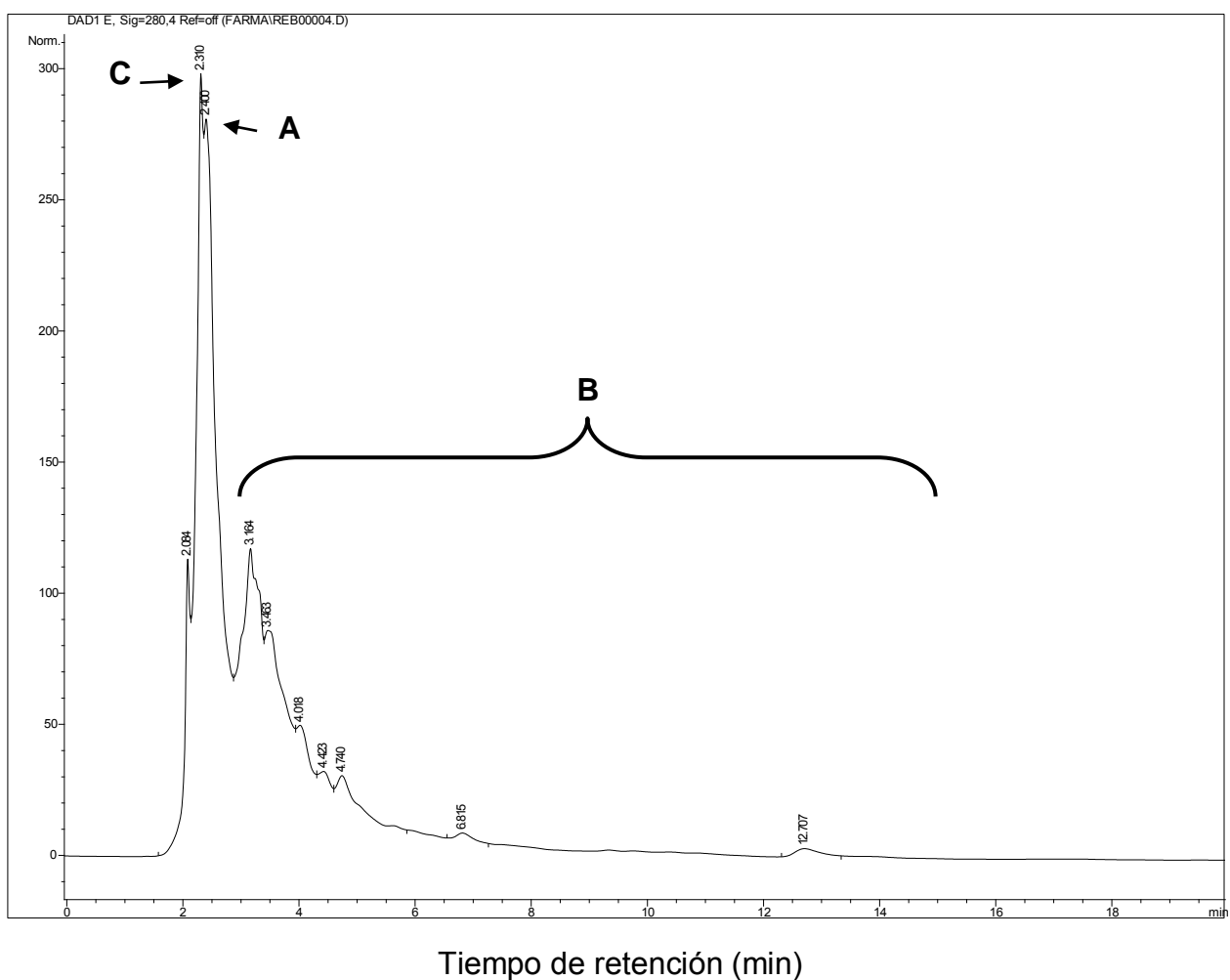


Fig. 32. Cromatograma de HPLC del extracto **MeOH 1** de *A. mexicana*.

A=fenol, B=Flavonoide y C=Derivado del ácido benzoico

Cuadro 17. Tiempo de retención y UV máxima del extracto **MeOH 1** de *A. mexicana*

No. Compuesto	Tiempo de Retención (min)	UV $\lambda$ máxima (nm)	Compuesto
1	2.09	202	-
2	2.31	296 320	Derivado del compuesto Benzoico
3	2.40	274	Fenol
4	3.15	270 296 318	Flovanona
5	3.45	254 268-322	Isoflavonas
6	4.01	256 266-324	Isoflavonas
7	4.42	316	
8	4.72	286 318	Flavanona
9	6.80	268 326	Isoflavonas
10	12.70	242 280 328	Flavonoide

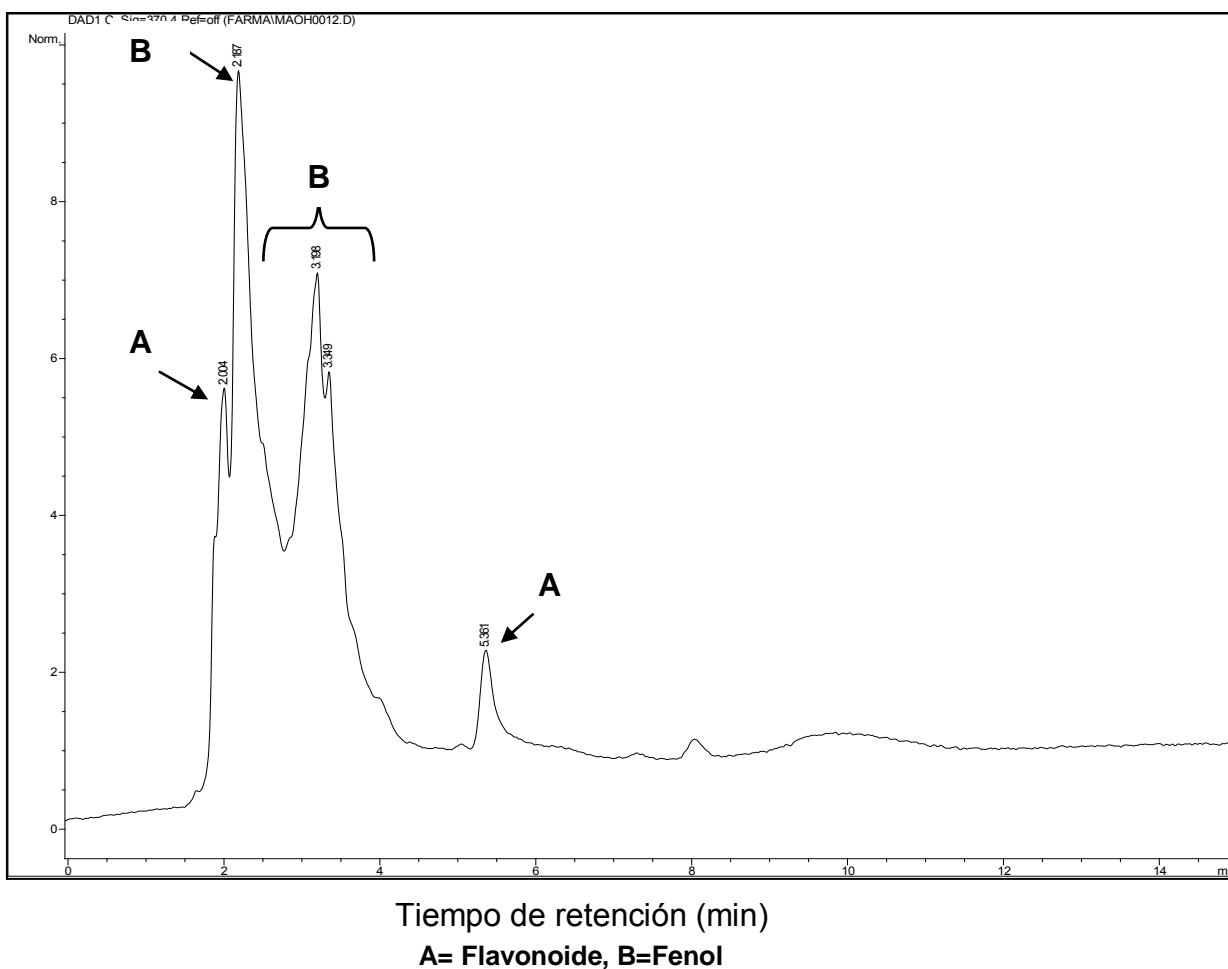
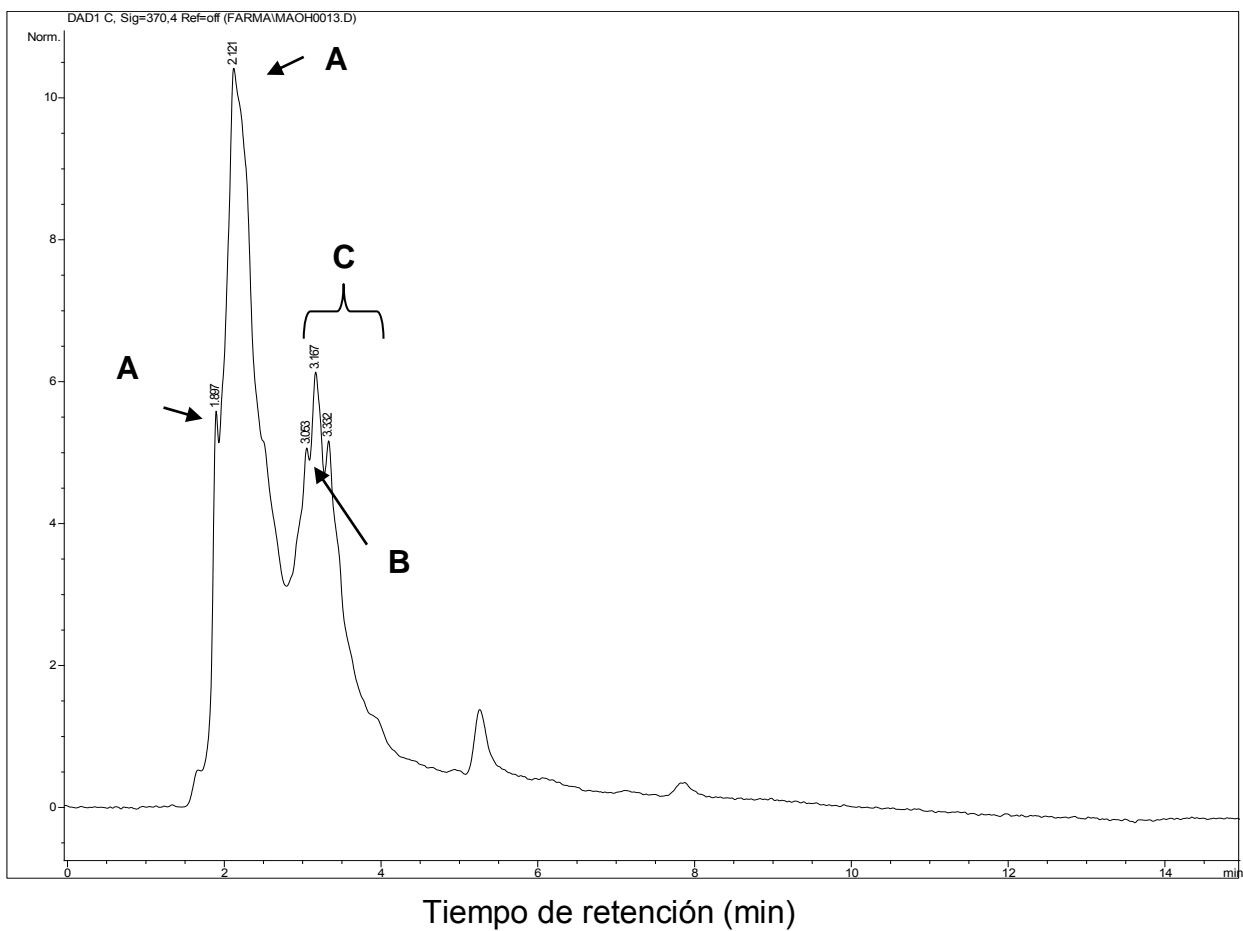


