

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

70

“Actividad biológica de algunos extractos químicos de *Gymnopus dryophilus* (Bull.: Fr.) Murrill (Fungi: Agaricales).”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O

P R E S E N T A :

Michael González Flores



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. JOSÉ LUIS VILLARRUEL ORDAZ
CODIRECTOR DE TESIS: M. en C. JOSEFINA HERRERA SANTOYO



2003

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Actividad biológica de algunos extractos químicos de *Gymnopus dryophilus* (Bull.: Fr.) Murrill (Fungi: Agaricales)."

realizado por Michael González Flores

con número de cuenta 9754327-7, quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M. en C. José Luis Villarruel Ordaz

Propietario
(director de tesis)

M. en C. Josefina Herrera Santoyo

Propietario

Dr. Joaquín Cifuentes Blanco

Suplente

Biól. Aurora Saucedo García

Suplente

Biól. Beatriz Zúñiga Ruiz

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

B

Para ti que en tus manos se aprecia la dedicación al trabajo, en esas manos áridas, agrietadas, toscas, rudas, maltratadas... semejantes a la tierra que, al igual que ella, las cosas que se quieren no se obtienen mas que con el trabajo arduo de la jornada y que dicho trabajo se valora al momento de la colecta de los frutos, gracias Padre...

Madre a ti que me enseñaste que el orden en las cosas es esencial para que las realice en todo momento y a donde vaya...

A la Naca que me pone los nervios de punta, siempre esta dispuesta a hacerme preguntas que me dejan pensado, gracias Liz

A Gabriel Sánchez Bacelis, mi mejor amigo, que es muy cierto que en este mundo hay muchos libros por leer y lugares por conocer...

A Gerardo Villicaña Araiza por su empeño en que uno lea y el apoyo que me ha brindado a lo largo de cinco años...

Gracias a los compañeros y amigos del Laboratorio de Micología: Lilia Pérez Ramírez (Lili), Magda Contreras (sin apodo), Violeta Patiño Conde (mis viol), Mariana Del Olmo (sin apodo), Ricardo García Sandoval (amante de las Mac), Edmundo Rosique (cinéfilo), Sigfrido Sierra (el pirata de los siete mares), José Luis Villarruel Ordaz (Yosipetardo), Alfonso Montañés (apu) y Joaquín Cifuentes Blanco (compallito , entre otros)...

A Felipe Ruan Soto compañero de generación, compinche del laboratorio, una gran persona y amigo... (Ruanóforo)

A Patricia Guevara por su apoyo y chistes...

A Josefina Herrera Santoyo por la dirección que le brindo a la tesis y el apoyo para dirigir mi desarrollo académico, además de ser una excelente amiga...

Al proyecto DGAPA-IN206901.

RESUMEN

Para determinar la actividad biológica del hongo *Gymnopus dryophilus* (Bull.: Fr.) Murrill se realizaron extractos con diferentes disolventes orgánicos (hexano, acetato de etilo y metanólico) y con agua; dichos extractos se probaron en tres bacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus cereus* y *B. subtilis*) y un crustáceo (*Artemia salina*). Al mismo tiempo se realizaron pruebas colorimétricas y de precipitación para determinar los grupos de metabolitos secundarios presentes en cada uno de los extractos, además se desarrollaron placas de gel de sílice para analizar la complejidad de cada uno de ellos.

En los bioensayos realizados con las bacterias se observó que para *E. coli* la actividad depende del tipo de extracto utilizado, en el caso de *B. subtilis* las concentraciones del extracto de acetato de etilo y metanólico presentaron diferencias significativas indicando con ello que la susceptibilidad depende de las concentraciones (100 y 150 mg). Para *B. cereus* la susceptibilidad es por el tipo de extracto. Se determina que la actividad para las bacterias a 150 mg es principalmente bactericida y para las concentraciones de 50 y 100 mg es tanto bactericida como bacteriostática. En el caso de *A. salina* se observa que las concentraciones empleadas del extracto hexánico, acetato de etilo y acuoso afectan la sobrevivencia, presentando una dosis letal media de 156 ppm, 13.5 ppm y 7.77 ppm respectivamente. Para el caso del extracto metanólico la dosis letal media estimada es mayor a 1000 ppm.

Por otro lado, los extractos hexánico, el de acetato de etilo y el acuoso resultaron positivos para las pruebas de terpenos y esteroides, así mismo el extracto hexánico resultó positivo para alcaloides, como el metanólico y acuoso para flavonoides. Ningún extracto resultó positivo para la prueba de glucósidos. Los extractos que presentaron un mayor número de manchas (siete manchas) fueron el hexánico y el de acetato de etilo, el metanólico y el acuoso presentaron cinco manchas, indicando un cierto grado de complejidad del extracto.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN:	
DIVERSIDAD FÚNGICA E IMPORTANCIA.....	1
METABOLISMO FÚNGICO PRIMARIO Y SECUNDARIO.....	2
MICOTOXINAS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	8
ANTECEDENTES:	
BASIDIOMYCETES.....	11
<i>Gymnopus dryophilus</i> (Bull.: Fr.) Murrill.....	12
JUSTIFICACIÓN	15
OBJETIVOS GENERALES	16
OBJETIVOS PARTICULARES	16
MATERIALES Y MÉTODOS:	
MATERIAL DE ESTUDIO Y EXTRACCIÓN	
RECOLECCIÓN	18
EXTRACCIÓN SELECTIVA Y ACUOSA.....	18
PRUEBAS COLORIDAS Y DE PRECIPITACIÓN PARA LA	
DETECCIÓN DE GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	20
DETERMINACIÓN DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO	21
BIOENSAYO CON BACTERIAS	
PREPARACIÓN DE LAS BACTERIAS Y CUANTIFICACIÓN DEL INÓCULO ..	21
IMPREGNACIÓN DE LOS SENSI-DISCOS Y MONTAJE DEL BIOENSAYO....	23
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
BIOENSAYO CON <i>Artemia salina</i>	
ECLOSIÓN DE <i>Artemia salina</i>	27
MONTAJE DEL BIOENSAYO.....	27
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	27
RESULTADOS:	
EXTRACCIÓN SELECTIVA Y ACUOSA.....	29
PRUEBAS COLORIMÉTRICAS Y DE PRECIPITACIÓN.....	29
PERFILES CROMATOGRÁFICOS.....	30
BIOENSAYO CON BACTERIAS	
PRUEBAS PRELIMINARES.....	36
BIOENSAYO CON LA BACTERIA <i>Escherichia coli</i>	36
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	37
BIOENSAYO CON LA BACTERIA <i>Bacillus subtilis</i>	39
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	40
BIOENSAYO CON LA BACTERIA <i>Bacillus cereus</i>	43
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	43
BIOENSAYO CON <i>Artemia salina</i>	46
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	46
DISCUSIÓN:	
ANÁLISIS QUÍMICO	
EXTRACTO HEXÁNICO.....	55
EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO.....	56
EXTRACTO METANÓLICO.....	57
EXTRACTO ACUOSO.....	59
DETERMINACIÓN DEL TIPO DE ACTIVIDAD	

BIOENSAYO CON BACTERIAS.....	60
BIOENSAYO CON <i>Artemia salina</i>	71
CONCLUSIÓN	72
LITERATURA CITADA	74
APÉNDICE A: TABLAS Y GRÁFICAS DE LA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	78
APÉNDICE B: TABLAS DE CONTINGENCIA BI- Y TRI-DIMENSIONALES DE LAS BACTERIAS	81
APÉNDICE C: ANÁLISIS PROBIT	91

INTRODUCCIÓN

DIVERSIDAD FÚNGICA E IMPORTANCIA

En tiempos actuales los gobiernos de todos los países han revalorizado la influencia directa que el ambiente tiene en las poblaciones humanas (ambiente-sociedad). A partir de ello se ha manifestado el interés en la conservación y manejo sustentado de los recursos presentes en la naturaleza, es decir, mantener la biodiversidad del entorno, ya que ésta es esencial para la civilización, siendo importante desde el punto de vista **económico** (como alimentos, combustibles, productos farmacéuticos, productos maderables, materia prima textil, etc.), **ecológico** (incluyendo las funciones de los ecosistemas, tales como la purificación del agua, el aire, la regulación del clima, fertilización del suelo, protección de zonas costeras, ciclos biológicos, etc.) y **cultural** (influyendo en las expresiones artísticas, en las creencias, en el conocimiento, en los usos y costumbres, en los hábitos, etc.).

La diversidad biológica es el resultado de procesos evolutivos, los cuales determinan las características y la riqueza de organismos que existe en un lugar y momento determinado entendiendo además que dicha diversidad se genera y mantiene en los ecosistemas naturales (Groombridge, 1992).

La biodiversidad se puede estudiar en tres niveles jerárquicos que corresponden a la organización biológica:

- a) Genético.- diversidad de alelos del mismo gen dentro de una especie, es decir, el conjunto de diferencias genéticas que caracterizan a las poblaciones.
- b) Tájico.- diversidad entre especies. Número total de especies conocidas.
- c) Ecosistémico.- diversidad de ecosistemas y comunidades.

Para el caso de los hongos Hawksworth (1991, 1992, 2001^a) estima la diversidad de hongos en 1.5 millones de especies, presentándolo como el segundo taxon más diverso del planeta, del cual se conoce menos del 5%. Rossman (1994) estima que tan sólo para el grupo de los Basidiomycota existen alrededor de 175 mil especies.

El horizonte en la utilización de los hongos esta dirigido hacia las aplicaciones en la medicina, como alimento, para la degradación de productos de desecho, en la industria química y materiales textiles, bioindicadores, bioremediación, biocontrol, crecimiento de plantas y árboles, en la conservación, en la enseñanza, así como en usos decorativos ó artísticos (Hawksworth, 2001^b).

METABOLISMO FÚNGICO PRIMARIO Y SECUNDARIO

El metabolismo presenta dos funciones generales, la anabólica (la cual transforma nutrientes en componentes estructurales y funcionales del organismo) y la catabólica (la cuál extrae la energía química o los elementos nutritivos tales como el N y el S). El catabolismo a partir de nutrientes complejos provee de energía y materiales para las reacciones anabólicas. El anabolismo es dependiente del catabolismo no sólo por la energía en la forma de ATP, NADH y NADPH, sino también para la producción de intermediarios clave para la biosíntesis de macromoléculas funcionales.

Los eventos metabólicos que son importantes para las funciones vitales de los seres vivos están involucrados en el metabolismo primario. Las enzimas y los metabolitos primarios (ejemplo de metabolitos primarios fúngicos son el ácido cítrico, ácido glucónico, ácido fumórico, ácido láctico, glicerol, etanol, etc.) se presentan en una gran cantidad de hongos y bacterias.

Los hongos producen varios compuestos que pueden ser secretados al medio en donde están creciendo. Estos metabolitos constituyen el metabolismo secundario, los cuales están limitados en su distribución, frecuentemente a una especie o a un grupo de especies, ésta distribución peculiar de metabolitos es llamada idiosincrásica (Griffin, 1994).

Algunas características que presentan los metabolitos secundarios son:

-Su producción es extremadamente específica, presentándose en una especie.

-En la mayoría de las veces no se les ha podido definir una función dentro del organismo que las produce.

-Durante la trofofase se presenta la producción de los precursores de los metabolitos secundarios y la conformación de los mismos en la idiofase (Bennett, 1995).

Nisbet y Fox (1991) indican que el éxito de la aplicación de organismos en procesos industriales es dependiente de la diversidad de organismos y de las serie de moléculas químicas producidas en el metabolismo primario y secundario.

Algunos metabolitos secundarios presentan un gran valor comercial como son los antibióticos, las hormonas vegetales, diversos compuestos que le dan sabor a los alimentos; otro tipo de metabolitos secundarios presentan toxicidad para una serie de organismos, y han sido llamados micotoxinas.

El metabolismo secundario depende del metabolismo primario por la energía y los intermediarios que produce, además proviene de varios puntos dentro de las rutas del metabolismo primario (figura 1). Lo que conlleva a que los productos finales del metabolismo secundario tengan poco en común. La síntesis de metabolitos secundarios se ve favorecida cuando se restringe el crecimiento normal. Conforme la célula crece y produce energía, los metabolitos secundarios llegan a ser compuestos terminales de las rutas metabólicas primarias. Así mismo cuando se restringe el crecimiento de las células, se aprecia una acumulación de metabolitos secundarios. Para explicar esta sobreproducción de metabolitos secundarios se ha propuesto considerar a éstos compuestos como una "válvula de seguridad" que deja escapar los intermediarios de las vías metabólicas básicas cuando se restringe el crecimiento y los convierte en compuestos con poca o ninguna actividad fisiológica. Extrapolando dicho argumento se sugiere que algunos organismos han transformado los metabolitos de manera que les proporcionen una ventaja competitiva en algunos medios naturales (Deacon, 1997).

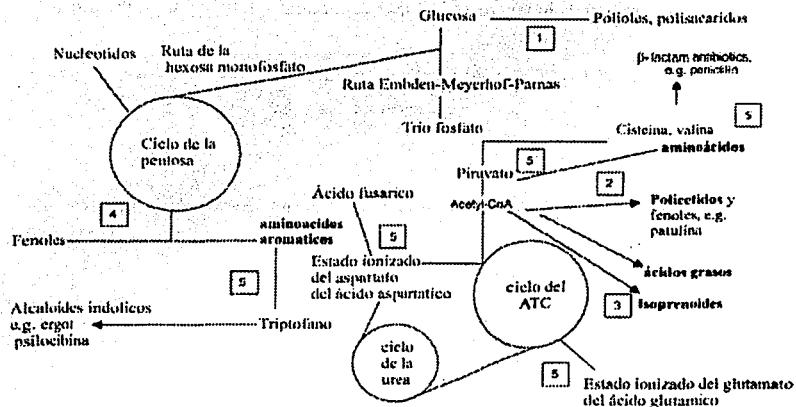


Figura 1. Relaciones que se presentan entre las rutas metabólicas primarias y el metabolismo secundario. Las principales rutas del metabolismo secundario son numeradas a continuación: (1) metabolitos derivados de la glucosa; (2) ruta del acetato-malonato; (3) ruta del ácido mevalónico; (4) ruta del ácido shiquímico y (5) derivados de la ruta de los aminoácidos. ATC=ácido tricarbóxico (adaptado de Griffin 1994; basado del libro *Fungi as biocontrol agents*).

A pesar de que el conocimiento que se tiene acerca de los hongos es muy reducido, se ha logrado determinar la presencia de metabolitos defensivos o antagonicos, aunque han sido pocos los estudios químicos que se han realizado a partir de éstos (Gloer, 1995). Sonnenbichler *et al.* (1989) nombran a los metabolitos secundarios como "metabolitos ecológicos" por su presencia cuando éstos se producen como resultado de una interacción ecológica

Frecuentemente se hipotetiza que cuando los hongos prosperan en ambientes competitivos es debido a los metabolitos secundarios que pueden ser sintetizados por presiones de selección ejercida por otro organismo. La extraordinaria diversidad de especies fúngicas sugiere un potencial ilimitado para la variación de metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios han demostrado presentar un papel antagonico en enfermedades de plantas e insectos, ser tóxicos para animales, le confieren al organismo que los sintetiza resistencia a la infestación/infeción microbiana, resistencia a la fungivoría, el biocontrol de otros organismos así como antagonismo interespecífico (Gloer, 1995).

Muchos de los metabolitos secundarios no forman una categoría química y no necesariamente tienen una estructura molecular común. Debido a esto usualmente se clasifican tomando en cuenta la ruta metabólica por la cual son producidos. Se pueden reconocer cuatro principales grupos que son: (1) compuestos formados por la condensación de acetil coenzima A (acetil-CoA) en la vía del ácido mevalónico; (2) metabolitos formados por la condensación de acetil-CoA en la vía acetato-malonato y síntesis de ácidos grasos; (3) metabolitos derivados de la vía del ácido shiquímico y la biosíntesis de aminoácidos aromáticos; y (4) varias otras rutas de la biosíntesis de aminoácidos alifáticos (Kendrick, 1985; Griffin, 1994; Jennings y Lysek 1996 y Deacon 1997).

Derivados de la ruta del ácido mevalónico.- Se inicia con el más importante precursor de metabolitos secundarios que es el acetil-CoA. Tres moléculas de acetil-CoA se condensan para dar lugar a la formación de mevalonato, precursor inmediato del ácido mevalónico (Deacon, 1997). Este último es fosforilado, descarboxilado y deshidratado para convertirse en isopentenil-pirofosfato (IPP). Las unidades IPP y su isómero dimetil-alil pirofosfato se condensan "cabeza-cola" para formar cadenas de varias longitudes a través de intermediarios como el geranil-pirofosfato y farnesil-pirofosfato, dando origen entre otros a los *terpenoides*. La cadena puede experimentar ciclización y sufrir modificaciones, originando metabolitos como los *esteroides* y *carotenoides*. En algunas ocasiones, un posible precursor para la síntesis de terpenos es la leucina, la cual es desaminada, carboxilada y convertida posteriormente a ácido mevalónico, pasando por hidroximetilglutaril-CoA como intermediario (Mann, 1987; Garraway y Evans, 1996).

Una amplia variedad de compuestos incluyendo carotenoides, esteroides y esteroles pertenecen a la clase más grande de metabolitos secundarios llamados *terpenoides* (Thomson, 1993).

Muchos esteroides son compuestos funcionalmente requeridos en la estructura de la membrana celular, siendo el ergosterol el más común, pero también se han reportado ácido

tsugárico (Lin *et al.*, 1997), episterol (Lourenco *et al.*, 1996) y ácido zhancuico (Shen *et al.*, 1997).

Derivados de la vía del acetato-malonato. - Las acetogeninas, también conocidas como policétidos provienen de la condensación de unidades de acetato. Inicia con el acetyl-CoA como precursor, el cual da origen a una unidad de malonil-CoA mediante carboxilación enzimática. Esta unidad de 3 carbonos se condensa con otra unidad de acetyl-CoA en simultánea descarboxilación, logrando como resultado final la condensación de dos unidades de acetato, repitiéndose el proceso de condensación con otras moléculas de acetyl-CoA. De esta manera se originan sustancias policetónicas que pueden dar lugar a la formación de ácidos grasos por reducción total en la cadena de los grupos ceto a hidróxidos (Gros *et al.*, 1985; Kendrick, 1985; Mann, 1987). La cadena policetónica puede experimentar ciclización y entonces los sistemas de anillos son modificados en diferentes vías para dar una amplia variedad de compuestos aromáticos (Deacon, 1997), como los *flavonoides*, donde participan acetyl-CoA y ácido cinámico, lo cual indica un origen biosintético mixto, ya que una parte del esqueleto carbonado esta formado por 3 unidades de acetyl-CoA (vía acetato) y una unidad de fenilpropano que proviene de la vía del ácido shiquímico (Gros *et al.*, 1985).

Derivados de la vía del ácido shiquímico.- La ruta empieza con la condensación de fosfo-enol-piruvato y eritrosa-4-fosfato para formar ácido deshidroxiquímico. Este producto cíclico es convertido por un complejo multienzimático en ácido shiquímico y posteriormente en ácido corismico, del cual se derivan una gran cantidad de compuestos aromáticos (fenilpropanos) relacionados con la fenilalanina, tirosina y triptofano (aminoácidos aromáticos). Muchos de estos metabolitos aromáticos sufren importantes transformaciones a través de intermediarios para formar el ácido cinámico y ácido coumarico, los cuales son derivados de la fenilalanina y/o tirosina. Derivados del triptofano retienen el núcleo indol con lo que conforman los compuestos conocidos como *alcaloides*. Se pueden formar alcaloides con un origen biosintético mixto, cuyo origen esta dado por la

condensación del triptofano con una cadena terpenoide. Esta cadena sufre ciclización causando que el átomo de nitrógeno se incorpore como parte del anillo heterocíclico.

La vía es usada normalmente para la producción de aminoácidos aromáticos, pero también provee de precursores como el mismo triptofano para la biosíntesis de metabolitos alucinógenos como la Psilocibina, que se encuentra ampliamente distribuida en especies del género *Psilocybe* (Deacon, 1997).

Derivados de aminoácidos alifáticos.- Los compuestos que se forman a partir de aminoácidos alifáticos se caracterizan por tener uno o más átomos de hidrógeno reemplazados por un grupo alquil (aminas). Muchas de estas aminas se forman por metilaciones, oxidaciones, transaminaciones, descarboxilaciones, e hidroxilaciones que sufren los aminoácidos. Muchos de estos se pueden llegar a juntar por medio de enlaces peptídicos para conformar estructuras polipeptídicas (Moore-Landecker, 1996). Aun cuando los aminoácidos son esenciales para la elaboración de proteínas, también juegan un papel de intermediarios para muchos compuestos como por ejemplo las amanotoxinas y las falotoxinas presentes en especies del género *Amanita*. Estos compuestos son altamente tóxicos y están estructurados por péptidos que tienden a formar ciclos por lo cual se les conoce con el nombre de ciclopéptidos, siendo las amanotoxinas compuestos de 8 péptidos bicíclicos y las falotoxinas de 7 péptidos monocíclico (Garraway y Evans, 1996).

MICOTOXINAS Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La evolución de los hongos han permitido que se desarrollaran en diferentes sustratos sólidos de una manera eficiente, secretando enzimas que degradan el sustrato, paralelamente a la producción de enzimas sintetizan metabolitos secundarios los cuales presentan actividad biológica, siendo tóxicos para algunos organismos (Moss, 1996; Herrera y Ulloa, 1990).

Las intoxicaciones provocadas por la ingestión de toxinas fúngicas pueden darse de dos maneras (Herrera y Ulloa, 1990); una de ellas (llamada micetismo) implica la ingestión completa de alguna estructura multicelular (por ejemplo el cuerpo fructífero), en cuyo caso las toxinas se encuentran de manera intracelular (endotoxinas). La otra manera de sufrir una intoxicación consiste en ingerir alimentos contaminados con toxinas secretadas por algún hongo (micotoxicosis). En este caso las toxinas son producidas por los hongos y secretadas al sustrato donde están creciendo (exotoxinas). Ejemplo de estos tipos de intoxicación se presentan en la tabla I.

MICOTOXICOSIS		
Organismo	Compuesto	Enfermedades que se presentan
<i>Aspergillus flavus</i> <i>A. parasiticus</i> y <i>A. clavatus</i>	Aflatoxinas (B1, B2, G1, G2, M1, etc.)	Carcinoma hepático.
<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina	Hepatotóxicosis y nefrotóxicosis en pollos, cerdos, etc., así como aborto en el ganado bovino y en cerdos.
<i>A. versicolor</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. oryzae</i> y <i>A. glaucus</i>	Esterigmatocistina Fumagilina	Cancerígena
<i>Penicillium islandicum</i>	Luteosquirina, clicloclorotina y critrosquirina.	Probables hepatotóxicos y carcinogénicos.
<i>P. viridicatum</i>	Ácido veridicático	Nefrotóxicos.
<i>P. citrinum</i>	Citrinina	
<i>P. charlís</i>	Ácido carólico	
<i>P. terrestre</i>	Ácido terrestre	Son responsables de la aparición de cardiotoxicos.
<i>P. cyclopium</i>	Ácido ciclopiazónico y penitrem.	
<i>P. toxicarium</i>	No se sabe	Causa síntomas semejantes al Beriberi.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Organismo	Compuesto	Síntomas que se presentan
<i>P. rubrum</i>	Rubratotoxias.	Producen hemorragias
<i>P. purpurogenum</i>	Ácidos glucánicos y glucónico	
<i>P. citreoviride</i>	Citroviridina	Neurotóxico.
<i>P. expansum</i>	Patulina	Compuestos carcinógeno.
<i>Fusarium nivale</i>	Butenolida	Neurotóxico y gastroenterotóxico.
<i>F. roseum</i> y <i>F. graminearum</i>	Zearalenona (F-2)	Efectos estrogénicos y abortivos en cerdos.
<i>F. tricinctum</i>	T-2	En el hombre producen alucina.
<i>F. moniliforme</i>	Zearalenona, moniliformina y ácido fusfárico.	
<i>Stachybotrys atra</i>	Atratoxina	Irritación en la piel de cerdos, hombre y algunos otros animales (se absorbe por la piel o por la vía respiratoria).

MICETISMOS

Organismo	Compuesto	Enfermedades que se presentan
<i>Amanita faloides</i> , <i>A. verna</i> y <i>A. hisporigera</i> .	Falodinas (tales como: falotoxinas y las amanitinas).	Trastornos gastrointestinales de tipo coleriformes, deshidratación, oliguria o de anuria, de hipotermia.
<i>A. muscaria</i> , <i>A. chlorinosma</i> , <i>A. pantherina</i> , <i>Inocybe infida</i> , <i>I. patovillardii</i> , <i>I. hapipes</i> , <i>I. dulcamara</i> , <i>I. Rimosa</i> e <i>I. fastigiata</i> .	Muscarinicas (muscarina, muscardina, micoatropina).	Actúan sobre el sistema nervioso parasimpático. <i>Amanita muscaria</i> también produce micetismo cerebral.
<i>Lepiota helveola</i> , <i>Cortinarius orellanus</i> y <i>C. semisanguineus</i> .	Probablemente orellanina	Micetismo semejante al producido por <i>Amanita phalloides</i> .
<i>Psilocybe mexicana</i> , <i>P. caerulescens</i> , <i>P. candidipes</i> , <i>P. cubensis</i> , <i>P. yungensis</i> , <i>P. cordispora</i> , <i>P. zapotecorum</i> , <i>P. muliercula</i> , <i>P. aztecorum</i> .	Producción de toxinas indólicas como la psilocibina y psilocina.	Tienen acción psicodisléptica (desvían o perturban el mecanismo psíquico).
<i>Vascellum qudenii</i> , <i>Ungulina auberiana</i> y <i>Russula nondorbingi</i> .	No se conoce	Presenta efectos narcóticos ó psicodélicos.

Tabla 1. Algunas especies fúngicas que presentan algún tipo de toxina que afecta a animales. [información extraída de Herrera y Ulloa, 1990].

Algunos cuerpos fructíferos de los Basidiomycetes y Ascomycetes son un recurso alimenticio en varias partes del mundo pero un número significativo de estas especies pueden producir metabolitos tóxicos (Kües y Liu, 2000; Rumack y Salzam, 1978; Moss 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Moss (1996) y Herrera y Ulloa (1990) indican que los metabolitos secundarios pueden presentar alguna actividad biológica para un gran número de organismos, aún de diferentes reinos. Sin embargo la actividad biológica de los metabolitos secundarios esta en función del organismo al que se le somete a prueba por ello se pueden encontrar metabolitos a los cuales se les ha conferido más de una actividad.

En éste trabajo la actividad biológica se define como la cantidad, concentración o dosis de la sustancia prueba que es necesario utilizar para causar un efecto en un ser vivo. (Délano com. pers.) De **forma externa** se aplica el extracto a distintas concentraciones que esperamos **induzcan** una respuesta en nuestros organismos prueba, y **determinar** así si la respuesta corresponde a nuestro extracto.

ANTECEDENTES

BASIDIOMYCETES

Los hongos se definen a partir de características comunes tales como la degradación del sustrato extra celularmente y la difusión de los nutrientes dentro de la célula fúngica, heterótrofos, reproducción por medio de esporas (Alexopoulos, y Mims, 1979), del estudio ultra estructural que presentan las células, ciclos sexuales y tipos de reproducción presentados así como la ornamentación de las esporas, etc. (Moore-Landecker, 1990; Herrera y Ulloa 1990; Lynn y Shwartz, 1985). El reino de los hongos no solo incluye una línea filogenética sino un estilo de vida compartido por organismos de historias evolutivas diferentes (Bryce, 1992).

Los Basidiomycetes agrupan a 1,428 géneros (con más de 1,237 sinonimias), con 22,244 especies conocidas presentando una distribución cosmopolita (Hawksworth *et al.*, 1995), aunque Lynn y Schwartz (1985) mencionan que para Basidiomycetes se conocen 25,000 especies.

Los caracteres que comparten la clase Basidiomycetes son la presencia de basidios que originan basidiosporas, el basidio es cenocítico y tiene entre una y cuatro basidiosporas haploides (Hawksworth *et al.*, 1995), los basidios se encuentran organizados en un himenio que se localiza en el basidiocarpo.

A partir de las estimaciones de Rossman (1994) y del número de especies que Hawksworth *et al.* (1995) señalan para los Basidiomycetes, se conoce tan sólo el 12.71% de las especies.

Para estimar el número de trabajos de investigación sobre el estudio de los metabolitos secundarios en la clase de Basidiomycetes se realizó una búsqueda en bases de datos (apéndice A).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esta revisión permitió determinar cuales son las líneas de investigación más recurrentes. De la información que se obtuvo, el 44% corresponde a estudios bioquímicos, estudios químicos un 25%, estudios de actividad biológica un 18% y estudios biotecnológicos un 6%. Los estudios de actividad biológica presentan cierta tendencia en la búsqueda de compuestos con actividad antibiótica y antifúngica; esto se debe a la resistencia que algunos microorganismos empiezan a manifestar con los compuestos comúnmente utilizados para su control.

Dentro de los Basidiomycetes el Orden que presenta un mayor número de trabajos realizados es el de los Agaricales, con un 41%, de los cuales las investigaciones de compuestos con aplicación antibiótica ó antifúngica representan un 32% y presenta una tendencia en la búsqueda de compuestos con actividad fitopatogena de un 2%. Dicho Orden abarca un 26.97% de las especies dentro de la clase. Estos porcentajes están en función del número de citas y no representan el conocimiento que se tiene de los metabolitos secundarios.

Gymnopus dryophilus (Bull.: Fr.) Murrill

La clasificación taxonómica de *Gymnopus dryophilus* (Bull.: Fr.) Murril (sensu Antonín *et al.*, 1997):

División	Eumycota
Subdivisión	Basidiomicotina
Clase	Holobasidiomycetes
Subclase	Hymenomycetidae
Orden	Agaricales
Familia	Tricholomataceae
Género	<i>Gymnopus</i> (Pers.) Roussel, <i>Fl. Clavados</i> , ed. 2:62. 1806
Especie	<i>G. dryophilus</i> (Bull.: Fr.) Murrill, <u>N. Amer. Flora</u> 9:362. 1916

Sinónimos:

Agaricus dryophilus Bull.: Fr., Syst. Mycol. 1:124. 1821.

Marasmius dryophilus (Bull.: Fr.) Karsten, Krit. Ofvers. Finlands Basidsvamp. 103. 1889.

Collybia dryophila (Bull.: Fr.) Kummer, Führ. Pilzk. 115. 1871.

Collybidium dryophilum (Bull.) Murrill, Mycologia 3: 101. 1911.

La especie en estudio se encuentra dentro de la sección *Levipedes*. Dicha sección se caracteriza por tener las hifas del pileipellis no diverticuladas, ramificadas, esporas inamiloides, con esporada blanca a color crema y pileo sin coloraciones violáceas (Villarruel-Ordaz, *et al.* 1993).

Gymnopus dryophilus presenta un pileo de tostado claro a castaño, plano, glabro. Láminas juntas, blancas o un poco amarillentas; estipite esbelto y tenaz, con una coloración café amarillenta a naranja, glabro, un poco tomentoso por la base. Carne fibrosa-coriácea, color de la esporada blanca siendo inamiloides las esporas. Su distribución en México es en bosques de *Pinus-Quercus*, *Pinus-Abies*, *Quercus* y mesófilo de montaña a 1900-3200 msnm, siendo húmicola ó terrícola. Se ha registrado en los estados de: Chiapas, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelia, Nayarit, Nuevo Leon, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Villarruel-Ordaz, 1992).

Los trabajos realizados con esta especie a nivel nacional se han enfocando principalmente al estudio taxonómico del género (Villarruel-Ordaz, 1992, Villarruel-Ordaz, 1995) y al cultivo micelial bajo diferentes parámetros (Pellicer-González, 1998).