Fig. 33. Cromatograma de HPLC de la fracción metanólica, **MeOH 2** de *A. mexicana*.

Cuadro 18. Tiempo de retención y UV máxima de la fracción **MeOH 2** de *A. mexicana*

No. Compuesto	Tiempo de Retención (min)	UV $\lambda$ máxima (nm)	Compuesto
1	2.004	296-324	Flavonoide
2	2.187	274	Fenol
3	3.198	268	Fenol
4	3.349	266	Fenol
5	5.361	290- 320, 298-362	Flavonoide



**A=Fenol, B=Cumarina, C=Flavonoide**

Fig. 34. Cromatografía de HPLC de la fracción hexánica, **H** de *A. mexicana*.

Cuadro 19. Tiempo de retención y UV máxima de la fracción hexánica **H** de *A. mexicana*

No. Compuesto	Tiempo de Retención (min)	UV $\lambda$ máxima (nm)	Compuesto
1	1.897	276	Fenol
2	2.121	266	Fenol
3	3.053	256	Isoflavona
4	3.167	290-318	Flavonoide
5	3.332	290,288	Flavonoide

## DISCUSIÓN

En los últimos años han aumentado el número de publicaciones, relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana, centrándose las investigaciones en los productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas (Silver, 1993). Por ello actualmente, las especies de plantas promisorias de uso etnofarmacológico son fuente de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica (OMS, 2004). Como la presencia de metabolitos secundarios, que es un diverso grupo de moléculas involucradas en la adaptación de las plantas al ambiente (Granados et al., 2008). Dentro del grupo de estas moléculas encontramos a los alcaloides, cuya presencia se ha reportado en *Argemone mexicana* (Chang et al., 2003) y que por dicha razón esta especie ha sido objeto de estudio en diversos trabajos, en los cuales se ha probado la actividad antimicrobiana del extracto empleando una enorme gama de solventes, lo que hace que varíe el contenido químico en cada uno, por ejemplo los alcaloides y los flavonoides se pueden encontrar en extractos de cloroformo y metanol (Iwu et al., 1999).

Sin embargo, otro factor que puede determinar la variación en el contenido químico así como el rendimiento de una especie de planta, es la ubicación geográfica al igual que el entorno, ya que las plantas desarrollan metabolitos secundarios con base a cambios en el ambiente como medidas de adaptación contra herbívoros o con actividad antioxidante (Sepulveda et al., 2003) que en el caso de la especie de *A. mexicana* empleada en el desarrollo de este trabajo puede deberse así a la gran variedad de ambientes dentro del área de estudio del valle de Tehuacán–Cuicatlán, resultado de diversos factores climáticos, la presencia de abanicos aluviales, laderas con diferente orientación e inclinación, así como una diversa litología superficial muy variada (Valiente et al., 2000).

Para el desarrollo de este trabajo no se emplearon extractos de diferentes solventes, como en la mayoría de las metodologías consultadas, sino que se usó un solo extracto, el cual se fragmentó y con base a los rendimientos obtenidos tanto del extracto como de sus fracciones se puede decir que el extracto presenta una mayor cantidad de compuestos de origen polar, ya que la fracción **H** obtuvo un menor rendimiento en relación al extracto **MeOH 1** y la

fracción **MeOH 2** Cuadro 3, esto concuerda con Garduño quien en el 2009 reportó que obtuvo un menor rendimiento de la parte hexánica del extracto de *Argemone mexicana*, usando incluso diferentes métodos de extracción (percolación, maceración y calentamiento). Se le puede atribuir a la presencia de estos compuestos de naturaleza polar en su composición química, la actividad antimicrobiana que mostró el extracto (Toledo et al., 2008).

Un total de 24 cepas tratadas con el extracto **MeOH 1** así como a las que se les suministraron la fracción **MeOH 2** y la **H**, mostraron sensibilidad, durante los ensayos, a pesar de esto sí existieron diferencias significativas entre los tres ( $F= 7.63$ ,  $P=0.001$ ) como se ve en la Fig. 1, como resultado del ANOVA. De manera particular se pudo observar una actividad marcada sobre las siguientes bacterias: *Staphylococcus epidermidis*; se trata de un patógeno oportunista responsables de infecciones cutáneas especialmente en pacientes inmunocomprometidos o en estado crítico, en quienes se implantan biomateriales, como catéteres (Ruiz, 2010), *Staphylococcus aureus*; es un microorganismo de gran importancia médica debido a que posee un alto grado de patogenicidad y es responsable de una amplia gama de enfermedades, en años recientes las infecciones por *S. aureus* han reemergido debido a que la bacteria se ha vuelto resistente a los antibióticos con los que normalmente se le combate (Velázquez, 2005), y *Pseudomonas aeruginosa*; es causante de diferentes cuadros clínicos en los que se destacan, la infección del tracto respiratorio en forma de neumonía, se adapta a las vías respiratorias de los humanos y sigue siendo su localización más frecuente (Garau y Gomez, 2003). Con base a las CMI y CMB que mostraron *S. epidermidis* (CMI=0.5 mg/mL, CMB= 1mg/mL), *S. aureus* (CMI=1mg/mL, CMB=2mg/mL) y *P. aeruginosa* (CMI=0.25mg/mL, CMB=1mg/mL), Cuadro 5, se decidió realizar la curva de letalidad donde se probó que la planta presenta un efecto muy ligero sobre las cepas de bacterias, no hay antecedentes que avalen este resultado, debido a que en la mayoría la literatura consultada sólo se evalúan las propiedades cualitativas del extracto (Indranil et al., 2006, Granados et al., 2006 y Chang et al., 2003)



El hecho de que el extracto **MeOH 1** y la fracción **MeOH 2** mostraran actividad contra las cepas de bacterias antes mencionadas concuerda con los datos del uso etnobotánico que se le da a la planta en la comunidad, ya que Canales y colaboradores (2005 y 2006), mencionan que es usada en el tratamiento de infecciones oculares, de posible origen microbiano. Según Ochoa y Alonso (1996), la planta es empleada en el tratamiento de enfermedades respiratorias y Chopra (1986) menciona que es de gran utilidad para combatir enfermedades cutáneas. Además en trabajos recientes ya se ha reportado la actividad de el extracto sobre algunas de las cepas de bacterias, como *P. aureoginosa* y *S. aureus* las cuales mostraron ser sensibles a los extractos de hojas y semillas, usando como solvente metanol (Indranil et al., 2006).

El efecto antimicrobiano que posee el extracto **MeOH 1** sobre *S. epidermidis* se puede atribuir a la presencia de ácidos grasos, como el Ácido Linoleico (5.12%), ya que este desestabiliza la membrana celular de las bacterias Gram positivas haciéndolas más permeables causando así un estrés osmótico (Greenway y Dike, 1979). Pérez en el 2005 reportó que aisló y probó este ácido sobre diferentes cepas de bacterias Gram positivas, demostrando que este poseía actividad antimicrobiana sobre estas. En otros estudios se han observado efectos beneficios del Ácido Linoleico en lesiones cutáneas, úlceras y dermatitis atópica (Maicas, 2008). Por otra parte la acción antimicrobiana que posee la fracción **MeOH 2** sobre *S. aureus* y *P. aureoginosa* se puede asignar al contenido de alcaloides, que se muestra en la CGAEM, como la cafeína (11.38%), pues esta posee propiedades inhibitorias contra virus, bacterias y hongos además actúa como un pesticida natural que paraliza y mata ciertos insectos que se alimentan de las plantas (Thomson, 1978), en general los efectos inhibitorios del crecimiento de microorganismos patógenos por alcaloides, están dados por su capacidad de intercalarse con el DNA, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (Wink y Schimmer, 1999). Sin embargo la presencia de cafeína en la planta es un dato nuevo, ya que se han reportado solo alcaloides como la sanguinarina y dehidrosanguinarina (Ochoa y Alonso, 1996). Esto quizás esté ligado a la zona de colecta de donde se sustrajo la planta, debido a que las condiciones climáticas y del entorno puede

ser un factor determinante en la variación de la composición química (Sepulveda et al., 2003). Como ya se ha mencionado además cabe señalar que no existen antecedentes de estudios realizados de *Argemone mexicana*, en San Rafael, municipio de Coxcatlan, Puebla. Se determinó también la presencia de flavonas, las cuales se detectaron en el HPLC y son de importancia debido a que estos compuestos son sintetizados por las plantas en respuesta a infecciones microbianas, y su actividad sobre las bacterias probablemente se deba a su capacidad de generar complejos con proteínas extracelulares y proteínas solubles, sobre la pared celular. Los flavonoides lipofílicos pueden perturbar la integridad estructural de la membrana celular (Fuertes et al., 1997).

Por su parte la fracción **H** sólo mostro actividad sobre pocas cepas de bacterias siendo la de mayor relevancia *P. aureoginosa*, esto es concluyente ya que con base al análisis de ANOVA esta presentó la mediana más baja ( $M_e = 6.833$ ), quizás sea debido a su naturaleza no polar. Por otra parte no se lograron detectar compuestos en el CG-EM, sin embargo en el HPLC se detectó la presencia de fenoles, se sabe que los compuestos fenólicos que poseen una cadena lateral a nivel de C3 en un bajo nivel de oxidación y que no contienen oxígeno, son clasificados como aceites esenciales y a veces se citan como agentes antimicrobianos bacteriostáticos contra hongos y bacterias (Cowan, 1999).

En cuanto al grupo de los hongos levaduriformes, tanto el extracto **MeOH 1** como la fracción **MeOH 2** presentaron halos de Inhibición similares, esto es concluyente debido a que en el análisis de ANOVA no existieron diferencias significativas entre ambos ( $F=0.22$ ;  $P=0.064$ ), Fig. 9. Por lo contrario las cepas de levaduras que mostraron mayor sensibilidad fueron aquellas a las que se les aplico la fracción **MeOH 2** y estas son; *Candida albicans* aislada de urocultivo : este microorganismo es el agente causante de más del 80% de las infecciones clínicas por hongos. La patogenicidad de las especies de *Candida* derivan su importancia no sólo por la severidad de sus infecciones, sino también por su habilidad para desarrollar resistencia contra diferentes drogas antifúngicas (Garg, 2006) y *Candida tropicalis*: la cual representa del 10 al 15% de las

micosis superficiales que dependen de múltiples factores pero, principalmente, de las condiciones de virulencia y del sistema inmunitario del hospedero (Vitala, 2006). Ambas cepas presentaron una CMI relativamente baja (0.5 mg/mL), y una CFM de 2 mg/mL (Cuadro 7), tomando en cuenta estos resultados, se determinó el efecto del extracto sobre la curva de crecimiento de las cepas antes mencionadas demostrando así que la fracción **MeOH 2** posee un efecto muy poco evidente sobre el crecimiento de estos microorganismos. La actividad que esta fracción posee se puede atribuir a que probablemente los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana se encuentran en mayor concentración, resultado de la partición con Hexanos (Katzung y Trevor 1997), en relación al extracto **MeOH 1**, esto concuerda con lo reportado por Rivera en el 2012, ya que el extracto metanólico de *A. mexicana* que empleó como tratamiento no logró alcanzar las CFM, por lo que atribuye este comportamiento al despliegue de los mecanismos de resistencia del microorganismo. Así pues, no se puede hablar de un antimicótico si no de una medida de control contra el agente causal.

Por otro lado, en cuanto a los resultados obtenidos en los ensayos sobre hongos filamentosos, tenemos que tanto el extracto **MeOH 1** como sus fracciones **MeOH 2** y **H**, mostraron actividad sobre la mayoría de las cepas (cuadro 8), pero los tres no presentaron actividad al mismo tiempo sobre todas las cepas, cabe mencionar que esto sólo ocurrió en tres de los hongos: *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichoides* y *Tricophyton mentagrophytes* y que de estos en *Fusarium moniliforme*, donde se suministró el extracto **MeOH 1**, no se logró determinar la  $CF_{50}$ . ya que esta se encuentra en valores muy por arriba de la concentración más alta que se empleó (4mg/mL), lo mismo sucede con *Aspergillus niger* (la cual sólo mostraro sensibilidad ante el extracto **MeOH 1**) y *Aspergillus sp* (la cualn fue sensible a el extracto **MeOH 1** y la fracción **MeOH 2**). Con base a esto se llevó a cabo un análisis de ANOVA, entre las cepas de hongos que mostraron ser sensibles a más de un tratamiento y se determinó que no existieron diferencias significativas entre el extracto y cada una de las fracciones ( $F=0.86$ ,  $P=0.423$ ) (Fig. 23), por otro lado sí existieron diferencias significativas ( $F=64.50$ ,  $P=0.00$ ) (Fig. 25), en cuanto a la relación que hay en el aumento de la concentración y el porcentaje de inhibición, de

manera general fue *T. mentagrophytes* quien presentó los mejores resultados: **MeOH 1** ( $CF_{50}=1.41$  mg/mL), **MeOH 2** ( $CF_{50}=3.91$ ) y **H** ( $CF_{50}=4.53$ ), alcanzó el 82% de inhibición y presentó la mediana más alta dentro del análisis estadístico ( $M_e =80$ ) (Cuadro 13, 14 y Fig. 26), se ha reportado que el efecto sobre el crecimiento micelial posiblemente se deba a la presencia de ácidos grasos y terpenos presentes en los extractos, los cuales rompen la membrana celular por su interacción con los compuestos lipofílicos (Cowan, 1999). No se debe dejar de mencionar el hecho de que el extracto y sus fracciones tienen una concentración elevada en comparación con el control positivo, esto se debe a que el ketoconazol es un compuesto puro y que los extractos son una mezcla de compuestos, y tal vez los principios activos responsables de la actividad pueden estar en concentraciones muy pequeñas (Escobar y Zuluaga, 2004).

Con respecto a la actividad antioxidante de **MeOH 1** y **MeOH 2**, se determinó que el extracto **MeOH 1** es la que presentó mayor actividad antioxidante con una  $CA_{50} = 1.98$   $\mu$ g/mL en comparación con **MeOH 2** el cual tiene una  $CA_{50} = 19.36$   $\mu$ g/mL (Fig. 27, 28 y cuadro 15), esto puede deberse a la presencia de flavonoides, los cuales se detectaron en el HPLC del extracto (Cuadro 18. Fig. 33), ya que los flavonoides poseen actividades antioxidantes, existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resultado de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y sequestradoras de radicales libres. Por otra parte se ha podido determinar que inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos como la fosfolipasa  $A_2$ , al mismo tiempo que estimulan otras con reconocidas propiedades antioxidantes, como la catalasa (Perez, 2003)

Por último de manera general con base al análisis realizado por medio del CG-EM se lograron identificar 15 compuestos en **MeOH 1**, de los que se reconocieron 3 compuestos con algún reporte de actividad antimicrobiana los cuales fueron, Ácido  $\alpha$ -Linolénico (19.9%), Ácido Linoleico (6.87%) y Cis-Pinano (2.17%) (Fig. 29 y cuadro 16), en cuanto a la fracción **MeOH 2** sólo se identificaron 4 compuestos de los cuales solo la cafeína (11.38 %) ha sido reportada con actividad antimicrobiana, y de los compuestos presentes el más abundante fue el Ácido hexadecanoico (14.61%) (Fig. 30 y cuadro 16). Siendo

este último el único compuesto presente en ambos, aunque con variaciones muy pequeñas. Esto último concuerda con lo reportado por Garduño en el 2009, quien menciona que de los 10 compuestos que logró identificar entre su extracto metanólico y su fracción libre de compuestos no polares, sólo coincidieron en la presencia de ácido hexadecanoico. Se sabe que el compuesto mayoritario del extracto **MeOH 1** es decir el  $\alpha$ -ácido linolénico (19.92%) ha reportado afectos biológicos importantes, por el papel que desempeña al decrementar la inflamación, la cual es una característica de muchas enfermedades crónicas, así mismo ayuda a promover un funcionamiento adecuado de los vasos sanguíneos, lo cual reduce el riesgo de ataques al corazón y embolias (Morris, 2007, citado por Rivera, 2012). Es importante mencionar que la actividad biológica no siempre está ligada a los compuestos mayoritarios, por lo que no se descarta que la actividad biológica pueda deberse a uno de los compuestos minoritarios o por un efecto sinérgico entre ellos (Burt, 2004).

Se debe tener en cuenta que cada una de las partes de la planta parece contener una combinación de diferentes sustancias bioactivas, por lo que se requiere que los extractos se preparen a partir de las partes individuales sin mezclarlas. Hay reportes de que los extractos de *Argemone mexicana* poseen diversas sustancias con propiedades biológicas importantes. Se han reportado sustancias con actividad en contra de la proliferación de células derivadas de cáncer de mama y que sugieren posible utilidad de este extracto en el tratamiento de este tipo de cáncer (Lambertini et al., 2004) y alcaloides con propiedades anti- HIV (Chang et al., 2003).

## CONCLUSIONES

- Tanto el extracto **MeOH 1** como sus fracciones **MeOH 2** y **H**, mostraron actividad sobre el crecimiento bacteriano.
- La fracción **MeOH 2** presentó la mayor actividad y **H** menor actividad.
- La actividad que tuvo el extracto **MeOH 1** y sus fracciones sobre las curvas de crecimiento de bacterias y levaduras fue muy ligera.
- Tanto el extracto **MeOH 1** como sus fracciones **MeOH 2** y **H**, solo mostraron actividad sobre; *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichioides* y *Tricophyton mentagrophytes*, siendo este último el más sensible al extracto y sus fracciones.
- La fracción **MeOH 2** fue quien tuvo mayor actividad antioxidante.
- En el contenido químico de el extracto **MeOH 1** como su fracción **MeOH 2**, ambos sólo coinciden en la presencia de ácido hexadecanoico

## PERSPECTIVAS

- ❖ Realizar ensayos con diferentes partes de la planta, como las semillas y raíces.
- ❖ Llevar a cabo un estudio donde se comparen las variaciones temporales de la especie, *A. mexicana*.
- ❖ Realizar más pruebas para determinar el contenido químico de la fracción **H**.
- ❖ Determinar la toxicidad del extracto y sus fracciones in-vivo.