A nivel mundial se tienen logrados los trabajos de Bianco-Coletto *et al.* (1993) y Bianco-Coletto y Giardino (1996). Estos trabajos reportan la actividad biológica del micelio de *Gymnopus dryophilus* en contra de las bacterias *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*,

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, sin embargo en el trabajo realizado por Bianco-Coletto y Giardino (1996) en un sistema de prueba utilizando las especies *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella thyphimurium* y *Candida albicans* sólo se observó la actividad biológica del micelio contra *B. cereus*.

Así también Hein, *et al.* (en prensa) han reportado la presencia de tres compuestos con actividad insecticida del micelio de *G. dryophilus*, siendo una nueva piridina (5-(1,2-dihidroxipropil) metilpicolinato y dos metil-purinas conocidas, de las cuales ya habían sido aislados de *Rhodocollybia maculata*. Dichas purinas se reportan con actividad antifúngica, citotóxica y antiviral, presentando en las pruebas con dieta, una reducción en la tasa de crecimiento del 95% de *Spodoptera frugiperda* a una concentración de 80 ppm; presentando para la nueva piridina una reducción en la tasa de crecimiento del 92%. Mientras que para *Helicoverpa zea* las purinas causan una reducción en la tasa de crecimiento de un 40% y 96% utilizando una dieta como prueba con una concentración de los compuestos de 80 ppm.

En nuestro país se tienen registros de éste hongo con un uso tradicional comestible como lo citan Guzmán-Dávalos y Guzmán (1979); Guzmán y Villarreal (1984) y Aroche *et al.* (1984), entre otros.

JUSTIFICACIÓN

La alta diversidad fúngica que se estima en el mundo así como el descubrimiento y uso potencial que presentan los metabolitos secundarios fúngicos nos plantea una amplia gama de usos y aplicaciones que se pueden vincular a la biotecnología.

En los últimos años se ha concientizado en la importancia de buscar nuevos metabolitos secundarios así como su posible aplicación, ejemplo de ello es la incorporación de estos compuestos a nivel industrial para el control de plagas, en la industria farmacéutica, en la elaboración de productos comerciales (ácidos orgánicos, alcohol, alimentos fermentados, vitaminas, enzimas, etc.), así mismo en su utilización en el biocontrol de plagas, etc.

Los basidiomas de *Gymnopus dryophilus* no tienen registros de estudios químicos a la fecha, por lo que un análisis químico general podría brindarnos un panorama amplio para proponer estudios específicos en búsqueda de compuestos activos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS GENERALES

Realizar un análisis químico general consistente de: extracción selectiva y acuosa, análisis cromatográfico y determinación de los grupos de metabolitos secundarios de basidiomas de *Gymnopus dryophilus*.

Determinar el efecto de diferentes extractos obtenidos de basidiomas de *Gymnopus dryophilus* en diferentes organismos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Obtención de extractos con hexano, acetato de etilo, metanol y agua.

Determinar la presencia de grupos de metabolitos secundarios en cada uno de los extractos con diferentes pruebas coloridas y de precipitación.

Realizar y analizar los perfiles cromatográficos de cada uno de los extractos.

Determinar la actividad biológica de cada uno de los extractos en los organismos: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Artemia salina*



MATERIALES Y MÉTODOS

Para una mejor comprensión de los métodos utilizados, se pueden dividir los métodos referentes al análisis químico y los métodos utilizados para la determinación de la actividad biológica, lo cual se esquematiza en la figura 2.

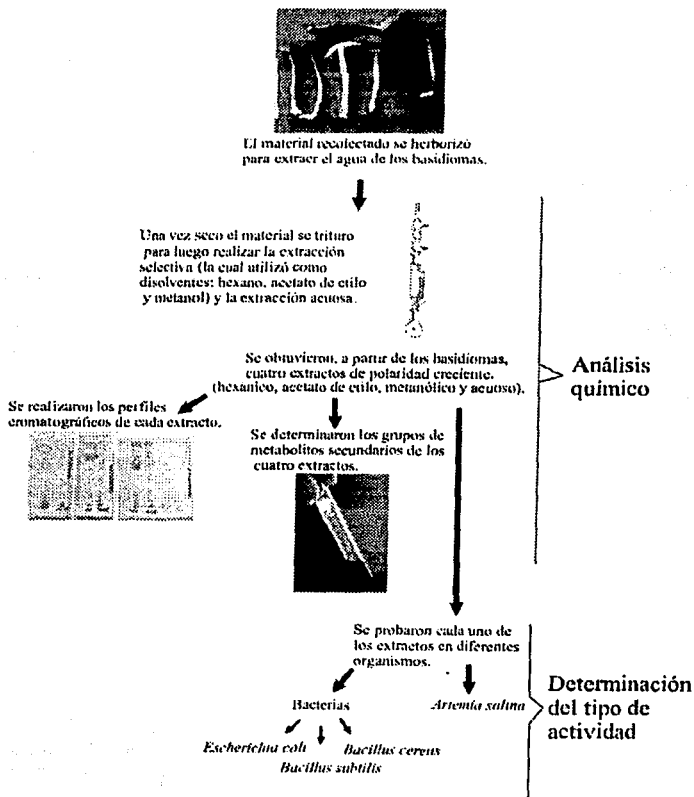


Figura 2. Diagrama de la metodología empleada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL DE ESTUDIO Y EXTRACCIÓN

RECOLECCIÓN

El material fue recolectado por González-Flores 22/09/2000 en la Reserva Especial de la Biosfera Mariposa Monarca (REBMM), en Angangueo, Michoacán y se preservó siguiendo las técnicas propuestas por Cifuentes *et al.*, (1986). Parte de la recolecta se depositó como material de referencia en la colección del Herbario (FCME 19135) de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Para la determinación del ejemplar se utilizaron las claves de Halling (1983); Antonín y Noordeloos (1997) y Villarruel-Ordaz (1992).

EXTRACCIÓN SELECTIVA Y ACUOSA

El material biológico fue secado y molido. Se obtuvo un peso seco total de 68.4 g, del cual la mitad fue utilizada para la extracción acuosa y los restantes 34.2 g para la extracción selectiva.

Todas las extracciones se realizaron utilizando el método de Soxhlet. Para la extracción selectiva se emplearon tres disolventes orgánicos de polaridad creciente: hexano, acetato de etilo y metanol cada extracto se realizó por intervalos de 8 hr y por triplicado (figura 3).

Los extractos orgánicos se concentraron a presión reducida en un rotavapor llevándose a sequedad. Mientras que para el extracto acuoso el agua se eliminó por liofilización. Los extractos se pesaron y se calcularon sus rendimientos respecto al peso seco de los basidiomas.

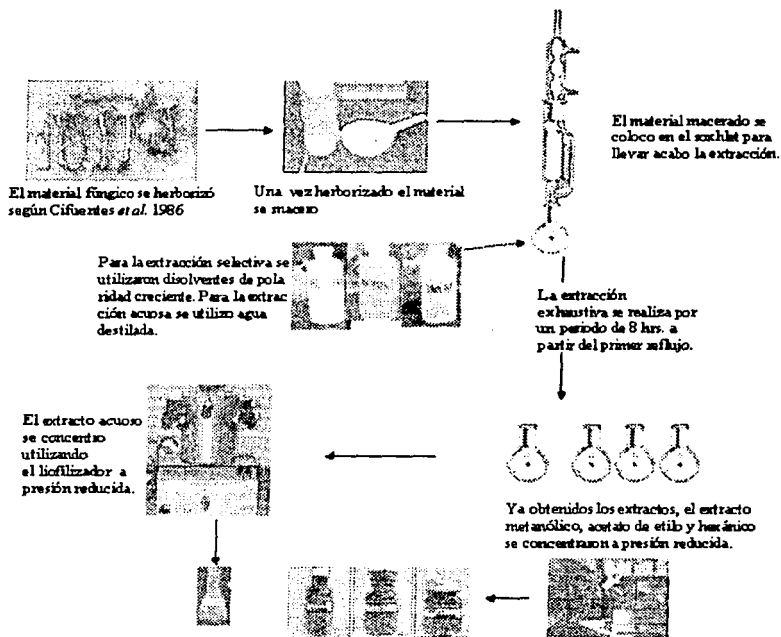


Figura 3. Diagrama de la extracción selectiva y acuosa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PRUEBAS COLORIDAS Y DE PRECIPITACIÓN PARA LA DETECCIÓN
DE GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Para la realización de las pruebas se prepararon soluciones de los extractos a una concentración de 5 mg/ml, tomando 5 mg del extracto para cada una de las pruebas correspondientes (Dominguez, 1988):

Glucósidos.- Éstos se determinan mediante la prueba de Mölich. Al extracto disuelto en metanol, se le adicionan dos gotas de α -naftol (al 5% en etanol) y posteriormente se adicionan por las paredes 1 ml de H_2SO_4 concentrado. Se forma un anillo en la interfase siendo positiva la prueba si el color del anillo se torna violeta.

Flavonoides.- Se determinan con la prueba de Shinoda, la cual consiste en agregar al extracto (disuelto en metanol) un trozo pequeño de limadura de magnesio y dos gotas de ácido clorhídrico concentrado. La prueba resulta positiva si la solución torna a color verde o naranja.

Terpenos y esteroides.- El extracto se disuelve en cloroformo y se agrega posteriormente un mililitro del reactivo de Liebermann-Burchard. La prueba es positiva si la solución presenta un cambio de coloración de verde a azul ó de rojo a naranja.

Alcaloides.- El extracto se disuelve en MeOH se adiciona una gota de ácido clorhídrico y dos gotas del reactivo de Dragendorff. La prueba resulta positiva si se forma un precipitado color naranja.



DETERMINACIÓN DEL PERFIL CROMATOGRÁFICO

Se utilizaron placas de gel de sílice. El sistema de eluyentes se eligió abarcando un intervalo de baja a alta polaridad (empleando diferentes mezclas de los siguientes pares de disolventes: hexano:acetato de etilo, cloroformo:metanol, metanol:agua y butanol:ácido acético:agua).

Una vez eluidas las placas se observaron con luz ultravioleta de 254 y 365 nm, marcando las manchas con línea punteada para onda larga y con cruces pequeñas las de onda corta. Posteriormente las placas se revelaron con sulfato cérico. Las manchas obtenidas se marcaron con líneas continuas.

BIOENSAYO CON LAS BACTERIAS

PREPARACIÓN DE LAS BACTERIAS Y CUANTIFICACIÓN DEL INÓCULO

Las cepas bacterianas fueron donadas por la Facultad de Química de la UNAM, los números de catálogo son los siguientes:

<i>Escherichia coli</i>	ATCC	25922
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC	6633
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC	11778

Dichas bacterias se inocularon en caldo nutritivo y se incubaron a 37° C para su óptimo crecimiento. A la par se preparo el estándar de McFarland utilizando una solución de ácido sulfúrico a .36 N y una solución de cloruro de bario al 1%. Una vez obtenidas las soluciones se mezclaron conforme lo muestra la tabla 2 (Bauer *et al* 1966).

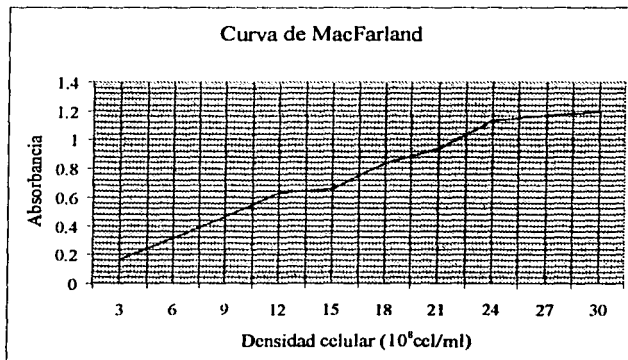
Mc Farland

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cloruro de bario (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Ácido sulfúrico (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Densidad celular aproximada ($\times 10^8/\text{ml}$)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Tabla 2. Se muestra las proporciones de los compuestos para obtener las muestras y realizar la curva de McFarland.

Realizadas las mezclas se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm y los resultados se graficaron (Gráfica 1).

Absorbancia	Densidad celular estimada
0.165	3
0.315	6
0.463	9
0.631	12
0.66	15
0.834	18
0.936	21
1.133	24
1.167	27
1.19	30

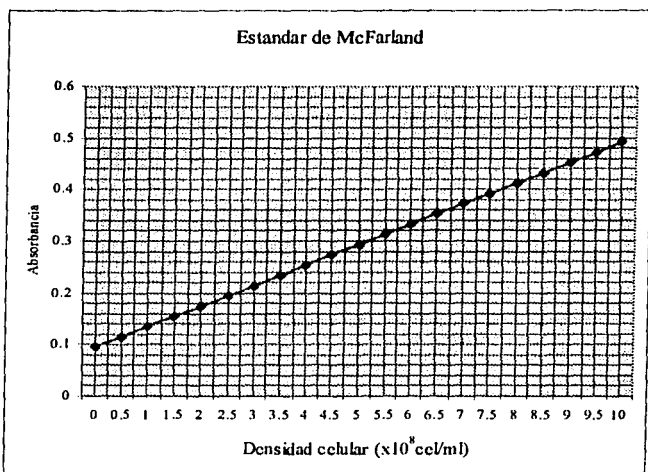


Gráfica 1. Con los datos obtenidos se graficaron los valores para obtener la curva de McFarland.

Se realizó una regresión lineal para inferir una recta que relacione directamente las variables y con ello estimar el inóculo bacteriano a utilizar (Bauer *et al.* 1966). Los resultados obtenidos se muestran en la gráfica 2.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Y	X
0.095133	0
0.11496	0.5
0.134786	1
0.154612	1.5
0.174438	2
0.194265	2.5
0.214091	3
0.233917	3.5
0.253743	4
0.27357	4.5
0.293396	5
0.313222	5.5
0.333048	6
0.352875	6.5
0.372701	7
0.392527	7.5
0.412354	8
0.43218	8.5
0.452006	9
0.471832	9.5
0.491659	10



Gráfica 2. Una vez calculados los valores se obtienen los puntos para "y" así como para "x" a partir de las ecuaciones anteriores se grafican para obtener el estándar de Mc Farland.

Se calculó en .115 la absorbancia requerida para inocular 5×10^7 bacterias/ml. Para el crecimiento y obtención de la densidad celular requerida las tres especies de bacterias se inocularon en caldo nutritivo y se incubaron por intervalo de 36 h. y se midió en el espectrofotómetro la absorbancia del cultivo y se estandarizó cada una de las especies a una absorbancia de .115.

IMPREGNACIÓN DE LOS SENSI-DISCOS Y MONTAJE DEL BIOENSAYO

Los extractos de baja y mediana polaridad (hexano y acetato de etilo) se resolvieron en cloroformo y los dos restantes en los disolventes en que fueron extraídos. Se impregnaron sensi-discos (Aldrich) con tres diferentes concentraciones de cada extracto, las

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

tres concentraciones fueron de 50 µg, 100 µg y 150 µg, para cada uno de los extractos se hizo la impregnación por quintuplicado.

Se realizó una prueba preliminar preparando 12 cajas con 25 ml de medio Mueller-Hinton cada una de las cajas. A cada especie de bacteria se le asignaron 4 cajas y en cada una se colocaran sensi-discos a las tres concentraciones del mismo extracto. Esta prueba se realizó para la determinación del tipo de actividad biológica, teniendo como respuesta la actividad bacteriostática (presencia de un halo de inhibición con una densidad celular menor que la presentada en el resto de la caja, asumiendo que esto se debe a la inhibición parcial del crecimiento bacteriano) y bactericida (presentando un halo de inhibición total, el cual se distingue por no presentar crecimiento bacteriano alrededor del sensi-disco).

Para el bioensayo en cada caja se distribuyeron 4 sensi-discos presentando una separación entre ellos de 2.2 cm. y 1.4 cm. del borde de la caja, como lo muestra la figura 4 (Bauer, 1966):

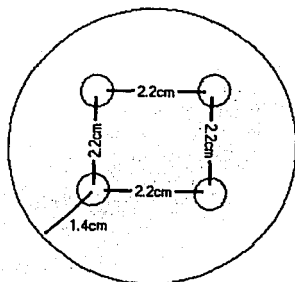


Figura 4. Distribución de los sensi-discos según el método de Bauer, (1966).