## APENDICES

### APÉNDICE 1

#### ***Argemone mexicana* (fig.)**

(Argeta y Cano 1994)

**Botánica y ecología.** Es una hierba anual con un líquido amarillo brillante. Tiene las hojas de color verde azulado con líneas azul-brillante y se ven desgarradas, con el borde dentado, terminando cada diente en una espina. Las flores son amarillentas, grandes y parecen como si fueran de papel. Tiene los frutos como unas cápsulas alargadas y espinosas, por la parte superior se abren y al madurar, se escapan las semillas, las cuales son muy pequeñas, negruzcas y rugosas.

Originaria de América boreal, México. Presente en climas semicálido, semiseco y templado desde el nivel del mar y los 2750 msnm. Crece en terrenos de cultivo abandonados, en zonas agrícolas o a orillas de caminos, asociada a bosques tropicales caducifolio y perennifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, de pino, mixto de pino-encino y de juníperos.



Fig.35. *Argemone mexicana*



### **Etnobotánica y antropología.**

El chicalote es una planta recomendada para curar problemas de los ojos, como dolor, escozor, manchas e inflamación (mal de los ojos); aunque principalmente se usa en las cataratas, aplicando directamente el látex fresco o fomentos del cocimiento de la corteza por 5 o 6 días. La leche (látex) fresca se aplica por las noches sobre el párpado o dentro del ojo para quitar el escozor, y mezclada con jugo de mezquite (sp, n/r.), se pone en gotas para remover las nubes de los ojos. Para aliviar la sordera, se muelen las bolitas (frutos), se colocan en un trapo o algodón, y se ponen en la oreja. En Michoacán se usa para la **tsandukus**, en purépecha se llama así a la enfermedad de los ojos, se manifiesta por una excesiva secreción (lagañas), originada por un cambio brusco de temperatura. En este caso, puede ser suficiente una sola aplicación. De la misma forma se aplica en ojos irritados, aunque se sugiere ponerla por la mañana.

Se emplea la raíz, a manera de cataplasma, para aliviar el dolor de pulmón, padecimiento originado por el exceso de trabajo (se reconoce porque la espalda duele y se siente caliente). Cuando se padece tos causada por el frío, no se puede respirar bien y duele el pecho, entonces se toma un té preparado con las flores.

Se emplea para hacer brotar el chincual, es decir, ronchas o erupciones localizadas en diversas partes del cuerpo de los niños. Para tal fin, se les baña con el cocimiento de la planta. Otros describen el chincual como una irritación (enrojecimiento) del ano en los niños. En este caso, se remuelen hojas y tallo en un balde con agua para darle baños de asiento. Contra la sarna, se puede usar la hierba fresca y la semilla seca, o el aceite de la semilla. Además, con el agua donde se hirvieron las raíces, suelen bañarse a los bebedores (alcohólicos) que tienen la piel irritada.

Para emplearlo como purgante, se hierven las semillas. También se reporta útil en el tratamiento de la bilis, dolor de muelas, cólicos de los niños (V. cólico del recién nacido), expulsión de placenta, flujo, heridas y llagas, dolor de riñón, diabetes, alferecía, infecciones en la piel, granos, manchas, salpullido, inflamación, paludismo, convulsiones, espasmos, infecciones y hemorragias, como purgante y cicatrizante.

## APÉNDICE 2

### ZONA DE COLECTA

La especie *Argemone mexicana* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m. (Figura 37).

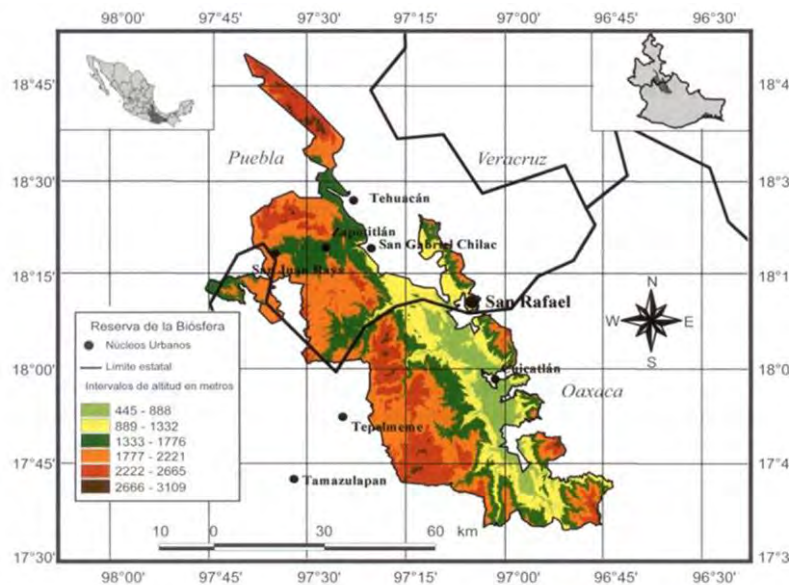


Fig. 36. Ubicación geográfica del poblado de San Rafael

### Clima

El clima es de tipo Bs (h') w" (w) de acuerdo con la clasificación de Koeppen, modificado por García (1981), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22 °C, variando entre 25 °C en abril y mayo, y 18 °C en enero (Valiente, 2000) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación casi duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

### Hidrografía

El sureste de Puebla se encuentra irrigado por el Río Salado. La parte sur del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es drenado por el Río Grande o Tomellín, que fluye al norte desde Oaxaca; uniéndose cerca de Quitepec los dos forman el Río de Santo Domingo, el cual corta la Sierra Madre de Oaxaca en dirección este y eventualmente se vuelve el Río Papaloapan. El Río Tehuacán encuentra su camino al oeste del Cerro Colorado, para entrar en el Valle de México cerca de San Diego, Chalma. Este pequeño río el cual se convierte en el Río Salado, se une por un número de cortas ramificaciones alcanzando la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste (Salcedo-Sánchez, 1997).

### **Edafología**

El origen del suelo data del periodo Cuaternario, era Cenozoica. Los suelos en las regiones están pobremente desarrollados y pueden ser divididos en dos grandes tipos: regosoles, predominantemente calcáreos y regosoles éutricos y xerosoles, predominantemente xerosoles háplicos.

### **Vegetación**

La vegetación predominante es un bosque tropical caducifolio, donde *Escontria chiotilla* (F. A. C. Weber) Rose y *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg son particularmente abundantes (Valiente-Banuet et al., 2000).

Fernández (1999), reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael: Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).

Chiotillal de *Escontria chiotilla*, en el nivel próximo al cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal de esta región, con una alta densidad arbustiva.

Cuajitotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* Ramírez, *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouquieria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fructicosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.

Fouquieria con especies dominantes como *Fouquieria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Senna wisliseni* (DC), *Mimosa luisiana* (Brandege) y *Sanvitalia fructicosa*. Localizada en el nivel más alto, de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal. La densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fructicosa*.

En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael (Rosas, 2003), se determinó un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias botánicas, de las cuales 368 especies fueron registradas con uno o más usos (18% son usadas como plantas medicinales). Las familias con un mayor número de especies fueron Asteraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae, que corresponden a las familias más representativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

### **La población.**

La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) (Secretaría de Salud, 2001). La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importante es la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

### APÉNDICE 3

#### **Maceración (Domínguez, 1973)**

Las flores, tallos y hojas de la planta se pusieron a secar en un lugar fresco y ventilado, una vez ya secas se les pesaron para introducirlas en un matraz Erlenmeyer, posteriormente se les agregó una cantidad de solvente necesaria, donde la planta esté cubierta y el líquido esté por encima unos 15 cm aproximadamente, el recipiente se cubrió para evitar la evaporación del solvente.

La planta se dejó reposar como mínimo 1 día teniendo en cuenta que la extracción de los compuestos se vio reflejado en la coloración del líquido, entre más oscuro esté mayor rendimiento tendrá la planta.

Por último se realizó una destilación a presión reducida en un rotavapor para obtener el extracto libre del solvente.

### APÉNDICE 4

#### **Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer. (Vanden Berghe, D. A. & Vlietink, A. J. 1991)**

**Medio.** Se utilizó como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton, debido a que promueve el desarrollo de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Es recomendable que el agar tenga un espesor uniforme en la placa de 4 mm, ya que si este es más fino, el antibiótico tiende a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; y por lo contrario 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 tocaron las superficies convexas de 4 ó 5 colonias de apariencia semejante. Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müller-Hinton, se enjuaga bien el líquido para descargar bien todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incubó el tubo a 37° C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente

al estándar No. 0.5 de McFarland, lo que equivale a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  bacterias/mL.

El estándar No. 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 la turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca, o por medio de espectrofotómetro a 600 nm.

Si la suspensión de los organismos se ve más turbia que el estándar, se agrega solución salina al 0.9 % hasta igualarlas. Posteriormente se sumerge un segundo hisopo estéril y seco en suspensión bacteriana antes de retirarlos se elimina el exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se siembra en estrías en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de por lo menos  $60^\circ$  luego de cada estría.

**Control positivo.** Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales en sensidiscos con un antibiótico sintético (cloranfenicol 25 $\mu$ g/disco).

**Incubación.** Ya que las cajas con agar están preparadas para las pruebas de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a  $35^\circ C$ , sin mayor tensión de  $CO_2$ . Esto es importante ya que el  $CO_2$  puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso en el pH. El desarrollo de microorganismos es inhibido por el pH ácido, lo cual puede provocar una estrechez en la inhibición. Así como la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciendo diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones en las zonas de inhibición.

**Interpretación de resultados.** Las zonas de inhibición se miden con una regla calibrada en mm. En todos los casos la prueba se realiza por triplicado y los valores promedio se reportan en mm.

## **APÉNDICE 5**

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

#### **Método de macrodilución en agar (Koneman 1996).**

##### **Preparación de reactivos y diluciones:**

Las disoluciones antimicrobianas de trabajo se prepararon diluyendo la droga en el agar de Mueller-Hinton según las concentraciones deseadas (0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/mL). El agar se esteriliza, se deja enfriar y en estado líquido se coloca la cantidad necesaria del extracto para obtener la concentración requerida. Después de mezclar bien el contenido se transfiere a una caja de Petri.