Las pruebas se realizaron según el método de Concepcion *et al.* (2001); éstas se realizaron por quintuplicado, así mismo todas las cajas se incubaron durante 24 horas a temperatura constante (37°C) para luego cuantificar (figura 5). Al momento de tomar los datos se pueden llegar a presentar zonas como las reportadas por Barry (1986), donde se presenta una zona de inhibición completa, una zona de crecimiento demorado ó parcialmente demorado y una zona de crecimiento estimulado (figura 6).

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACIÓN

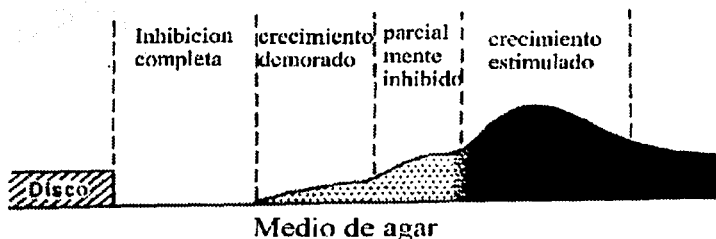


Figura 6. Las zonas que se representan en el diagrama corresponden a una zona de inhibición completa cercana al sensi-disco que contiene el o compuestos prueba. La segunda zona la encontramos alejándonos más del disco, correspondiendo a una zona de inhibición parcial del crecimiento del organismo prueba se esquematiza en las zonas de crecimiento demorado y parcialmente inhibido. Una tercera zona se aprecia al observarse el crecimiento normal del organismo prueba, el cuál puede ser estimulado por el crecimiento de la bacteria el cual hace que los compuestos del medio se difundan hacia esa zona donde los compuestos se encuentran en concentraciones menores que las presentes cercanas al disco.

Se utilizó como control un antibiótico de amplio espectro, 20 μg de ampicilina. Las bacterias se inocularon en las cajas petri a partir de la solución estandarizada tomando un mililitro de inóculo para cada una de las cajas. Se midieron los halos de inhibición mediante una regla también se determinó si la actividad que presentaba dicho halo era bactericida o bacteriostática.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS PRUEBAS

Para determinar si los factores empleados (concentración y extracto) influyen en nuestras variables de respuesta (diámetro y actividad biológica). Las pruebas estadísticas realizadas fueron ANOVA (de uno y dos factores) y tablas de contingencia, esta última prueba estadística se utilizó para analizar los datos obtenidos del tipo de actividad que presentaban los extractos (datos discretos). Para todos los análisis de ANOVA se realizaron la prueba de Tukey mostrándose solamente cuando las diferencias encontradas son significativas. El análisis de ANOVA se desarrolló en el programa SPSS 9.0 para Windows y las tablas de contingencia según Zar, (1996).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

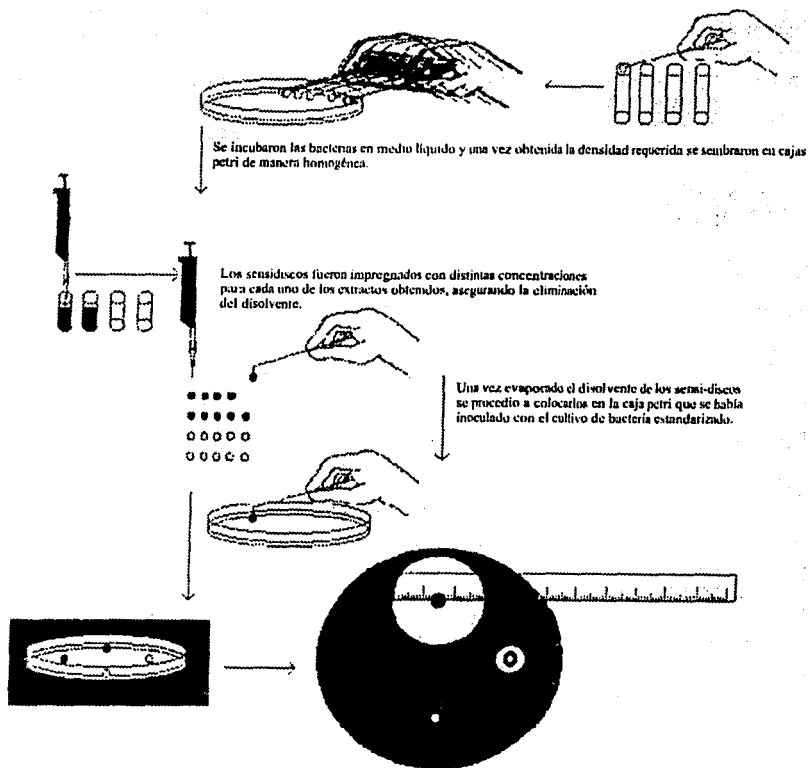


Figura 5. Método utilizado para la impregnación de los sensi-discos y el bioensayo con cada una de las bacterias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIOENSAYO CON *Artemia salina*.

ECLOSIÓN DE Artemia salina.

Se preparo en un frasco ámbar agua marina y se agregó una porción de quistes de *Artemia salina*, se coloco en un baño con agitación constante, incubándose a 30° C por un periodo de 48 h para la eclosión de la artemia.

MONTAJE DEL BIOENSAYO

Se prepararon distintas concentraciones de cada uno de los extractos (10 ppm, 100 ppm y 1000 ppm; Duran-Murillo (1991)) en agua marina (Concepcion *et al.* 2001, y Meyer *et al.*, 1982;) figura 7. En un tubo de ensaye con 10 ml de cada una de las soluciones preparadas a diferente concentración de extracto, se colocaron 10 individuos de *Artemia salina*. El ensayo se realizó por quintuplicado. Transcurridas 24 h se registró la mortandad de la artemia en cada tubo, el testigo consistió de agua marina únicamente.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A partir de los resultados obtenidos en el bioensayo se realizó el análisis Probit con la mortandad de *Artemia salina* para la determinación de la dosis letal media (LD₅₀). Se utilizó el programa SPSS para Windows versión 9.0 para dicho análisis.

El análisis de *Artemia salina* consistió de una muestra de 800 artemias. Con éste tamaño de muestra se justifica la realización de un análisis de ANOVA (Zar, 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los quistes de *Artemia salina* se colocaron en un frasco ambar el cual se colocó a 30°C en agitación constante.



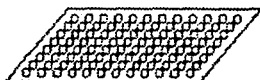
Se dejó por un periodo de 48 h para la eclosión de los quistes.



Para el bioensayo se colocaron en cada tubo 10 artemias además de agregar una gota de levadura al 1% para su alimentación.

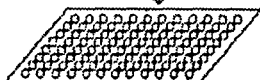


Se agregaron cada uno de los extractos obtenidos en los tubos. Las concentraciones empleadas fueron: 10, 100 y 1000 ppm.



Cada extracto empleado se realizó por quintuplicado para cada una de las concentraciones empleadas.

Se cuantificó la sobrevivencia de las artemias después de 24 h.



Cuantificación de las artemias vivas y las muertas.

Artemias muertas



Artemias vivas

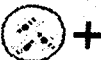


Figura 7. Eclosión y montaje del bioensayo de *Artemia salina*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

EXTRACCIÓN SELECTIVA Y ACUOSA

Una vez que se eliminaron los disolventes de los extractos, se pesaron y se obtuvieron los rendimientos. Del extracto hexánico se obtuvieron 0.2781 g, del extracto de acetato de etilo se obtuvieron 0.3497 g, del extracto metanólico se obtuvieron 7.4757 g y del extracto acuoso se obtuvieron 8.3 g de extracto. Con ello se calculó el rendimiento de cada uno de los extractos que se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Muestra de rendimiento de cada extracto.

<i>Extracción</i>	<i>Peso obtenido en g</i>	<i>Rendimiento en %</i>
Hexánica	0.2781g	.813%
Acetato de etilo	0.3497g	1.02%
Metanólica	7.4757g	21.858%
Acuosa	8.3g	24.27%

PRUEBAS COLORIMÉTRICAS Y DE PRECIPITACIÓN

Se observan los resultados obtenidos de las pruebas colorimétricas y de precipitación para los cuatro extractos utilizados en las pruebas de actividad biológica (tabla 4).

Pruebas colorimétricas y de precipitación

Grupo de metabolitos secundarios		Terpenos y Esteroides	Flavonoides	Glucosidos	Alcaloides	
Reactivo o prueba		Liebermann-Buchard	Shinoda	Mölish	Ác. silico	Dragendorff
E x t r a c t o s	Hexánico	verde +++	negativo	negativo	negativo	negativo
	AcOEt	verde +++	negativo	negativo	+	ligeramente positivo
	MeOH	negativo	ligeramente positivo	negativo	-----	negativo
	Acuoso	rosa +	+	negativo	-----	negativo

Tabla 4. Pruebas colorimétricas y de precipitación para cada uno de los extractos empleados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para el extracto hexánico se aprecia que son terpenos los que se obtuvieron, éstos también se presentan en el extracto de acetato de etilo pero en menor intensidad, el extracto de acetato de etilo presenta a su vez alcaloides. En el extracto metanólico se obtuvieron flavonoides con una intensidad apenas perceptible. Para el extracto acuoso la prueba resulto ser positiva para esteroides así como para flavonoides.

Se observó la intensidad de la reacción y se asignaron valores de +, ++, +++ y ++++ cruces para las pruebas que fueron positivas y negativa para aquellas en las que no se observó la reacción. Los --- indican que la prueba no se realizó.

PERFILES CROMATOGRÁFICOS

Los perfiles cromatográficos se desarrollaron con mezclas de eluyentes tratando de abarcar desde una polaridad baja hasta una polaridad alta, agrupándose las placas en tres grupos, los cuales se definen de acuerdo a su polaridad, teniendo los eluyentes de "baja polaridad" (tabla 5), "mediana polaridad" (tabla 6) y los de "alta polaridad" (tabla 7). El extracto hexánico sólo se desarrollo en el grupo de eluyentes de baja polaridad debido a la cantidad del extracto obtenido.

Sistema de elución	Extractos (número de manchas obtenidas)			
	Hexánico	Acetato de etilo	Metanólico	Acuoso
Hexano 100%	4	1	0	0
Hexano-Acetato de etilo 8:2	7	7	3	0
Hexano-Acetato de etilo 6:4	5	6	3	0
Hexano-Acetato de etilo 4:6	7	8	3	0
Hexano-Acetato de etilo 2:8	5	7	3	0
Acetato de etilo 100%	2	5	3	0

Tabla 5. Sistema de eluyentes de baja polaridad (no polares). Se muestra las mezclas de eluyentes empleadas en el desarrollo de las placas, los extractos que se probaron en dicho sistema así como el número de manchas obtenidas.

Sistema de elución	Extractos (número de manchas obtenidas)		
	Acetato de etilo	Metanólico	Acuoso
Cloroformo 100%	3	1	0
Cloroformo-Metanol 9:1	3	1	0
Cloroformo-Metanol 7:3	2	3	1
Cloroformo-Metanol 6:4	2	5	2
Cloroformo-Metanol 5:5	2	4	2
Cloroformo-Metanol 3:7	3	4	3
Metanol 100%	2	4	2

Tabla 6. Sistema de eluyentes de mediana polaridad. Se muestra las mezclas de eluyentes empleadas en el desarrollo de las placas, los extractos que se probaron en dicho sistema así como el número de manchas obtenidas.

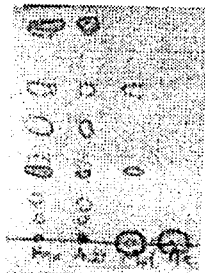
Sistema de elución	Extractos (número de manchas obtenidas)		
	Acetato de etilo	Metanólico	Acuoso
Metanol-Agua 8:2	2	4	3
Metanol-Agua 7:3	2	2	2
Metanol-Agua 5:5	1	2	2
Butanol-Ac. acético-Agua 4:1:1	3	3	2
Butanol-Ac. acético-Agua 5:1:4	6	4	5

Tabla 7. Sistema de eluyentes de alta polaridad. Se muestra las mezclas de eluyentes empleadas en el desarrollo de las placas, los extractos que se probaron en dicho sistema así como el número de manchas obtenidas.

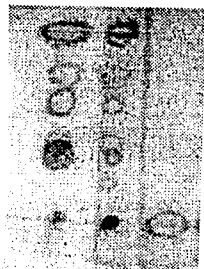
Las figuras 8, 9 y 10 corresponden a los grupos de eluyentes de baja, mediana y alta polaridad (respectivamente).



A



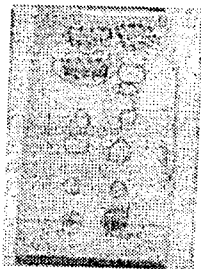
B



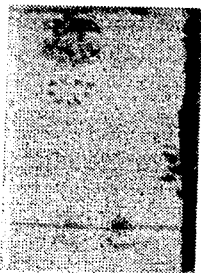
C



D

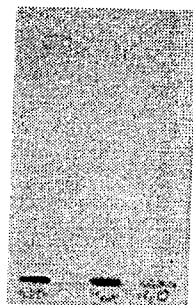


E



F

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



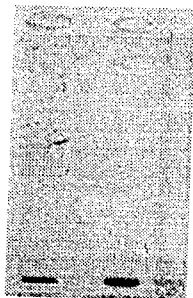
A'



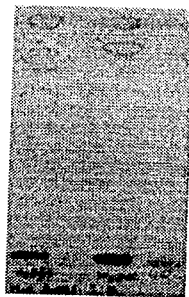
B'



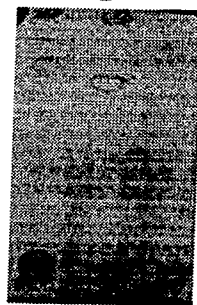
C'



D'



E'



F'

Figura 8. Placas desarrolladas con un sistema de elusión hexano - acetato de etilo a distintas proporciones. A y A' Hex 100%. B y B' Hex- AcOEt 8:2. C y C' Hex- AcOEt 6:4. D y D' Hex- AcOEt 4:6. E y E' Hex- AcOEt 2:8. F y F' AcOEt 100%.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

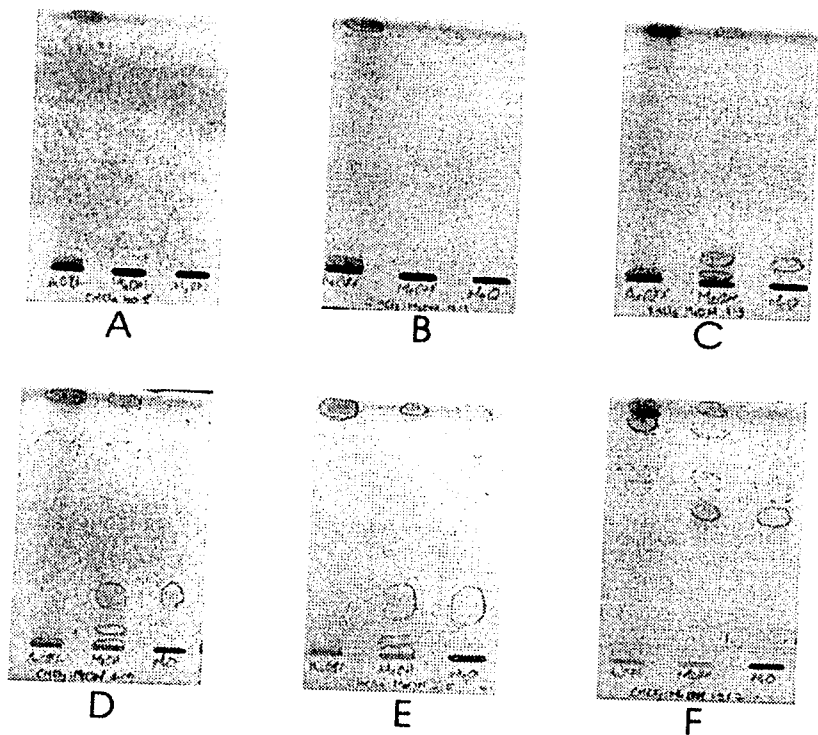


Figura 9. Placas desarrolladas con CHCl_3 -MeOH a distintas proporciones. A CHCl_3 100%. B CHCl_3 -MeOH 9:1. C CHCl_3 -MeOH 7:3. D CHCl_3 -MeOH 6:4. E CHCl_3 -MeOH 5:5. F CHCl_3 -MeOH 3:7.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

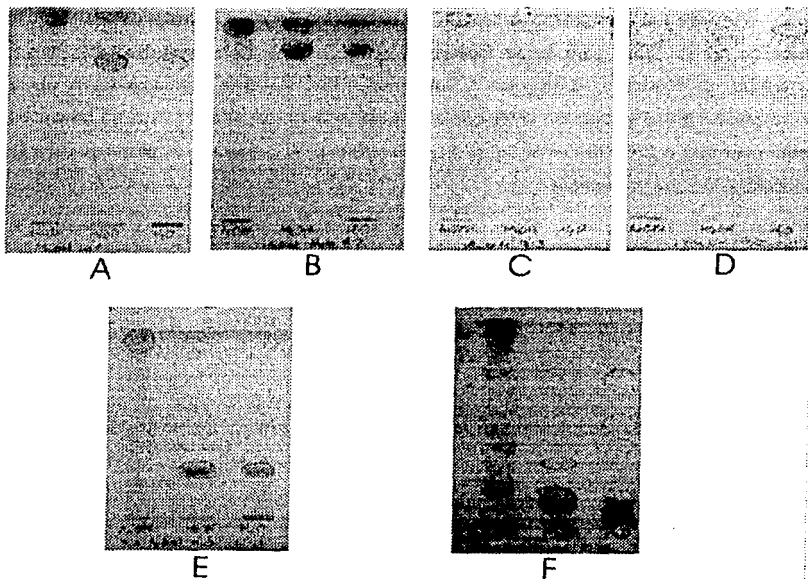


Figura 10. Placas desarrolladas con: MeOH- H₂O. **A** MeOH 100%. **B** MeOH- H₂O 8:2. **C** MeOH- H₂O 7:3. **D** MeOH- H₂O 5:5. **E** Butanol-Ác. acético- Agua 4: 1: 1. **F** Butanol-Ác. acético- Agua 5: 1: 4.