##### **Inoculación e incubación de los tubos:**

Se prepara un inóculo que contiene  $1.5 \times 10^8$  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 MacFarland). Incubar los tubos 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. Con un hisopo se puntean los microorganismos en todas las concentraciones a ensayar

##### **Interpretación de resultados:**

La menor concentración de antimicrobiano que produce una marcada inhibición 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 capaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

##### **Determinación de la concentración bactericida mínima**

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un organismo se realizó la prueba de actividad bactericida que emplea el mismo sistema de dilución en agar. En aquellas cajas en donde, los microorganismos, han sido destruidos por el agente microbiano. Debido a que incluso las drogas bactericidas no siempre matan 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 Mínima (CBM).

### **Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1996)**

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 preparó colocando 50 µL de caldo Müeller-Hinton con la concentración deseada del compuesto a probar.

Se preparó 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 Müeller-Hinton (Bioxon 260), 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  $1.5 \times 10^8$  bacterias/mL, de esta suspensión se tomaron 0.1 mL y se le adicionaron a 99.9 mL de solución salina al 0.9 % obteniéndose así una concentración de  $10^5$  bacterias/mL. Cada concavidad se inoculó con 50 µL 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 µL de una solución de cloruro de tetrazolio al 0.08 % a cada concavidad, se incuba por 30 minutos a 37 °C. En las concavidades donde se desarrolla el organismo, el colorante es reducido a formazán de color rojo, produciéndose un botón rojo en el fondo del microtubo. Donde no hay desarrollo bacteriano la solución permanece clara.

## **APÉNDICE 6**

### **Actividad del extracto sobre la curva del crecimiento bacteriano (Muroi, 1993)**

Se preparó un tubo para el extracto y cada una de las fracciones, para el muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora durante los cuatro primeros tiempos, después durante dos horas (dos tiempos), a las 12 horas y finalmente a las 24 horas.

Se preparó y rotulo un tubo sin antídoto que sirve como control del desarrollo



Se preparó el inóculo con aproximadamente  $1 \times 10^5$  bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müeller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación).

Se inoculó con ayuda de una micropipeta 100  $\mu$ L de la suspensión de bacterias en los tubos que contendrán los extractos, con la concentración de CMI y sus múltiplos medios; esto es, la mitad del CMI y CBM. La concentración final es de aproximadamente de  $1 \times 10^5$  bacterias/ ml de caldo en cada tubo. Se incubo en una estufa sin presión de  $\text{CO}_2$ .

Se grafico el logaritmo del número de sobrevivientes en el eje de las “Y” contra el tiempo de incubación del eje de las “X”, para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la muerte de la bacteria, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas ( Davis y Dulbecco, 1996).

## **APÉNDICE 7**

### **Método de cultivo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002).**

El ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo en cajas Petri (100 x 15mm) que contenian 20 mL de agar de papa dextrosa (PDA), en el cual se inoculó el micelio del hongo. Después que el micelio se desarrollo, se colocaron 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). Los discos se colocaron a una distancia de 30 mm del límite micelial.

**Incubación.** Las placas fuerón inoculadas a 23 °C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se desarrollo.

**Controles negativos.** Discos a los que se les agregó 10  $\mu$ L del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que las experimentales).

**Controles positivos.** Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 7  $\mu$ g/disco de Ketoconazol.

**Interpretación de resultados.** En el caso de existir zonas de inhibición se reportó el extracto como activo, en todos los casos esta prueba se hizo por triplicado.

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

El ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo en cajas de Petri (60 x 15), que contenían 6 mL de PDA, con las siguientes concentraciones del extracto 2.00, 1.50, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL. Posteriormente se colocó una pequeña cantidad de micelio en el centro de la caja.

**Incubación.** Las placas se incubaron a 23 °C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se desarrolló.

**Controles positivos.** Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales incluyendo en el agar las siguientes Concentraciones de Ketoconazol: 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.70, 3.50, 7.00, 14.00, 28.00 µg/mL.

**Interpretación de resultados.** Los resultados se reportaron en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento, la cual corresponde a la Concentración Fungicida Mínima (CFM); mientras que la concentración que representa el 50% de inhibición corresponde a la  $CF_{50}$  y esta se interpola en la gráfica.

## **APÉNDICE 8**

### **Actividad Antioxidante**

**(Murillo, 2006).**

La actividad antioxidante se evaluó midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-30 ppm), por medio de espectrometría UV-VIS. En una placa de ELISA se adicionaron 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (2-30 ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionaron 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 100 g/mL; inmediatamente se protegieron de la luz y se mantuvieron en agitación

constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA SLT Spetra; para el blanco se aplicaron 200 µL de metanol en los pozos y como control positivo se usó quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

### **Interpretación de Resultados**

Los resultados serán reportados obteniendo el porcentaje de reducción que se calculara con la siguiente fórmula:

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

En donde:

C= Absorbancia del control (solución de DPPH en metanol)

E= Absorbancia de la muestra

(Mezcla DPPH + compuesto problema)

## APÉNDICE 9

### Análisis estadístico en minitab v.16

## BACTERIAS.

### Descriptive Statistics: HALO

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
HALO	Crudo	42	0	8.857	1.970	5.000	8.000	8.000
	hexánico	12	0	6.833	1.467	5.000	6.000	6.500
	metanólico libre	33	0	7.242	1.347	5.000	6.000	7.000

Variable	EXTRACTO	Q3	Maximum
HALO	Crudo	10.000	13.000
	hexánico	8.500	9.000
	metanólico libre	8.000	10.000

### Descriptive Statistics: HALO

Variable	CEPA	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
HALO	Basillus subtili	6	0	7.833	0.983	7.000	7.000	7.500
	Enterobacter aer	9	0	7.000	1.323	5.000	6.000	7.000
	Enterococcus fae	6	0	8.667	1.966	7.000	7.000	8.000
	Escherichia coli	3	0	9.333	0.577	9.000	9.000	9.000
	Escherichia coli	3	0	9.000	1.000	8.000	8.000	9.000
	Klebsiella pneum	3	0	5.667	0.577	5.000	5.000	6.000
	ml. Raul	3	0	8.0000	0.000	8.0000	8.0000	8.0000
	Proteus miriabil	3	0	6.333	0.577	6.000	6.000	6.000
	Pseudomonas aeru	9	0	7.667	1.118	6.000	6.500	8.000
	Staphylococcus a	1	0	8.0000	*	8.0000	*	8.0000
	Staphylococcus a	5	0	6.600	0.894	5.000	6.000	7.000
	Staphylococcus a	6	0	8.333	1.366	6.000	7.500	8.500
	Staphylococcus e	3	0	11.667	1.528	10.000	10.000	12.000
	Streptococcus pn	3	0	8.00	2.65	5.00	5.00	9.00
	Vibrio cholera C	6	0	10.167	1.941	7.000	8.500	10.500
	Vibrio cholera I	9	0	7.222	2.539	5.000	5.500	6.000
	Vibrio cholerae	3	0	7.333	1.155	6.000	6.000	8.000
	Ye. Ha	3	0	9.333	1.528	8.000	8.000	9.000
	Yersina enteroco	3	0	7.00	1.73	5.00	5.00	8.00

Variable	CEPA	Q3	Maximum
HALO	Basillus subtili	9.000	9.000
	Enterobacter aer	8.000	9.000
	Enterococcus fae	10.500	12.000
	Escherichia coli	10.000	10.000
	Escherichia coli	10.000	10.000
	Klebsiella pneum	6.000	6.000
	ml. Raul	8.0000	8.0000
	Proteus miriabil	7.000	7.000
	Pseudomonas aeru	8.500	9.000
	Staphylococcus a	*	8.0000
	Staphylococcus a	7.000	7.000
	Staphylococcus a	9.250	10.000
	Staphylococcus e	13.000	13.000
	Streptococcus pn	10.00	10.00
	Vibrio cholera C	12.000	12.000
	Vibrio cholera I	9.000	12.000
	Vibrio cholerae	8.000	8.000
	Ye. Ha	11.000	11.000
	Yersina enteroco	8.00	8.00

## Descriptive Statistics: HALO

### Results for CEPA = Basillus subtilis

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
HALO	Crudo	3	0	7.0000	0.000000000	7.0000	7.0000	7.0000
	metanólico libre	3	0	8.667	0.577	8.000	8.000	9.000

Variable	EXTRACTO	Q3	Maximum
HALO	Crudo	7.0000	7.0000
	metanólico libre	9.000	9.000

### Results for CEPA = Enterobacter aerogenes

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
HALO	Crudo	3	0	8.0000	0.000000000	8.0000	8.0000	8.0000
	hexánico	3	0	6.67	2.08	5.00	5.00	6.00
	metanólico libre	3	0	6.333	0.577	6.000	6.000	6.000

Variable	EXTRACTO	Q3	Maximum
HALO	Crudo	8.0000	8.0000
	hexánico	9.00	9.00
	metanólico libre	7.000	7.000

### Results for CEPA = Enterococcus faecalis

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	Crudo	3	0	10.00	2.00	8.00	8.00	10.00	12.00
	metanólico libre	3	0	7.333	0.577	7.000	7.000	7.000	8.000

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	Crudo	12.00
	metanólico libre	8.000

### Results for CEPA = Escherichia coli ATCC 27155

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	Crudo	3	0	9.333	0.577	9.000	9.000	9.000	10.000

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	Crudo	10.000

### Results for CEPA = Escherichia coli ATCC 53228

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	metanólico libre	3	0	9.000	1.000	8.000	8.000	9.000	10.000

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	metanólico libre	10.000

### Results for CEPA = Klebsiella pneumoniae

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	metanólico libre	3	0	5.667	0.577	5.000	5.000	6.000	6.000

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	metanólico libre	6.000

### Results for CEPA = Proteus mirabilis

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
Maximum									
HALO	hexánico	3	0	6.333	0.577	6.000	6.000	6.000	7.000
									7.000