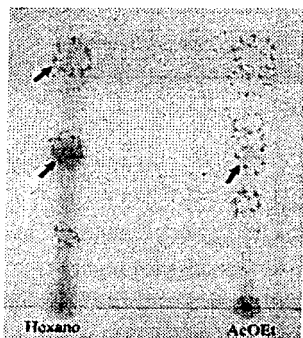


Figura 11. Placa revelada con Lieberman- Buchard.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otro lado los extractos hexánico y de acetato de etilo se desarrollaron en una placa de gel de sílice para luego asperjarles el reactivo de Lieberman-Buchard y así determinar la presencia de terpenos y esteroides. Las manchas obtenidas en la placa corresponden a una coloración verde que es indicativo de terpenos en el extracto las cuales están marcadas con flechas en la figura 11, la intensidad de la mancha es proporcional a la concentración que se presenta.

BIOENSAYOS CON LAS BACTERIAS

PRUEBAS PRELIMINARES

Los resultados obtenidos en la prueba preliminar fueron los siguientes (indicando sólo si existe halo o no):

Extracto hexánico			
Bacteria	[50 µg]	[100 µg]	[160 µg]
<i>Escherichia coli</i>	si	si	si
<i>Bacillus cereus</i>	si	si	si
<i>Bacillus subtilis</i>	si	si	si

Extracto AcOEt			
Bacteria	[50 µg]	[100 µg]	[160 µg]
<i>Escherichia coli</i>	si	si	si
<i>Bacillus cereus</i>	si	si	si
<i>Bacillus subtilis</i>	si	si	si

Extracto MeOH			
Bacteria	[50 µg]	[100 µg]	[160 µg]
<i>Escherichia coli</i>	no	si	si
<i>Bacillus cereus</i>	si	si	si
<i>Bacillus subtilis</i>	no	no	si

Extracto Acuoso			
Bacteria	[50 µg]	[100 µg]	[160 µg]
<i>Escherichia coli</i>	si	si	si
<i>Bacillus cereus</i>	si	si	si
<i>Bacillus subtilis</i>	no	no	si

Los halos observados mostraron diferencias entre ellos siendo unos totalmente claros en donde suponemos la muerte de la bacteria (bactericida) y otros que tuvieron menor densidad celular que el resto de la caja (bacteriostático).

BIOENSAYOS CON LA BACTERIA *Escherichia coli*

De la prueba realizada con la bacteria se obtuvieron los siguientes resultados, los datos presentados en las tablas indican el diámetro de inhibición obtenido por cada extracto así como los halos bactericidas (marcados por un asterisco) y los bacteriostáticos (los cuales no presentan marca):



Escherichia coli

Extracto Hexánico				Extracto AcOEt			
Caja	[50 µg]	[100 µg]	[150 µg]	Caja	[50 µg]	[100 µg]	[150 µg]
1	13,5 mm	13,5 mm	16,5 mm*	1	13 mm*	13 mm*	14 mm
2	-----	-----	-----	2	-----	-----	-----
3	-----	-----	-----	3	14,5 mm	13,5 mm	13,5 mm
4	-----	-----	-----	4	-----	-----	-----
5	13,5 mm*	14,5 mm*	14,5 mm*	5	17 mm*	13 mm	13 mm

Extracto Metanólico				Extracto Acuoso			
Caja	[50 µg]	[100 µg]	[150 µg]	Caja	[50 µg]	[100 µg]	[150 µg]
1	13 mm	13 mm	13 mm	1	13,5 mm	13 mm*	13 mm*
2	-----	-----	-----	2	16,5 mm	14,5 mm	13,5 mm*
3	14,5 mm	13 mm	13,5 mm	3	13,5 mm	-----	16,5 mm
4	11,5 mm	-----	-----	4	13,5 mm*	14 mm	14,5 mm
5	14,5 mm	14 mm	15,5 mm	5	-----	-----	-----

En *Escherichia coli* el extracto hexánico presenta un efecto bactericida, mientras que en los extractos de acetato de etilo, metanólico y acuoso presentan principalmente un efecto bacteriostático.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

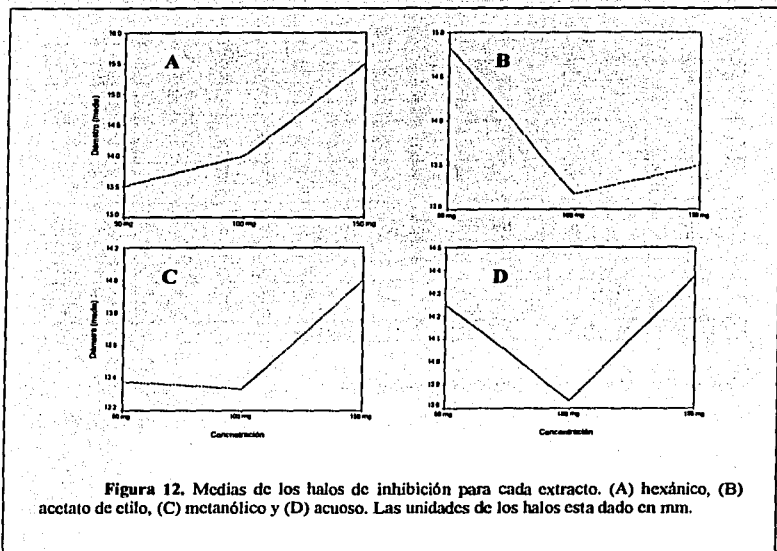
Los análisis de varianza realizados con el factor "concentración" en la variable dependiente "diámetro del halos de inhibición" se presentan en la tabla 8.

Extracto	Significancia
Hexánico	.221
Acetato de Etilo	.280
Metanólico	.754
Acuoso	.871

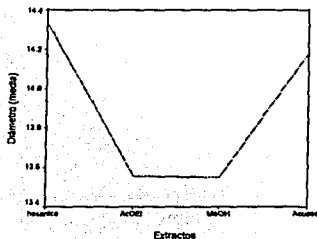
Tabla 8. Valores de significancia para cada extracto.

En la figura 12 se presenta la media de los halos de inhibición obtenidos para cada concentración empleada de cada uno de los extractos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Al utilizar como factor “extracto” (el tipo de extracto empleado en el bioensayo), en la variable dependiente el diámetro del halo de inhibición se obtuvo 0.302 de significancia. En la gráfica 3 se aprecia que el extracto que presenta el halo con un diámetro mayor es el extracto hexánico.



Gráfica 3. Media de los halos de inhibición de cada uno de los extractos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La susceptibilidad de *E. coli* no responde al tipo de extracto empleado, sin embargo para determinar si los factores concentración y tipo de extracto afectan de manera conjunta la susceptibilidad se realizó la ANOVA correspondiente teniendo como resultado la siguiente tabla:

Factores	Tipo III Suma de cuadrados	grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Sig.
Corrected Model	11.063 ^a	11	1.006	.829	.614
Intercept	6549.026	1	6549.026	5396.622	.000
CONCENTR	3.462	2	1.731	1.426	.260
EXTRACTO	3.928	3	1.309	1.079	.377
CONCENTR * EXTRACTO	4.075	6	.679	.560	.758
Error	29.125	24	1.214		
Total	6970.750	36			
Corrected Total	40.188	35			

a. R cuadrada = .275 (Ajuste de la R cuadrada = -.057)

Se observa que no hay diferencias significativas en lo que son los dos factores (por separado) así como la interacción de ambos en la susceptibilidad de *E. coli*.

Para analizar la variable "actividad biológica" se utilizaron las tablas de contingencia bidimensionales y tridimensionales de las cuales se obtuvo que, en el análisis bidimensional utilizando la concentración como factor que influye a la actividad biológica muestra que ésta no es dependiente de la concentración empleada, caso contrario al analizar la actividad biológica en función del tipo de extracto (ver tablas de contingencia bi- y tri-dimensionales del apéndice B).

BIOENSAYO CON LA BACTERIA *Bacillus subtilis*

Los halos de inhibición obtenidos del bioensayo se diferencian en función de la actividad presentada, ya sea bactericida o bacteriostática.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Bacillus subtilis

Extracto Héxanico				Extracto Aco Et			
Caja	[50 µg]	[100 µg]	[150 µg]	Caja	[50 µg]	[100 µg]	[150 µg]
1	13,5mm	14,5mm	13,5mm*	1	13mm*	13mm*	13,5mm*
2	14,5mm	13mm*	13mm*	2	13mm*	13mm*	13mm*
3	13mm*	14,5mm	13mm*	3	13mm*	13,5mm*	13,5mm*
4	13,5mm*	13,5mm*	13,5mm	4	13mm*	13mm*	13,5mm*
5	13mm*	13,5mm*	13mm*	5	13mm*	13,5mm*	13,5mm*

Extracto Metanólico				Extracto Acuoso			
Caja	[50 µg]	[100 µg]	[150 µg]	Caja	[50 µg]	[100 µg]	[150 µg]
1	15,5mm	13mm*	13mm*	1	15,5mm	13mm*	13mm*
2	13mm*	13,5mm*	15,5mm	2	15,5mm	13mm*	13,5mm*
3	13,5mm*	13mm*	15,5mm	3	13,5mm	13mm*	13,5mm*
4	16,5mm	13mm*	13mm*	4	14,5mm*	14,5mm*	13,5mm

Bactericida (marcado con asterisco)

Bacteriostático (sin marca)

Con *Bacillus subtilis*, en los diferentes extractos a las diferentes concentraciones se observó principalmente un efecto bactericida.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los resultados de la ANOVA de una vía se muestran en la tabla 9. El factor que se evaluó fue la concentración empleada en nuestra variable dependiente "diámetro del halo de inhibición". Para los extractos acetato de etilo y acuoso se realizó la prueba de Tukey las cuales se presentan en las tablas 10 y 11 respectivamente.

Extracto	Significancia
Hexánico	.380
Acetato de etilo	.029
Metanólico	.874
Acuoso	.003

Tabla 9. Valores de significancia para cada uno de los extractos

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error estandar	Sig.	Intervalo de confianza del 95%	
					Límite inferior	Límite superior
50 mg (baja)	100 mg	-.2000	.1291	.304	-.5444	.1444
	150 mg	-.4000*	.1291	.023	-.7444	-.556E-02
100 mg (media)	50 mg	.2000	.1291	.304	-.1444	.5444
	150 mg	-.2000	.1291	.304	-.5444	.1444
150 mg (alta)	50 mg	.4000*	.1291	.023	5.558E-02	.7444
	100 mg	.2000	.1291	.304	-.1444	.5444

*. La diferencia es significativa a valores menores a .05

Tabla 10. Prueba de Tukey del extracto acetato de etilo.

Para la prueba de Tukey del extracto de acetato de etilo se obtiene que las diferencias significativas son en la concentración alta con respecto a la baja.

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error estandar	Sig.	Intervalo de confianza del 95%	
					Límite inferior	Límite superior
50 mg (baja)	100 mg	1.6000*	.4203	.007	.4786	2.7214
	150 mg	1.6000*	.4203	.007	.4786	2.7214
100 mg (media)	50 mg	-1.6000*	.4203	.007	-2.7214	-.4786
	150 mg	.0000	.4203	1.000	-1.1214	1.1214
150 mg (alta)	50 mg	-1.6000*	.4203	.007	-2.7214	-.4786
	100 mg	.0000	.4203	1.000	-1.1214	1.1214

*. La diferencia es significativa a valores menores de .05

Tabla 11. Prueba de Tukey del extracto acuoso.

La prueba de Tukey del extracto acuoso, muestra que las diferencias se presentan entre las concentraciones alta y media con respecto a la baja pero entre media y alta no. El patrón de los extractos se reporta en la figura 13, donde se aprecia una disparidad en la respuesta del halo de inhibición obtenida conforme se aumenta la concentración. Tomando como factor el extracto (el tipo de extracto empleado en el bioensayo) para determinar si influye en el halo de inhibición de *B. subtilis* se obtuvo un valor de p de 0.143. La gráfica 4 muestra que el extracto acuoso presentó el diámetro de inhibición mayor en el bioensayo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

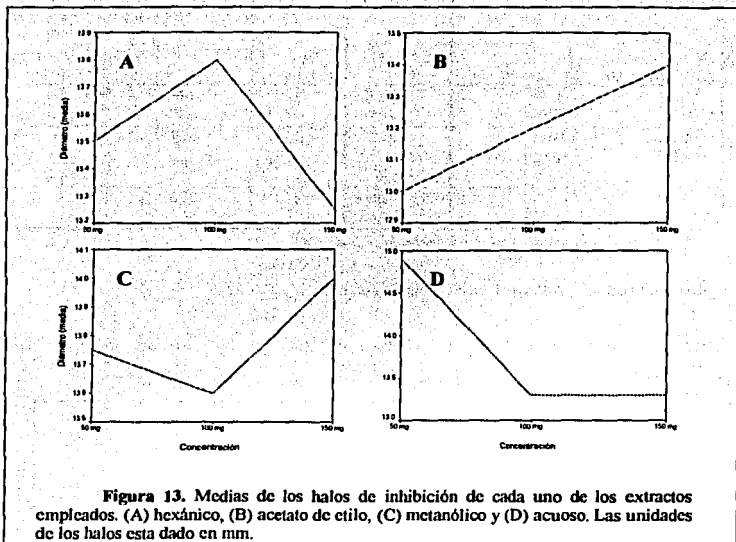
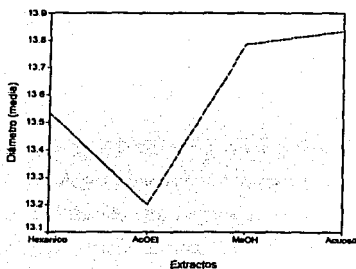


Figura 13. Medias de los halos de inhibición de cada uno de los extractos empleados. (A) hexánico, (B) acetato de etilo, (C) metanólico y (D) acuoso. Las unidades de los halos esta dado en mm.



Gráfica 4. Media de los halos de inhibición de cada uno de los extractos.

TESIS COM
FALLA DE EN

En la ANOVA de dos vías el valor de p de la interacción de los dos factores (extracto y concentración) es de 0.030 indicándonos que la susceptibilidad de *B. subtilis* esta influida por la interacción que se presenta de la concentración del extracto y el tipo de extracto.

En los resultados obtenidos en las tablas de contingencia tridimensionales y bidimensionales se obtuvo que el tipo de actividad es independiente de la concentración y del extracto.

BIOENSAYO CON LA BACTERIA Bacillus cereus

Los resultados del bioensayo se desglosan a continuación:

<i>Bacillus cereus</i>							
Extracto Hexánico			Extracto Aco Et				
Caja	[50 µg]	[100 µg]	[150 µg]	Caja	[50 µg]	[100 µg]	[150 µg]
1	_____	19 mm	15 mm	1	15 mm	15 mm	15 mm*
2	17 mm	15 mm	14 mm	2	18 mm	19 mm	22 mm
3	13 mm	16 mm	17 mm	3	18 mm	17 mm	18 mm
4	18 mm	15 mm*	15 mm*	4	_____	_____	_____
5	18 mm	17 mm	15 mm	5	_____	_____	_____

Extracto Metanólico			Extracto Acuoso				
Caja	[50 µg]	[100 µg]	[150 µg]	Caja	[50 µg]	[100 µg]	[150 µg]
1	17 mm	15 mm*	27 mm*	1	_____	20 mm*	20 mm*
2	14 mm*	18 mm*	15 mm*	2	_____	17 mm	19 mm
3	20 mm*	17 mm*	15 mm*	3	19 mm	19 mm	19 mm
4	_____	_____	_____	4	20 mm*	_____	30 mm*

Bactericida (marcado con asterisco)

Bacteriostático (sin marca)

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para *Bacillus cereus* se realizaron los análisis de ANOVA de cada uno de los extractos para determinar si la concentración es un factor que afecte el diámetro obtenido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(susceptibilidad de la bacteria frente a las concentraciones a las que se le somete), los resultados se presentan en la tabla 12.

Extractos	Significancia
Hexánico	0.460
Acetato de etilo	0.630
Metanólico	0.793
Acuoso	0.539

Tabla 12. Resultados de la prueba de ANOVA de la concentración de cada uno de los extractos.

El patrón que se encuentra para cada uno de los extractos se muestra en la figura 14, observándose un patrón ascendente en los casos de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico.

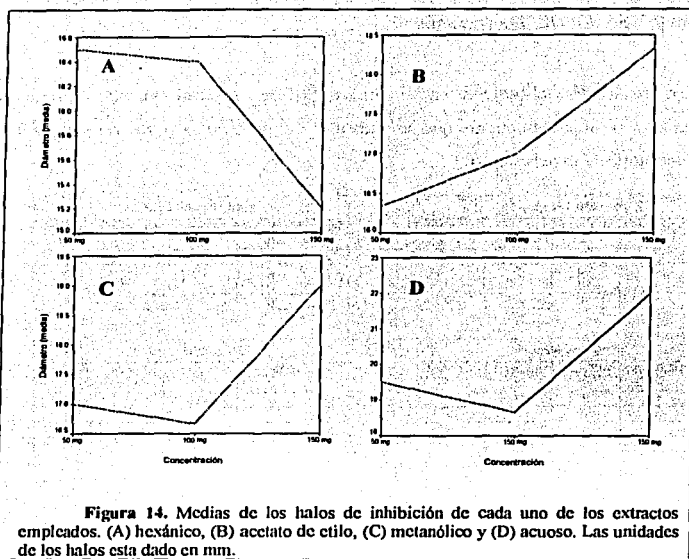
Los tipos de extractos utilizados en el bioensayo se analizaron para determinar si alguno de éstos presentaba diferencias significativas, teniendo como resultado un valor de 0.015. La prueba de Tukey se muestra a continuación:

(I) Extracto	(J) Extracto	Diferencia de Medias (I-J)	Error estandar	Sig.	Intervalo de confianza del 95 %	
					Límite inferior	Límite superior
Hexánico	AcOEt	-1.2222	1.2600	.767	-4.6112	2.1668
	MeOH	-1.5556	1.2600	.609	-4.9446	1.8334
	Acuoso	-4.3333*	1.2600	.008	-7.7223	-.9443
AcOEt	Hexánico	1.2222	1.2600	.767	-2.1668	4.6112
	MeOH	-.3333	1.3902	.995	-4.0726	3.4059
	Acuoso	-3.1111	1.3902	.132	-6.8504	.6282
MeOH	Hexánico	1.5556	1.2600	.609	-1.8334	4.9446
	AcOEt	.3333	1.3902	.995	-3.4059	4.0726
	Acuoso	-2.7778	1.3902	.207	-6.5170	.9615
Acuoso	Hexánico	4.3333*	1.2600	.008	.9443	7.7223
	AcOEt	3.1111	1.3902	.132	-.6282	6.8504
	MeOH	2.7778	1.3902	.207	-.9615	6.5170

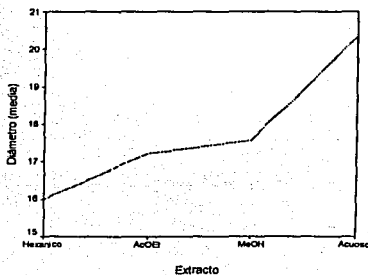
*. La diferencia es significativa a valores menores a .05

Las diferencias que se presentan entre los extractos son significativas, mostrándonos con la prueba de Tukey que los extractos que presentan diferencias son el hexánico y el acuoso, en la gráfica 5 se observa que dichos extractos son los que presentan la media de halos de inhibición más baja y más alta respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Realizando la ANOVA de dos factores (concentración y tipo de extracto) para determinar si se presenta un sinergismo se obtuvo que las diferencias no son significativas, sin embargo al realizar los análisis de la actividad biológica en tablas de contingencia se presenta que la actividad es dependiente del extracto utilizado en la prueba (ver apéndice B).



Gráfica 5. Medias de los halos de inhibición de los cuatro extractos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIOENSAYO DE *Artemia salina*.

Los resultados obtenidos en el bioensayo de *Artemia salina* se muestran a continuación, y teniendo en cuenta que la lectura de sobrevivencia se llevo a cabo a las 24 h de haber montado el experimento.

Extracto Hexánico				
Tubo	1000 ppm	100 ppm	10 ppm	control
1	1	8	10	10
2	2	5	9	10
3	0	10	9	10
4	0	10	10	10
5	0	8	9	9

Extracto AcOEt				
Tubo	1000 ppm	100 ppm	10 ppm	control
1	0	0	4	10
2	0	1	8	7
3	0	2	8	9
4	0	0	8	10
5	0	1	5	8

Extracto MeOH				
Tubo	1000 ppm	100 ppm	10 ppm	control
1	8	6	8	7
2	7	7	8	8
3	6	8	10	9
4	8	8	8	9
5	4	5	8	9

Extracto Acuoso				
Tubo	1000 ppm	100 ppm	10 ppm	control
1	0	2	3	7
2	0	0	4	9
3	0	0	5	7
4	0	5	2	8
5	1	8	6	6

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizó el ANOVA para cada uno de los extractos empleados, el resultado se presenta en las siguientes tablas:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANOVA de una vía

Factor: concentración Variable dependiente: sobrevivencia

Extracto Hexánico

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Sig.
Entre grupos	280.000	3	93.333	67.879	.000
Dentro de grupos	22.000	16	1.375		
Total	302.000	19			

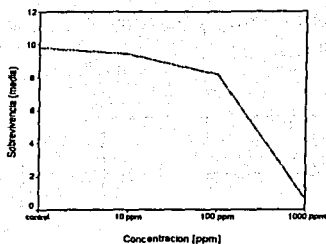
Para poder determinar cuales concentraciones son las que influyen en la mortandad de *Artemia salina* se realizaron para cada ANOVA la prueba de Tukey encontrando que para las concentraciones empleadas con el extracto hexánico muestran que las diferencias significativas en las concentraciones aplicadas se observan entre las concentración de 1000 ppm y la de 100 ppm (valor de "p" =0.0) y la de 1000 ppm y la de 10 ppm (valor de "p" =0.0). Esto nos indica que el factor de concentración que afecta a la sobrevivencia de la *Artemia salina* es la concentración de 1000 ppm y no las concentraciones más bajas, las cuales con respecto al control no presentan diferencias significativas (gráfica 6).

Prueba de Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de Medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza del 95%	
					Límite inferior	Límite superior
control	10 ppm	.40	.74	.948	-1.72	2.52
	100 ppm	1.60	.74	.178	-.52	3.72
	1000 ppm	9.20*	.74	.000	7.08	11.32
10 ppm	control	-.40	.74	.948	-2.52	1.72
	100 ppm	1.20	.74	.397	-.92	3.32
	1000 ppm	8.80*	.74	.000	6.68	10.92
100 ppm	control	-1.60	.74	.178	-3.72	.52
	10 ppm	-1.20	.74	.397	-3.32	.92
	1000 ppm	7.60*	.74	.000	5.48	9.72
1000 ppm	control	-9.20*	.74	.000	-11.32	-7.08
	10 ppm	-8.80*	.74	.000	-10.92	-6.68
	100 ppm	-7.60*	.74	.000	-9.72	-5.48

*. Las diferencias son significativas a valores menores del .05.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



Gráfica 5. Medias de la mortalidad de la artemia a las diferentes concentraciones empleadas

Extracto *AcOEt*

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Sig.
Entre grupos	270.550	3	90.183	64.417	.000
Dentro de grupos	22.400	16	1.400		
Total	292.950	19			

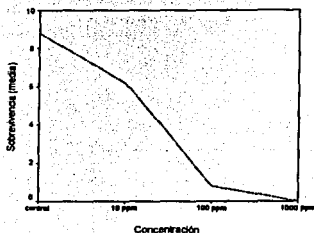
Prueba de Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de Medias (I-J)	Error estandar	Sig.	Intervalo de Confianza del 95%	
					Límite inferior	Límite superior
control	10 ppm	2.60*	.75	.015	.46	4.74
	100 ppm	8.00*	.75	.000	5.86	10.14
	1000 ppm	8.80*	.75	.000	6.66	10.94
10 ppm	control	-2.60*	.75	.015	-4.74	-.46
	100 ppm	5.40*	.75	.000	3.26	7.54
	1000 ppm	6.20*	.75	.000	4.06	8.34
100 ppm	control	-8.00*	.75	.000	-10.14	-5.86
	10 ppm	-5.40*	.75	.000	-7.54	-3.26
	1000 ppm	.80	.75	.713	-1.34	2.94
1000 ppm	control	-8.80*	.75	.000	-10.94	-6.66
	10 ppm	-6.20*	.75	.000	-8.34	-4.06
	100 ppm	-.80	.75	.713	-2.94	1.34

*. Las diferencias son significativas a valores menores del .05.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

La prueba de Tukey se indica que las concentraciones empleadas del extracto de AcOEt las que presentan diferencias significativas entre la de 10 ppm y 100 ppm, y 10 ppm y 1000 ppm sin que se presente una diferencia significativa entre las concentraciones de 100 ppm y 1000 ppm. Con respecto al control todas las concentraciones presentan diferencias significativas (gráfica 7).



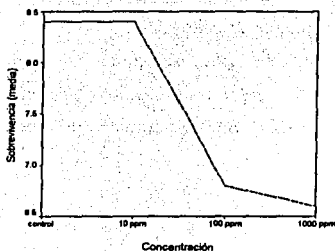
Gráfica 7. Medias de la mortalidad de la artemia a las diferentes concentraciones empleadas.

Extracto MeOH

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Sig.
Entre grupos	14.550	3	4.850	3.180	.053
Dentro de grupos	24.400	16	1.525		
Total	38.950	19			

Para los análisis de ANOVA de una vía se obtuvo que el extracto metanólico a las concentraciones empleadas no muestran diferencias significativas en la mortalidad de *Artemia salina* (gráfica 8), opuesto a lo encontrado en las concentraciones empleadas de los extractos hexánico y acetato de etilo.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN



Gráfica 8. Medias de la mortandad de la artemia a las diferentes concentraciones empleadas.

Extracto Acuoso

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de cuadrados	F	Sig.
Entre grupos	139.600	3	46.533	11.781	.000
Dentro de grupos	63.200	16	3.950		
Total	202.800	19			

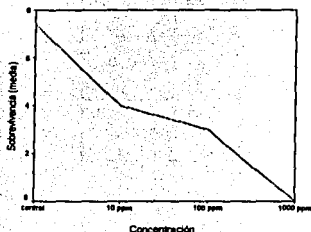
Prueba de Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de Medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza del 95%	
					Límite inferior	Límite superior
control	10 ppm	3.40	1.26	.067	-.20	7.00
	100 ppm	4.40*	1.26	.014	.80	8.00
	1000 ppm	7.40*	1.26	.000	3.80	11.00
10 ppm	control	-3.40	1.26	.067	-7.00	.20
	100 ppm	1.00	1.26	.855	-2.60	4.60
	1000 ppm	4.00*	1.26	.027	.40	7.60
100 ppm	control	-4.40*	1.26	.014	-8.00	-.80
	10 ppm	-1.00	1.26	.855	-4.60	2.60
	1000 ppm	3.00	1.26	.120	-.60	6.60
1000 ppm	control	-7.40*	1.26	.000	-11.00	-3.80
	10 ppm	-4.00*	1.26	.027	-7.60	-.40
	100 ppm	-3.00	1.26	.120	-6.60	.60

*. Las diferencias son significativas a valores menores del .05.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

En las concentraciones empleadas con el extracto Acuoso con la prueba de Tukey se estimó que las concentraciones que presentan diferencias significativas son entre la concentración de 10 ppm y la de 1000 ppm sin que las concentraciones de 10 ppm y las de 100 ppm presenten diferencias significativas (gráfica 9). Así mismo el control y la concentración de 10 ppm no presentan diferencias significativas pero entre las concentraciones de 100 ppm y 1000 ppm sí existen diferencias.



Gráfica 9. Medias de la mortandad de la artemia a las diferentes concentraciones empleadas.

ANOVA de una vía

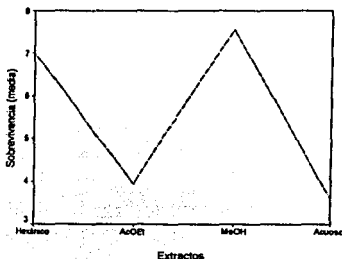
Factor: extractos **Variable dependiente:** supervivencia

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Sig.
Entre grupos	249.250	3	83.083	7.547	.000
Dentro de grupos	836.700	76	11.009		
Total	1085.950	79			

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Prueba de Tukey

(I) Extractos	(J) Extractos	Diferencia de Medias (I-J)	Error estandar	Sig.	Intervalo de confianza del 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Hexánico	AcOEt	3.05	1.05	.024	.29	5.81
	MeOH	-.55	1.05	.953	-3.31	2.21
	Acuoso	3.40	1.05	.009	.64	6.16
AcOEt	Hexánico	-3.05	1.05	.024	-5.81	-.29
	MeOH	-3.60	1.05	.005	-6.36	-.84
	Acuoso	.35	1.05	.987	-2.41	3.11
MeOH	Hexánico	.55	1.05	.953	-2.21	3.31
	AcOEt	3.60	1.05	.005	.84	6.36
	Acuoso	3.95	1.05	.002	1.19	6.71
Acuoso	Hexánico	-3.40	1.05	.009	-6.16	-.64
	AcOEt	-.35	1.05	.987	-3.11	2.41
	MeOH	-3.95	1.05	.002	-6.71	-1.19



Gráfica 10. Medias de la mortandad de la artemia a las diferentes concentraciones empleadas.