### Results for CEPA = Pseudomonas aeruginosa

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
HALO	Crudo	3	0	8.0000	0.000000000	8.0000	8.0000	8.0000	8.0000	.0000
	hexánico	3	0	8.333	1.155	7.000	7.000	7.000	9.000	
	metanólico libre	3	0	6.667	1.155	6.000	6.000	6.000	6.000	
Variable	EXTRACTO			Q3	Maximum					
HALO	Crudo			8.0000	8.0000					
	hexánico			9.000	9.000					
	metanólico libre			8.000	8.000					

### Results for CEPA = Staphylococcus aureus ATCC 12398

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
HALO	Crudo	1	0	8.0000	*	8.0000	*	8.0000	*	8.0000

### Results for CEPA = Staphylococcus aureus ATCC 12398

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
HALO	Crudo	2	0	7.0000	0.000000000	7.0000	*	7.0000		
	metanólico libre	3	0	6.333	1.155	5.000	5.000	7.000		
Variable	EXTRACTO			Q3	Maximum					
HALO	Crudo			*	7.0000					
	metanólico libre			7.000	7.000					

### Results for CEPA = Staphylococcus aureus ATCC 29213

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
HALO	Crudo	3	0	9.333	0.577	9.000	9.000	9.000	10.000	
	metanólico libre	3	0	7.333	1.155	6.000	6.000	8.000	8.000	
Variable	EXTRACTO			Maximum						
HALO	Crudo			10.000						
	metanólico libre			8.000						

### Results for CEPA = Staphylococcus epidermidis Fes- C

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
HALO	Crudo	3	0	11.667	1.528	10.000	10.000	12.000	13.000	
Variable	EXTRACTO			Maximum						
HALO	Crudo			13.000						

### Results for CEPA = Streptococcus pneumoniae

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
HALO	Crudo	3	0	8.00	2.65	5.00	5.00	9.00	10.00	10.00

### Results for CEPA = Vibrio cholera CDC V 12

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
HALO	Crudo	3	0	11.667	0.577	11.000	11.000	12.000
	metanólico libre	3	0	8.667	1.528	7.000	7.000	9.000

Variable	EXTRACTO	Q3	Maximum
HALO	Crudo	12.000	12.000
	metanólico libre	10.000	10.000

### Results for CEPA = Vibrio cholera INDRE 206

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	Crudo	3	0	9.33	3.79	5.00	5.00	11.00	12.00
	hexánico	3	0	6.000	1.000	5.000	5.000	6.000	7.000
	metanólico libre	3	0	6.333	0.577	6.000	6.000	6.000	7.000

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	Crudo	12.00
	hexánico	7.000
	metanólico libre	7.000

### Results for CEPA = Vibrio cholerae CC

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	metanólico libre	3	0	7.333	1.155	6.000	6.000	8.000	8.000

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	metanólico libre	8.000

### Results for CEPA = Ye. Ha

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	Crudo	3	0	9.333	1.528	8.000	8.000	9.000	11.000

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	Crudo	11.000

### Results for CEPA = Yersina enterocolitica CUSI

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3	Maximum
HALO	Crudo	3	0	7.00	1.73	5.00	5.00	8.00	8.00	8.00

Analysis of Variance for HALO, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
EXTRACTO	2	66.026	31.394	15.697	7.63	0.001
CEPA	18	105.175	105.175	5.843	2.84	0.001
Error	66	135.695	135.695	2.056		
Total	86	306.897				

## LEVADURAS.

### Descriptive Statistics: HALO

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
HALO	crudo	24	0	11.033	2.962	6.000	8.575	10.500
	metanólico libre	21	0	11.524	3.816	5.000	9.000	11.000

Variable	EXTRACTO	Q3	Maximum
HALO	crudo	13.875	15.000
	metanólico libre	13.000	20.000

### Descriptive Statistics: HALO

Variable	CEPA	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
HALO	Candida galabra	2	0	16.00	4.24	13.00	*	16.00
	Candida albicans	6	0	7.583	1.021	6.000	6.750	7.750
	Candida albicans	6	0	13.583	1.497	11.000	12.500	13.750
	Candida albicans	6	0	12.000	1.789	9.000	10.500	12.500
	Candida albicans	6	0	8.383	1.950	5.000	7.250	8.650
	Candida albicans	6	0	9.583	1.744	8.000	8.750	9.000
	Candida galabrat	4	0	16.50	3.11	13.00	13.50	16.50
	Candida tropical	6	0	12.167	2.317	9.000	9.750	12.500
	Criptococcus neo	3	0	9.667	1.528	8.000	8.000	10.000

Variable	CEPA	Q3	Maximum
HALO	Candida galabra	*	19.00
	Candida albicans	8.250	9.000
	Candida albicans	15.000	15.000
	Candida albicans	13.250	14.000
	Candida albicans	9.500	11.000
	Candida albicans	10.375	13.000
	Candida galabrat	19.50	20.00
	Candida tropical	14.250	15.000
	Criptococcus neo	11.000	11.000

### Descriptive Statistics: HALO

#### Results for CEPA = Candida galabrata

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	crudo	1	0	13.000	*	13.000	*	13.000	*
	metanólico libre	1	0	19.000	*	19.000	*	19.000	*

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	crudo	13.000
	metanólico libre	19.000

#### Results for CEPA = Candida albicans

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	crudo	3	0	6.833	0.764	6.000	6.000	7.000	7.500
	metanólico libre	3	0	8.333	0.577	8.000	8.000	8.000	9.000

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	crudo	7.500
	metanólico libre	9.000



### Results for CEPA = Candida albicans 10231

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
HALO	crudo	3	0	14.500	0.866	13.500	13.500	15.000
	metanólico libre	3	0	12.667	1.528	11.000	11.000	13.000

Variable	EXTRACTO	Q3	Maximum
HALO	crudo	15.000	15.000
	metanólico libre	14.000	14.000

### Results for CEPA = Candida albicans 14065

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
HALO	crudo	3	0	12.000	2.65	9.000	9.000	13.000
	metanólico libre	3	0	12.000	1.000	11.000	11.000	12.000

Variable	EXTRACTO	Q3	Maximum
HALO	crudo	14.000	14.000
	metanólico libre	13.000	13.000

### Results for CEPA = Candida albicans CUSI

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	crudo	3	0	8.767	0.252	8.500	8.500	8.800	9.000
	metanólico libre	3	0	8.000	3.000	5.000	5.000	8.000	11.000

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	crudo	9.000
	metanólico libre	11.000

### Results for CEPA = Candida albicans UROCULTIVO

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	crudo	3	0	8.833	0.764	8.000	8.000	9.000	9.500
	metanólico libre	3	0	10.33	2.31	9.000	9.000	9.000	13.000

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	crudo	9.500
	metanólico libre	13.000

### Results for CEPA = Candida galabrata

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	crudo	2	0	14.000	1.41	13.000	*	14.000	*
	metanólico libre	2	0	19.000	1.41	18.000	*	19.000	*

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	crudo	15.000
	metanólico libre	20.000

### Results for CEPA = Candida tropicalis

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
HALO	crudo	3	0	14.000	1.000	13.000	13.000	14.000
	metanólico libre	3	0	10.333	1.528	9.000	9.000	10.000

Variable	EXTRACTO	Q3	Maximum
HALO	crudo	15.000	15.000
	metanólico libre	12.000	12.000

## Results for CEPA = *Cryptococcus neoformans*

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
HALO	crudo	3	0	9.667	1.528	8.000	8.000	10.000	11.000

Variable	EXTRACTO	Maximum
HALO	crudo	11.000

## General Linear Model: HALO versus EXTRACTO, CEPA

Factor	Type	Levels	Values
EXTRACTO	fixed	2	crudo, metanólico libre
CEPA	fixed	9	Candida galabrata, Candida albicans, Candida albicans 10231, Candida albicans 14065, Candida albicans CUSI, Candida albicans UROCULTIVO, Candida galabrata, Candida tropicalis, <i>Cryptococcus neoformans</i>

Analysis of Variance for HALO, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
EXTRACTO	1	2.694	0.915	0.915	0.22	0.640
CEPA	8	348.833	348.833	43.604	10.58	0.000
Error	35	144.218	144.218	4.121		
Total	44	495.746				

S = 2.02991 R-Sq = 70.91% R-Sq(adj) = 63.43%

## HONGOS FILAMENTOSOS

### Descriptive Statistics: % DE INHIBICIÓN

Variable	EXTRACTO	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
% DE INHIBICIÓN	Crudo	72	0	24.42	23.02	0.00	0.00	23.30	38.33
	Hexánico	54	0	28.75	26.20	0.00	0.00	29.95	53.30
	Metanólico	72	0	27.02	22.56	0.00	0.00	33.30	40.00

Variable	EXTRACTO	Maximum
% DE INHIBICIÓN	Crudo	86.60
	Hexánico	80.00
	Metanólico	100.00

### Descriptive Statistics: % DE INHIBICIÓN

Variable	CEPA	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1
% DE INHIBICIÓN	Aspergillus sp	36	0	20.17	17.05	0.00	0.00
	Fusarium moniliforme	54	0	23.94	21.76	0.00	0.00
	Fusarium sporotrichoides	54	0	21.96	27.87	0.00	0.00
	Trichofitum mentagrophit	54	0	37.99	21.42	0.00	24.95

Variable	CEPA	Median	Q3	Maximum
% DE INHIBICIÓN	Aspergillus sp	26.60	38.33	40.00
	Fusarium moniliforme	29.95	40.00	60.00
	Fusarium sporotrichoides	0.00	46.60	80.00
	Trichofitum mentagrophit	33.30	53.30	100.00

## Descriptive Statistics: % DE INHIBICIÓN

Variable	CONCENTRACIÓN	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
% DE INHIBICIÓN	0.25	33	0	6.25	10.25	0.00	0.00	0.00
	0.50	33	0	9.08	12.99	0.00	0.00	0.00
	1.00	33	0	16.75	17.71	0.00	0.00	13.30
	2.00	33	0	30.88	17.13	0.00	23.30	33.30
	3.00	33	0	42.19	17.52	0.00	33.30	46.60
	4.00	33	0	54.11	19.50	20.00	40.00	53.30