En la prueba de Tukey los tipos de extracto que presentan diferencias significativas son el extracto hexánico con el extracto de acetato de etilo y el acuoso, esto se ve representado en la gráfica 10 dónde se aprecia que los extractos con decremento en la sobrevivencia son los extractos de acetato de etilo y el acuoso.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

ANOVA de dos vías

Factores: concentración y extracto Variable dependiente: sobrevivancia

Source	Tipo III Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F	Sig.
Corrected Model	953.950 ^a	15	63.597	30.835	.000
Intercept	2442.050	1	2442.050	1184.024	.000
CONCENTR	523.750	3	174.583	84.646	.000
EXTRACTO	249.250	3	83.083	40.283	.000
CONCENTR * EXTRACTO	180.950	9	20.106	9.748	.000
Error	132.000	64	2.062		
Total	3528.000	80			
Corrected Total	1085.950	79			

^a. R cuadrada = .878 (ajuste de la R cuadrada = .850)

Pruebas Post Hoc

Factor: Concentración [ppm]

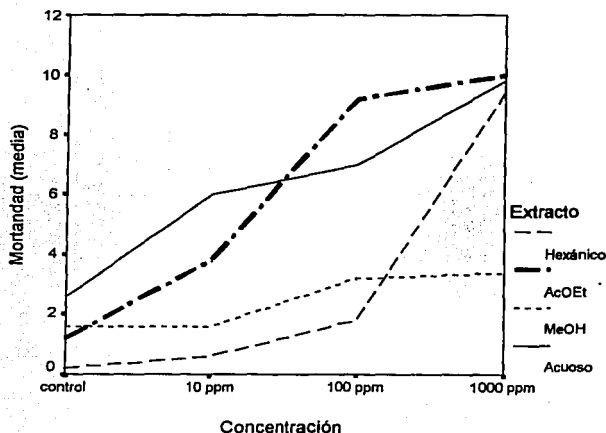
(I) Extractos	(J) Extractos	Diferencia de Medias (I-J)	Error estandar	Sig.	Intervalo de confianza del 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Hexánico	AcOEt	3.05	.45	.000	1.85	4.25
	MeOH	-.55	.45	.622	-1.75	.65
	Acuoso	3.40	.45	.000	2.20	4.60
AcOEt	Hexánico	-3.05	.45	.000	-4.25	-1.85
	MeOH	-3.60	.45	.000	-4.80	-2.40
	Acuoso	.35	.45	.867	-.85	1.55
MeOH	Hexánico	.55	.45	.622	-.65	1.75
	AcOEt	3.60	.45	.000	2.40	4.80
	Acuoso	3.95	.45	.000	2.75	5.15
Acuoso	Hexánico	-3.40	.45	.000	-4.60	-2.20
	AcOEt	-.35	.45	.867	-1.55	.85
	MeOH	-3.95	.45	.000	-5.15	-2.75

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Factor: Extractos

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de Medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza del 95%	
					Límite inferior	Límite superior
control	10 ppm	1.60	.45	.004	.40	2.80
	100 ppm	3.90	.45	.000	2.70	5.10
	1000 ppm	6.80	.45	.000	5.60	8.00
10 ppm	control	-1.80	.45	.004	-2.80	-.40
	100 ppm	2.30	.45	.000	1.10	3.50
	1000 ppm	5.20	.45	.000	4.00	6.40
100 ppm	control	-3.90	.45	.000	-5.10	-2.70
	10 ppm	-2.30	.45	.000	-3.50	-1.10
	1000 ppm	2.90	.45	.000	1.70	4.10
1000 ppm	control	-6.80	.45	.000	-8.00	-5.60
	10 ppm	-5.20	.45	.000	-6.40	-4.00
	100 ppm	-2.90	.45	.000	-4.10	-1.70

Para la ANOVA de dos vías se tiene que el *factor concentración* presenta diferencias significativas, el *factor extracto* presenta a su vez diferencias significativas y la interacción de los factores, indicando con ello que la sobrevivencia de *Artemia salina* se ve afectada por la concentración empleada, el extracto y la interacción que se da entre la concentración y el extracto (gráfica 11).



Gráfica 11.
Curva de dosis respuesta para la prueba de *Artemia salina* con los cuatro distintos extractos a las tres diferentes concentraciones.

Para las tablas de contingencia tridimensionales se obtuvo que las variables empleadas son dependientes entre si (apéndice B), es decir que la sobrevivencia esta siendo influida por la concentración y el tipo de extracto, esto se ve corroborado por la ANOVA de dos vías donde el valor de p reportado para la interacción de las dos variables (concentración y tipo de extracto es de 0.0); en las tablas de contingencia bidimensionales se obtuvo que la sobrevivencia es dependiente de la concentración empleada y también de la concentración.

Con respecto al análisis Probit del extracto hexanico se estimó una DL_{50} de 156.23 ppm, para el extracto acetato de etilo una DL_{50} de 13.50 ppm y el extracto acuoso una DL_{50} de 7.77 ppm teniendo una DL_{50} mayor a 1000 ppm para el extracto metanólico (apéndice C).

DISCUSIÓN

ANÁLISIS QUÍMICO

EXTRACTO HEXÁNICO

En las placas cromatográficas del extracto hexánico se presenta una mancha que se presenta al frente del perfil cromatográfico y que representa la mancha menos polar del extracto, sin embargo esta mancha que fue revelada con sulfato cérico no coincide totalmente con la observada en luz UV de onda corta. Los sistemas de elución que presentan un mayor número de manchas para el extracto hexánico son el hexano- acetato de etilo 8:2 (con 7 manchas) y el hexano- acetato de etilo 4:6 (con 7 manchas). El desarrollo de las manchas menos polares se obtiene en el sistema de elución hexano- acetato de etilo 8:2 sin que se aglomeren las manchas ya obtenidas, al utilizar la mezcla hexano- acetato de etilo 4:6 se obtienen dos manchas más cercanas al punto de aplicación pero se pierde

resolución con las manchas ya obtenidas, por ello se propone como mejor sistema de elución el sistema hexano-acetato de etilo 8:2 para el extracto hexánico.

En las pruebas colorimétricas y de precipitación, el extracto hexánico resultó positivo para la prueba de terpenos y esteroides, presentando la reacción la mayor intensidad de todos los extractos, siendo ésta de color verde. Para los grupos de flavonoides, glucósidos y alcaloides el extracto no presentó reacción positiva (tabla 4).

Para poder determinar cual o cuales manchas eran las que presentaban la reacción a terpenos y esteroides se utilizó en una cromatografía de capa fina el sistema de elución hexano- acetato de etilo 4:6, observándose dos manchas con reacción positiva a la prueba, una de ellas al frente del disolvente siendo ésta tenue y la mancha ubicada al centro de la placa con una intensidad mayor (figura 11). Por intensidad de reacción se puede suponer que la concentración de los compuestos que conforman a las manchas positivas es mayor en la mancha localizada al centro de la placa que la presentada al frente del disolvente.

EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO

Para el extracto de acetato de etilo las pruebas colorimétricas y de precipitación resultaron positiva para terpenos y esteroides así como para alcaloides sin presentar reacción para glucósidos y flavonoides. Para determinar la o las manchas que correspondían a la prueba de terpenos y esteroides se procedió de la misma manera que con el extracto hexánico, desarrollando una placa con el mismo sistema de elución (figura 11). La mancha que resulto positiva a la prueba se ubica al centro de la placa (figura 11).

Al obtener los Rf de las manchas que resultaron positivas de la prueba de terpenos y esteroides (figura 11), en el extracto hexánico las manchas presentan un Rf del 0.914 y 0.571 respectivamente, presentando para el extracto de acetato de etilo un Rf del 0.542. Esto nos permite pensar que las manchas que presentan reacción positiva en los dos extractos se pueden considerar como compuestos distintos.

En los perfiles cromatográficos se observó que al desarrollar la placa en varios sistemas de elución cloroformo-metanol los perfiles no eran adecuados. Al desarrollarse el extracto en eluyentes de alta polaridad (metanol-agua) se llega a presentar un número inferior a los obtenidos en el sistema de elución cloroformo- metanol (placas de la figura 10), sin embargo al desarrollarse en butanol-ác. acético- agua 5:1:4 se obtiene una resolución en la placa de 6 manchas mostrándonos que el extracto se constituye de compuestos de diferente polaridad.

El perfil cromatográfico presentado en las placas desarrolladas en los sistemas de elución hexano- acetato de etilo con mayor definición es el hexano-acetato de etilo 8:2 siendo éste de siete manchas (figura 8). El número máximo de manchas obtenidas en un perfil cromatográfico es por el sistema de elución hexano-acetato de etilo 4:6 con ocho manchas siendo su perfil de baja resolución, aun cuando la resolución de éste no es buena la información obtenida por él complementa el perfil cromatográfico obtenido del sistema de elución hexano-acetato de etilo 8:2.

EXTRACTO METANÓLICO

Para el caso del extracto metanólico el desarrollo del extracto en los sistemas de elución de baja polaridad se obtienen tres manchas a partir de la mezcla hexano-acetato de etilo 8:2, presentando dos manchas visibles a onda corta y una al utilizar sulfato cérico (placas de la B' a la F' de la figura 8). Estas tres manchas se presentan en los siguientes sistemas de elución de baja polaridad "hexano-acetato de etilo 8:2, 6:4, 4:6 y 2:8".

En los sistemas de elución de mediana polaridad, las placas de la figura 9 nos muestran un patrón de manchas bien desarrolladas a partir de la mezcla cloroformo-metanol 6:4 (placa D de la figura 9) siendo ésta misma placa la que presenta el mayor número de manchas obtenidas del extracto de los tres sistemas de elución empleados. Sin embargo aun cuando el sistema muestre el mayor número de manchas estas no se encuentran bien desarrolladas ya que se localizan cercanas al punto de aplicación del extracto (placas de la figura 9). Al continuar incrementando la polaridad de cloroformo-metanol 6:4 a cloroformo

-metanol 4:6, el patrón de manchas se mantiene hasta el perfil cloroformo-metanol 3:7, presentándose dos nuevas manchas que antes no se habían desarrollado siendo visibles a onda corta únicamente sin embargo la resolución que se obtiene del perfil es deficiente, esto nos hace suponer que el extracto en realidad no presenta un máximo de cinco manchas si no de siete y que el sistema de elución que presenta el mejor perfil cromatográfico desarrollado es el cloroformo-metanol 6:4 complementándose con el perfil cromatográfico cloroformo-metanol 3:7.

Las placas desarrolladas en el sistema de elución de alta polaridad llegan a presentar patrones de manchas menores a cinco, sin embargo el desarrollo de dichas manchas la resolución es baja ya que éstas se localizan cercanas al punto de aplicación o al frente del disolvente obteniendo también manchas muy concentradas o solapadas unas con otras (figura 10).

Comparando las placas de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanólico (figuras 8, 9 y 10), se puede pensar que el ó los compuesto(s) que conforman cada una de las manchas son las mismas debido a que presentan patrones muy semejantes en lo que respecta a la distancia recorrida a partir del punto de aplicación, haciéndonos suponer que la extracción no fue muy selectiva sin embargo al tomar como referencia el centro de cada una de las manchas obtenidas en los distintos sistemas de elución probada se logró apreciar las diferentes distancias que cada mancha recorrió y corroborando que los compuestos fueron seleccionados por polaridad en las extracciones y que el desarrollo en las placas fue de acuerdo a la afinidad que llegaban a presentar al eluyente obteniendo con ello manchas que no se llegan a presentar en más de dos extractos.

El resultado obtenido en la pruebas colorimétricas y de precipitación para terpenos y esteroides, glucósidos y alcaloides para el extracto metanólico resultaron negativas y para flavonoides resulto positivo teniendo una intensidad de la reacción muy tenue. Sin embargo al poner de manifiesto la intensidad de reacción de cada una de las pruebas colorimétricas y de precipitación para los tres extractos se llega a apreciar que los extractos con menor

rendimiento en la extracción son los que presentan una intensidad mayor (ver tablas 3 y 4) y considerando que la intensidad de la reacción es una forma indirecta de saber la concentración que presentan cada uno de los grupos de compuestos a los cuales resultado positiva la prueba, podríamos suponer que los extractos con mayor cantidad de compuestos con reacción positiva a las pruebas colorimétricas y de precipitación son el hexánico y el de acetato de etilo y por último el metanólico. Dicho orden no representa o es una propuesta de prioridad para la búsqueda de metabolitos secundarios con alguna posible aplicación o importancia económica ya que esto está en función del objeto de estudio y de la purificación y caracterización de los compuestos que resultaron positivos para dichas pruebas.

EXTRACTO ACUOSO

Al realizar las pruebas para la determinación de los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso se obtuvo que para terpenos y esteroides resultó positivo dando una coloración rosa y una intensidad de reacción baja. Para el caso de flavonoides resultó positivo con una intensidad de reacción baja pero mayor que la presentada por el extracto metanólico, en la prueba de glucósidos y alcaloides no se presentó reacción alguna. Comparando las reacciones obtenidas de los extractos con disolventes orgánicos y el acuoso se aprecia la diferente composición que se presenta en cada uno de los extractos y la separación de los mismos a partir de la polaridad que éstos presentan, diferenciándose el extracto acuoso aún del extracto metanólico (el cual se le considera un disolvente orgánico polar, tabla 4). Dichas diferencias se remarcan en el patrón de manchas obtenidas en las placas desarrolladas en los diferentes sistemas de elución, siendo que en el sistema de baja polaridad el extracto acuoso no presentó mancha alguna (figura 8), hasta utilizar el eluyente cloroformo-metanol 7:3 (placa C de la figura 9) sin embargo el desarrollo de las placas es deficiente ya que las manchas se localizan muy cercanas al punto de aplicación o al frente del disolvente. Al observar las placas del sistema de elución de alta polaridad (tabla 7 y figura 10) se presentó un número máximo de cinco manchas con el eluyente butanol-ác. acético-agua 5:1:4 teniendo una resolución buena para tres manchas que se ubican al centro de la placa y otra hacia el punto de aplicación visibles

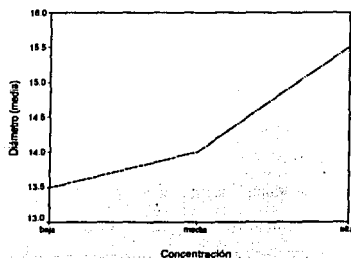
a onda corta, y una mancha apenas desplazada del punto de aplicación pero bien definida (la cual sería la que contiene los compuestos más polares de todo el extracto).

DETERMINACIÓN DEL TIPO DE ACTIVIDAD

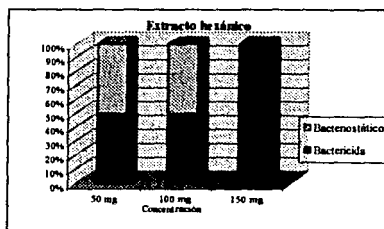
BIOENSAYO CON BACTERIAS

En los resultados del bioensayo con *Escherichia coli* se observa que al probar el extracto hexánico se obtiene un patrón de incremento en el diámetro del halo de inhibición en función del aumento de la concentración (gráfica 12), observándose la actividad bactericida y bacteriostática en las concentraciones de 50 mg y 100 mg y una total actividad bactericida en la concentración de 150 mg (gráfica 13).

Gráfica 12. Obtención de los halos a partir de las concentraciones empleadas del extracto hexánico.

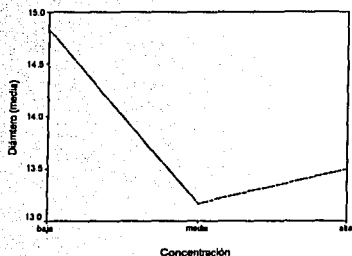


Gráfica 13. Patrón del tipo de actividad reportada en cada una de las concentraciones.

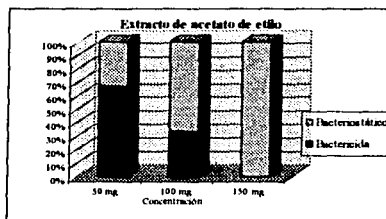


En los resultados de la prueba con el extracto de acetato de etilo se obtuvo un decremento en el diámetro del halo de inhibición conforme la concentración del extracto aumentaba (gráfica 14) acompañado de la disminución del tipo de actividad bactericida (gráfica 15) en las concentraciones de 50 mg y 100 mg y una actividad totalmente bacteriostática en la concentración de 150 mg.

Gráfica 14. Respuesta de los halos a partir de las concentraciones empleadas del extracto AcOEt.