Variable	CONCENTRACIÓN	Q3	Maximum
% DE INHIBICIÓN	0.25	13.30	33.30
	0.50	20.00	40.00
	1.00	33.30	66.60
	2.00	43.30	53.30
	3.00	53.30	66.60
	4.00	73.30	100.00

## Descriptive Statistics: % DE INHIBICIÓN

### Results for EXTRACTO = Crudo, CEPA = Aspergillus sp

Variable	CONCENTRACIÓN	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1
% DE INHIBICIÓN	0.25	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	2.00	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	3.00	3	0	28.83	3.87	26.60	26.60
	4.00	3	0	24.40	3.81	20.00	20.00

Variable	CONCENTRACIÓN	Median	Q3	Maximum
% DE INHIBICIÓN	0.25	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	0.000000	0.000000	0.000000
	2.00	0.000000	0.000000	0.000000
	3.00	26.60	33.30	33.30
	4.00	26.60	26.60	26.60

### Results for EXTRACTO = Crudo, CEPA = Fusarium moniliforme

Variable	CONCENTRACIÓN	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1
% DE INHIBICIÓN	0.25	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	3	0	13.300	0.000000	13.300	13.300
	2.00	3	0	22.20	3.81	20.00	20.00
	3.00	3	0	33.300	0.000000	33.300	33.300
	4.00	3	0	42.20	3.81	40.00	40.00

Variable	CONCENTRACIÓN	Median	Q3	Maximum
% DE INHIBICIÓN	0.25	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	13.300	13.300	13.300
	2.00	20.00	26.60	26.60
	3.00	33.300	33.300	33.300
	4.00	40.00	46.60	46.60

### Results for EXTRACTO = Crudo, CEPA = Fusarium sporotrichoides

Variable	CONCENTRACIÓN	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1
% DE INHIBICIÓN	0.25	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	3	0	15.53	3.87	13.30	13.30
	2.00	3	0	28.83	3.87	26.60	26.60

	3.00	3	0	46.600	0.000000	46.600	46.600
	4.00	3	0	51.07	3.87	46.60	46.60
Variable	CONCENTRACIÓN			Median	Q3	Maximum	
% DE INHIBICIÓN	0.25			0.000000	0.000000	0.000000	
	0.50			0.000000	0.000000	0.000000	
	1.00			13.30	20.00	20.00	
	2.00			26.60	33.30	33.30	
	3.00			46.600	46.600	46.600	
	4.00			53.30	53.30	53.30	

### Results for EXTRACTO = Crudo, CEPA = Trichofitum mentagrophitum

Variable	CONCENTRACIÓN	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1
% DE INHIBICIÓN	0.25	3	0	24.43	7.68	20.00	20.00
	0.50	3	0	26.63	6.65	20.00	20.00
	1.00	3	0	31.07	3.87	26.60	26.60
	2.00	3	0	48.83	3.87	46.60	46.60
	3.00	3	0	66.600	0.000000	66.600	66.600
	4.00	3	0	82.20	3.81	80.00	80.00

Variable	CONCENTRACIÓN	Median	Q3	Maximum
% DE INHIBICIÓN	0.25	20.00	33.30	33.30
	0.50	26.60	33.30	33.30
	1.00	33.30	33.30	33.30
	2.00	46.60	53.30	53.30
	3.00	66.600	66.600	66.600
	4.00	80.00	86.60	86.60

### Results for EXTRACTO = Hexánico, CEPA = Fusarium moniliforme

Variable	CONCENTRACIÓN	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1
% DE INHIBICIÓN	0.25	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	2.00	3	0	42.20	10.18	33.30	33.30
	3.00	3	0	51.10	10.18	40.00	40.00
	4.00	3	0	53.30	6.70	46.60	46.60

Variable	CONCENTRACIÓN	Median	Q3	Maximum
% DE INHIBICIÓN	0.25	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	0.000000	0.000000	0.000000
	2.00	40.00	53.30	53.30
	3.00	53.30	60.00	60.00
	4.00	53.30	60.00	60.00

### Results for EXTRACTO = Hexánico, CEPA = Fusarium sporotrichoides

Variable	CONCENTRACIÓN	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1
% DE INHIBICIÓN	0.25	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	2.00	3	0	48.83	3.87	46.60	46.60
	3.00	3	0	57.77	3.87	53.30	53.30
	4.00	3	0	73.30	6.70	66.60	66.60

Variable	CONCENTRACIÓN	Median	Q3	Maximum
% DE INHIBICIÓN	0.25	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	0.000000	0.000000	0.000000
	2.00	46.60	53.30	53.30
	3.00	60.00	60.00	60.00
	4.00	73.30	80.00	80.00

### Results for EXTRACTO = Hexánico, CEPA = Trichofitum mentagrophitum

Variable	CONCENTRACIÓN	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
% DE INHIBICIÓN	0.25	3	0	17.73	15.36	0.00	0.00	26.60
	0.50	3	0	17.77	3.87	13.30	13.30	20.00
	1.00	3	0	22.2	38.5	0.0	0.0	0.0
	2.00	3	0	33.30	6.70	26.60	26.60	33.30
	3.00	3	0	48.87	7.68	40.00	40.00	53.30
	4.00	3	0	51.07	3.87	46.60	46.60	53.30

Variable	CONCENTRACIÓN	Q3	Maximum
% DE INHIBICIÓN	0.25	26.60	26.60
	0.50	20.00	20.00
	1.00	66.6	66.6
	2.00	40.00	40.00
	3.00	53.30	53.30
	4.00	53.30	53.30

### Results for EXTRACTO = Metanólico, CEPA = Aspergillus sp

Variable	CONCENTRACIÓN	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1
% DE INHIBICIÓN	0.25	3	0	6.6000	0.000000	6.6000	6.6000
	0.50	3	0	31.10	10.18	20.00	20.00
	1.00	3	0	35.53	3.87	33.30	33.30
	2.00	3	0	37.77	3.87	33.30	33.30
	3.00	3	0	37.77	3.87	33.30	33.30
	4.00	3	0	40.000	0.000000	40.000	40.000

Variable	CONCENTRACIÓN	Median	Q3	Maximum
% DE INHIBICIÓN	0.25	6.6000	6.6000	6.6000
	0.50	33.30	40.00	40.00
	1.00	33.30	40.00	40.00
	2.00	40.00	40.00	40.00
	3.00	40.00	40.00	40.00
	4.00	40.000	40.000	40.000

### Results for EXTRACTO = Metanólico, CEPA = Fusarium moniliforme

Variable	CONCENTRACIÓN	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1
% DE INHIBICIÓN	0.25	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	3	0	37.77	3.87	33.30	33.30
	2.00	3	0	42.20	3.81	40.00	40.00
	3.00	3	0	42.20	3.81	40.00	40.00
	4.00	3	0	51.10	10.18	40.00	40.00

Variable	CONCENTRACIÓN	Median	Q3	Maximum
% DE INHIBICIÓN	0.25	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	40.00	40.00	40.00
	2.00	40.00	46.60	46.60
	3.00	40.00	46.60	46.60
	4.00	53.30	60.00	60.00

### Results for EXTRACTO = Metanólico, CEPA = Fusarium sporotrichoides

Variable	CONCENTRACIÓN	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1
% DE INHIBICIÓN	0.25	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
	2.00	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000

3.00	3	0	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
4.00	3	0	73.300	0.000000	73.300	73.300

Variable	CONCENTRACIÓN	Median	Q3	Maximum
% DE INHIBICIÓN	0.25	0.000000	0.000000	0.000000
	0.50	0.000000	0.000000	0.000000
	1.00	0.000000	0.000000	0.000000
	2.00	0.000000	0.000000	0.000000
	3.00	0.000000	0.000000	0.000000
	4.00	73.300	73.300	73.300

Results for EXTRACTO = Metanólico, CEPA = Trichofitum mentagrophitum

Variable	CONCENTRACIÓN	N	N*	Mean	StDev	Minimum	Q1
% DE INHIBICIÓN	0.25	3	0	20.000	0.000000	20.000	20.000
	0.50	3	0	24.40	3.81	20.00	20.00
	1.00	3	0	28.83	3.87	26.60	26.60
	2.00	3	0	35.53	3.87	33.30	33.30
	3.00	3	0	51.07	3.87	46.60	46.60
	4.00	3	0	53.3	40.6	26.6	26.6

Variable	CONCENTRACIÓN	Median	Q3	Maximum
% DE INHIBICIÓN	0.25	20.000	20.000	20.000
	0.50	26.60	26.60	26.60
	1.00	26.60	33.30	33.30
	2.00	33.30	40.00	40.00
	3.00	53.30	53.30	53.30
	4.00	33.3	100.0	100.0

### General Linear Model: % DE INHIBIC versus EXTRACTO, CEPA, CONCENTRACIO

Factor	Type	Levels	Values
EXTRACTO	fixed	3	Crudo, Hexánico, Metanólico
CEPA	fixed	4	Aspergillus sp, Fusarium moniliforme, Fusarium sporotrichoides, Trichofitum mentagrophitum
CONCENTRACIÓN	fixed	6	0.25, 0.50, 1.00, 2.00, 3.00, 4.00

Analysis of Variance for % DE INHIBICIÓN, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
EXTRACTO	2	603.6	293.5	146.7	0.86	0.423
CEPA	3	9732.5	9732.5	3244.2	19.10	0.000
CONCENTRACIÓN	5	60598.2	54766.9	10953.4	64.50	0.000
EXTRACTO*CONCENTRACIÓN	10	5571.8	4610.9	461.1	2.72	0.004
CEPA*CONCENTRACIÓN	15	6762.9	6762.9	450.9	2.65	0.001
Error	162	27510.1	27510.1	169.8		
Total	197	110779.0				

S = 13.0313 R-Sq = 75.17% R-Sq(adj) = 69.80%

## REFERENCIAS

1. Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez, P. y López, M. E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS. México. 218 pp
2. Argueta, V. A., Cano, A.J. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana Instituto Nacional Indigenista. Mexico, 1193 pp.
3. Avila, C.G. 2009 Propiedades químicas de algunas plantas utilizadas en México para el tratamiento del asma. *An Orl Mexico* 54:145-71
4. Báez, R.I. 2010. Evaluación de plantas medicinales con potencial en el control biológico del vector transmisor del dengue *Aedes aegypti*. Tesis maestría. IPN: centro de investigación en biotecnología aplicada. 96 p.
5. Bobbarala, V., Bramhachari, P.V., Ravichand, J., Reddy, Y.H., Kotresha, D., Chaitanya, K.V. 2011. Evaluation of hydroxyl radical scavenging activity and HPTLC fingerprint profiling of *Aegle marmelois* (L.) Correa extracts. *Journal Pharma Res* 4 (1), 252-255.
6. Burkhart, C. G., Burkhart, C. N. y Lehmann, P. F. 1999. Acne: a review of immunologic and microbiologic factors. *Journal of Postgraduate Medicine* 75, 328-331.
7. Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.
8. Canales, M., Hernandez, T., Caballero, J., Romo del Vivar, A., Ávila, G., Duran, A. y Lira, R. 2005. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 426-439.
9. Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Duran, A., Lira, R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana* 75, 21-43.
10. Carsi, E. T. 2002: *Herbolaria Mexicana*. México, 297 pp.

11. Chang, Y. C., Hsieh, P. W., Chang, F. R., Wu, R. R., Liao, C. C., Lee, K. H. y Wu Y. C. 2003. Two new protopines *Argemone mexicana* A and B and the anti-HIV alkaloid 6-acetyldihydrochelerythrine from *Forsam Argemone mexicana*. *Plant Medicinal* 69, 148-152.
12. Chopra, R.N., Nayar, S.L. 1986. Glossary of Indian Medicinal Plants (Including the Supplement), Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi. USA, 98pp.
13. Cowan, M. 1999. Plant Products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiological Reviews* 12, 564 – 582
14. Davis, B. D., Dulbecco, R. 1996. Tratado de microbiología. Ed. Salvat. España. 285 pp.
15. Domínguez, X. A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. México. 3-17 pp.
16. Embid, A. 2007. Resistencia de las bacterias a los antibióticos. *Revista de medicinas complementarias, medicina holística*. España 53, 101-112.
17. Escobar, C. y Zuluaga, A. 2004. Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología. *Medicina Cutánea Ibero-Latina-Americana*. 32: 231-240.
18. Fernández, D.G. 2002. Sumario de la Natural Historia de las Indias .Etno-farmacología en Iberoamérica. 41, 61-95.
19. Fernandez, V.J. 2005. Estudio químico biodirigido de la actividad antiasmática de *Argemone platyceras*. Tesis doctorado. UAM. 70 pp.
20. Flores, J., Canto, G., Flores, A., 2001. Plantas de la flora Yucateca que provocan alguna toxicidad en el humano. *Revista de Biomedicina* 12, 86-96.
21. Fuertes, C., Roque, M., Tristan, M. 1997. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* con actividad antibacteriana y antifúngica. Instituto de Microbiología. España. 43 pp.



22. Garau, J., Gomez, L. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Curr Opin Infect Dis. 16, 135-143
23. García, M. E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. 3ª ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México, 252 pp.
24. Garduño, P. C. 2009. Evaluación de polvos y extractos vegetales sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum f. sp. gladioli* (Massey) Snyder y Hansen e identificación de compuestos volátiles. Tesis maestría. IPN. México. 153 pp.
25. Garg, S., Naidu, j., Singh, S.M., Nawange, S.R., Jharia, N., Saxena, M. 2006. In vitro activity of terbinafine against Indian Clinical isolates of *C. albicans* and non-*albicans* using a microdilution method. Journal de Mycologie Médicale. 16, 119–125
26. González, E.M., López, E.L., González, E.S., Tena, F.J. 2005. Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas. Tesis maestría. IPN. México. 144 pp.
27. Granados, S. D., Ruiz, P. P., Barrera, E. H., 2008. Ecología de la herviboria. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente 14 (001), 51-64 .
28. Greenway, D. L. A., Dyke, K. G. H. 1979. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. Journal of General Microbiology. 115, 233-245.
29. Harvey, A. 2000. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Drug Discovery Today 5 (7), 294-300.
30. Indranil, B., Soroj, K. C., Soumendranath, C., Goutam, C., 2006. Antibacterial potentiality of *Argemone mexicana* solvent extracts against some pathogenic bacteria. Rio de Janeiro. Mem Inst Oswaldo Cruz. 101 (6), 645-648.

31. Iwu MW, Duncan AR, Okunji CO (1999). New antimicrobials of plant origin. In: Janick J (editor), Perspectives on new crops and new uses. ASHS Press. Alexandria, 457-462.
32. Katzung, G. B., Trevor, J. A. 1997. Farmacología: auto evaluación y repaso. 2° edición. Editorial. El manual moderno. México. México. 851 pp.
33. Koneman, W. E. 1996, Diagnóstico Microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. 439 pp.
34. Kuklinski, C. 2000 Farmacognosia; Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Ed Omega. España. 515 pp.
35. Lambertini, E., R. Piva, M.T. Khan, I. Lampronti, N. Bianchi, M. Borgatti, and R. Gambari. 2004. Effects of extracts from Bangladeshi medicinal plants on in vitro proliferation of human breast cancer cell lines and expression of estrogen receptor alpha gene. Int. J. Oncol. 24(2), 419-423,
36. Madaleno, I. M. 2004. «Resultados preliminares de un estudio sobre plantas medicinales vendidas en Ciudad de México.» Actas del Congreso de Geografía de América Latina. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 15 pp.
37. Maicas V.T., Rochina I.J., 2008. Linoleic acid emulsion on the peri-lesion skin of venal ulcers. Action and cicatrizant effect. Corpus study. Rev Enferm 31(4), 26-32.

38. McLaughlin, J. L. 1991. Crow 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. Methods in plants Biochemistry assays for Bioactivity. Academic Press 6, 1-32.
39. Morris, D. H. 2007. Linaza, un producto premier de salud y nutrición. Consejo Canadiense de Linaza. 1-8 p.
40. Muroi, H., Kubo, A., Kubo, I. 1993. Antimicrobial activity of cashew Apple flavor compounds. Journal of Agricultural of Food Chemistry 41, 1106-1109.
41. Murillo, F. 2006. Actividad antioxidante in Vitro de las bebidas de frutas. Revista Tecnológica Alfa editores técnicos, Junio/Julio 20-27.
42. Nuñez, M. E. 1982, Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore, Editorial Universidad de Costa Rica, 318p.
43. Ochoa, F. L y Alonso, C. M. 1996: Plantas Medicinales de México I: Composición, usos y actividad biológica. UNAM. México, 137 p.
44. O. M. S., 2004 "Recomendaciones para gobiernos y consumidores acerca del uso de la medicina tradicional, complementaria y alternativa", *J. Public Health*, 16, 218 pp.
45. Perez G. 2003. Los flavonoides; antioxidantes o prooxidantes. Revista Cubana Investigaciones Biomédicas. 22. 48-57
46. Rivera Y.C. 2012. "Actividad anti-candida de cuatro plantas medicinales". Tesis maestría. IPN, Mexico. 152p.

47. Rosas, L. R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis licenciatura, UNAM, México. 94 pp.
48. Ruiz, G.E., Martínez, C.C., Ruben, L.R., 2010. Caracterización fenotípica de *Staphylococcus epidermidis* aislado de pacientes con endoftalmitis. Gaceta de Medicina, México, 146 ( 2), 112-117.
49. Salcedo-Sánchez, B. 1997. Insectos precortesianos de la cueva de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Licenciatura.. UNAM Facultad de Ciencias. 6-10 pp.
50. Santosh, K. S., Vidya, D. P., Aradhana, S. y Chandan, S. 2009. Antibacterial activity of seed extracts of *Argemone mexicana* L. on some pathogenic bacterial strains. African Journal of Biotechnology, 8 (24), 7077-7081,
51. Sepulveda, J.G., Porta, D.H., Rocha, S.M 2003. "La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas". Revista mexicana de fitopatología. 21, 355-363.
52. Silver, L., Bostian, K. A. 1993. "Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance", *Antimicrob. Agents Chemother*, 37(3), 377.
53. Thomson, W. A. R. 1978. Medicines from the Earth; McGraw-Hill Book Co.; Maidenhead, United Kingdom. 1145 pp.

54. Toledo, C.S.M., Gonzales, L. J.A., Echemendia, O., Garcia, G.N., 2008. Evaluacion fitoquimica y farmacológica de frutos de *Erythroxylum minutifolium* Griseb (Erythroxylaceae). Revista cubana de plantas medicinales 13, 116-124.
55. Treviño, C. V. 2000. Medicina Prehispánica de México. Ed Panorama, México. 246 pp.
56. Valiente, B. A., Alcántara, A., Casas, A., Dávila, P., Flores, H. N., Arismendi, M. C., Ortega, R. J., Villaseñor, J. L., 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México 67, 24-74.
57. Vanden Berghe, D. A., y Vlietinck, A. J. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. Methods in plant biochemistry. "Assays for Bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P.M. Academic Press. New York, USA. 6, 47-71.
58. Velázquez, M. M. E. 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. Salud Pública. México. 47, 381-7.
59. Vitala, J.J. 2006. Micosis cutáneas. Madrid: Panamericana 8, 86-96.
60. Walton, N., Rodhes, M., Michael, A., Parr, A. 1999. Characterisation and control of plant secondary metabolism. Walton y Brown. Chemical from plants. London: Imperial College Press. 8, 27-90.
61. Wang, H., Bun, B.N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. Phytochemistry. 61(1), 1-6.

62. Wink, M. y Schimmer, O. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites, 17-134 In: Wink M., (ed) Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology. Sheffield Academy Press. England. 304 p.

## REFERENCIAS DIGITALES

1. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>, 6 de febrero del 2012.
2. OMS,1997  
[http://pendiendientedemigracion.ucm.es/info/socivmyt/paginas/Departamento/materiales/analisis\\_datosyMultivariable/14anova1\\_SPSS.pdf](http://pendiendientedemigracion.ucm.es/info/socivmyt/paginas/Departamento/materiales/analisis_datosyMultivariable/14anova1_SPSS.pdf) 3 de julio del 2013