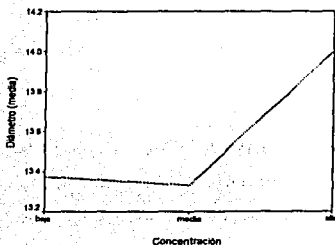


Gráfica 15. Patrón del tipo de actividad del extracto con acetato de etilo.

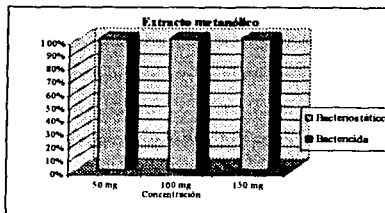


En el caso del extracto metanólico el diámetro del halo de inhibición presenta un incremento de acuerdo al aumento de la concentración (gráfica 16) y el tipo de actividad que se presenta en cada una de las concentraciones es la bacteriostática (gráfica 17).

Gráfica 16. Respuesta media de los halos a partir de las concentraciones empleadas.

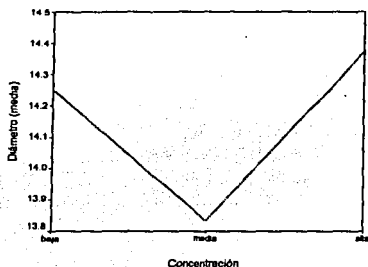


Gráfica 17. Patrón del tipo de actividad del extracto metanólico.

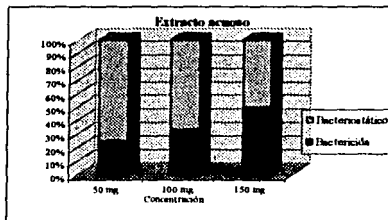


Para el caso del extracto acuoso el patrón del incremento del halo de inhibición no es claro por la disminución del número de muestras que se tienen para la concentración de 100 mg (gráfica 18). El patrón del tipo de actividad que presenta el extracto nos indica que se mantiene la actividad bactericida para las concentraciones baja y media y hay un incremento de esta actividad en la concentración alta (gráfica 19).

Gráfica 18. Respuesta media de los halos a partir de las concentraciones empleadas.



Gráfica 19. Patrón del tipo de actividad obtenida en el extracto acuoso



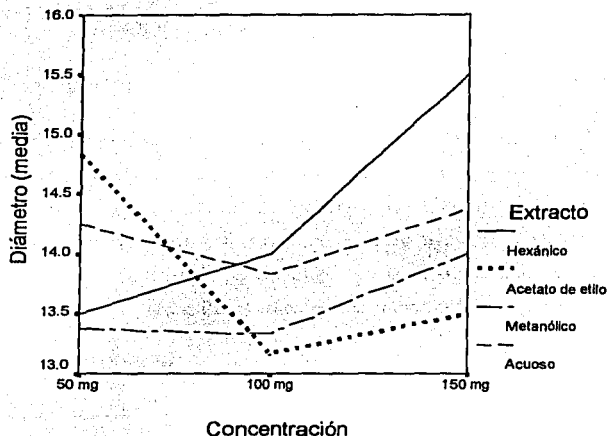
Los extractos se pueden agrupar de acuerdo a las semejanzas en el patrón de respuesta del diámetro del halo de inhibición de la bacteria, observando que los extractos hexánico y metanólico son semejantes y a su vez los extractos de acetato de etilo y acuoso.

En lo que se refiere al patrón de la actividad observada para cada extracto se aprecia que en el hexánico, acetato de etilo y metanólico la actividad bactericida disminuye de acuerdo se incrementa la polaridad del extracto.

Para el caso del extracto acuoso los diámetros del halo de inhibición y de la actividad biológica difieren de la observada en el extracto metanólico, y aunque la polaridad entre ambos se asemeja, la complejidad del extracto acuoso nos hace suponer que los compuestos que lo integran difieren del extracto metanólico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para todos los casos los análisis de ANOVA nos indican que las concentraciones no presentan diferencias significativas en la respuesta del diámetro del halo de inhibición. El tipo de extracto así mismo no presenta diferencias significativas en la sensibilidad de la bacteria, en la gráfica 20 se aprecia el patrón del diámetro del halo de inhibición que se da en cada uno de los extractos.

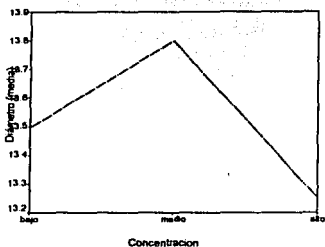


Gráfica 20. Diámetro del halo inhibitorio de cada uno de los extractos en las concentraciones mencionadas para *E. coli*.

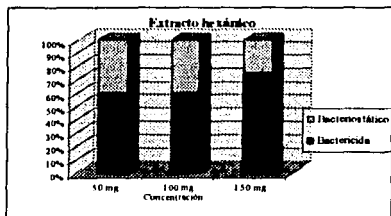
Sin embargo, con las tablas de contingencia se observó que el patrón del tipo de actividad es dependiente del tipo de extracto más que de la concentración empleada.

Para el caso de *Bacillus subtilis* se observó que el extracto hexánico presentó un patrón de decremento en el diámetro del halo de inhibición acorde al incremento de la concentración (gráfica 21), el tipo de actividad que se encuentra en el extracto presenta un ligero incremento de la actividad bactericida en la concentración más alta sin embargo el número de datos para la concentración más alta es menor respecto a las concentraciones baja y media (gráfica 22).

Gráfica 21. Respuesta obtenida en los halos a partir de la concentración empleada.

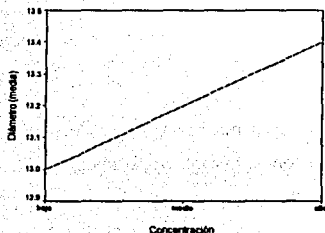


Gráfica 22. Patrón de la actividad observada para el extracto hexánico.

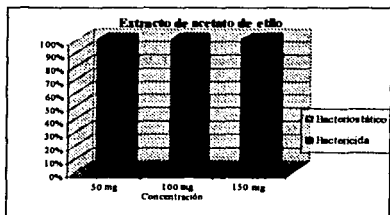


El extracto hexánico no presentó diferencias significativas en lo que respecta a las concentraciones empleadas, caso opuesto se presentó en el extracto de acetato de etilo, donde las concentraciones que presentan las diferencias significativas son la baja con respecto a la alta. En la gráfica 23 se puede observar un incremento en el diámetro del halo de inhibición en función del incremento de la concentración. El tipo de actividad que se presentó fue bactericida en las tres concentraciones empleadas (gráfica 24).

Gráfica 23. Respuesta obtenida en los halos a partir de la concentración empleada

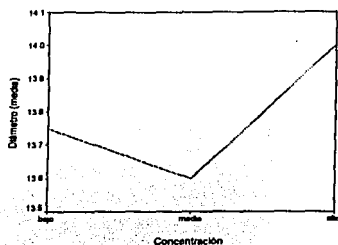


Gráfica 24. Actividad observada para el extracto de acetato de etilo.

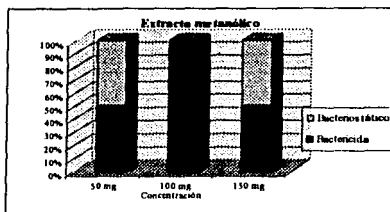


El extracto metanólico presenta un patrón de incremento en el diámetro del halo de inhibición en las concentraciones media y alta (gráfica 25) y el tipo de actividad encontrado fue principalmente bactericida, manteniendo las proporciones de la actividad en las concentraciones (gráfica 26). Las diferencias estadísticas no son significativas.

Gráfica 25. Respuesta obtenida en los halos a partir de la concentración empleada.

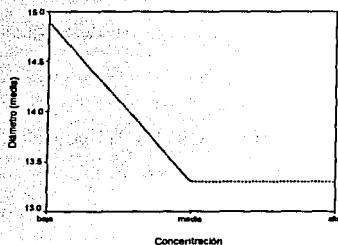


Gráfica 26. Patrón del tipo de actividad observado para el extracto metanólico.

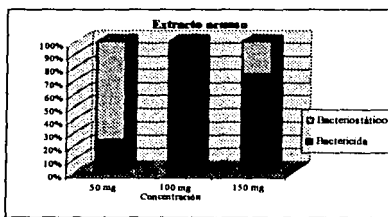


Como en el caso del extracto con acetato de etilo, el extracto acuoso presenta diferencias significativas en la concentración baja con respecto a las concentraciones media y alta (gráfica 27) y el patrón en el tipo de actividad reportada es principalmente bactericida en las concentraciones media y alta y bacteriostático en la concentración más baja (gráfica 28).

Gráfica 27. Respuesta obtenida en los halos a partir de la concentración empleada.



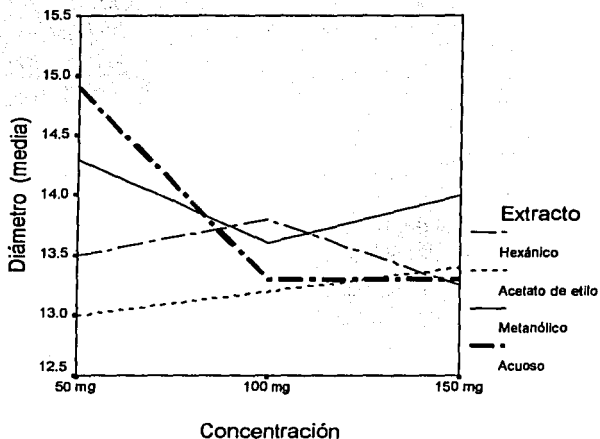
Gráfica 28. Tipo de actividad presentada por el extracto acuoso.



Los extractos empleados para el bioensayo con *B. subtilis* no presentan diferencias significativas entre si en lo que respecta al diámetro del halo inhibitorio teniendo una respuesta semejante en cada una de las concentraciones de cada uno de los extractos (gráfica 29) y se presentan diferencias significativas en lo que respecta a la concentración empleada y el extracto que se usa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

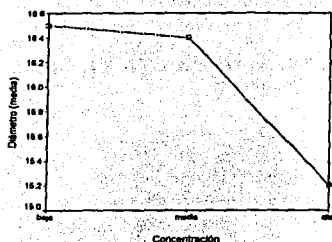
Con las tablas de contingencia se observó que el tipo de actividad es independiente de la concentración empleada y del extracto en sí. El tipo de actividad que se encuentra principalmente es el bactericida.



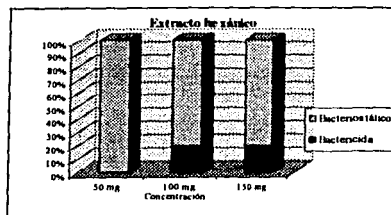
Gráfica 29. Diámetro de los halos de inhibición de cada uno de los extractos empleados en *Bacillus subtilis*.

Para *Bacillus cereus* en el extracto hexánico se observó, con los análisis de ANOVA, que las concentraciones empleadas no presentan diferencias significativas, esto es que la respuesta obtenida por la bacteria a cada una de las concentraciones no está determinada por la concentración. El patrón que se obtiene del extracto se puede apreciar en la gráfica 30 en la que se nota un decremento en la media de los diámetros de los halos. El patrón del tipo de actividad que se observó para este extracto es principalmente bacteriostático (gráfica 31).

Gráfica 30. Respuesta obtenida de los halos a partir de la concentración empleada.

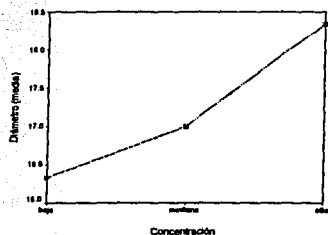


Gráfica 31. Tipo de actividad observada para el extracto hexánico.

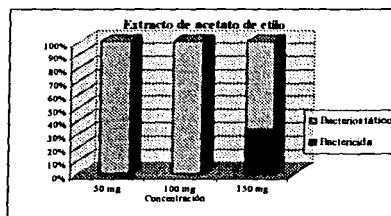


El extracto de acetato de etilo, muestra un patrón de incremento en la sensibilidad de la bacteria en función del incremento de la concentración (gráfica 32). El extracto muestra principalmente la actividad bacteriostatica (gráfica 33).

Gráfica 32. Respuesta obtenida de los halos a partir de la concentración empleada.



Gráfica 33. Tipo de actividad reportada para cada una de las concentraciones empleadas.

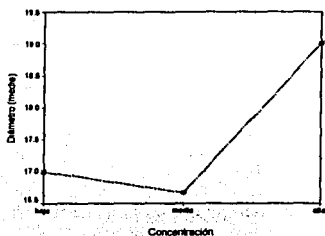


Caso opuesto se reporta para el extracto metanólico el cual presenta un comportamiento de la actividad principalmente bactericida aunque las diferencias estadísticas reportadas a las concentraciones empleadas no son significativas, sin embargo el patrón que presenta el extracto metanólico (gráfica 34) es semejante al obtenido por el extracto con acetato de etilo y al reportado por el extracto acuoso (gráfica 36). El patrón del

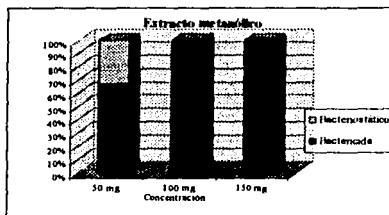
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tipo de actividad que se observa en el extracto metanólico es principalmente bactericida (gráfica 35).

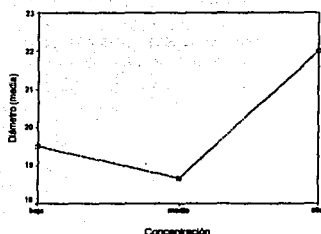
Gráfica 34. Respuesta obtenida de los halos a partir del extracto metanólico.



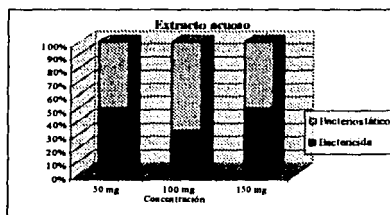
Gráfica 35. Patrón de la actividad observada en el extracto metanólico



Gráfica 36. Respuesta obtenida de los halos a partir del extracto acuoso.



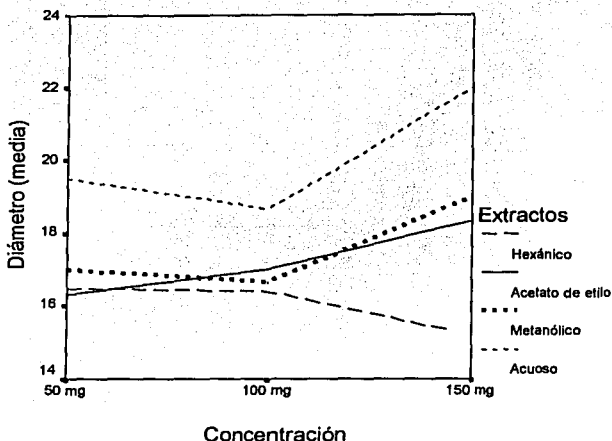
Gráfica 37. Patrón de la actividad observada en el extracto acuoso.



El extracto acuoso presenta tanto actividad bactericida como bacteriostática en las tres concentraciones en proporción semejante aunque existe un incremento de la actividad bactericida en la concentración media y alta (gráfica 37).

En los resultados obtenidos en la ANOVA para determinar si los extractos influyen en la susceptibilidad de la bacteria se encuentra que hay diferencias significativas, esto es que los tipos de extracto empleados influyen en la susceptibilidad de la bacteria. Los extractos que presentan dicha diferencia entre si son los extractos hexánico y acuoso, esto

se puede apreciar en la gráfica 38, dónde el extracto hexánico presenta los halos de inhibición menores al resto de los extractos.



Gráfica 38. Halos obtenidos en respuesta del extracto empleado en *B. cereus*.

En las tablas de contingencia se obtuvo que la actividad biológica depende del tipo de extracto utilizado.

Si se retoma la susceptibilidad de las bacterias para cada uno de los extractos tenemos que la bacteria que presenta una mayor susceptibilidad es *Bacillus cereus* y el patrón que se encontró en *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* es muy semejante (figura 16).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

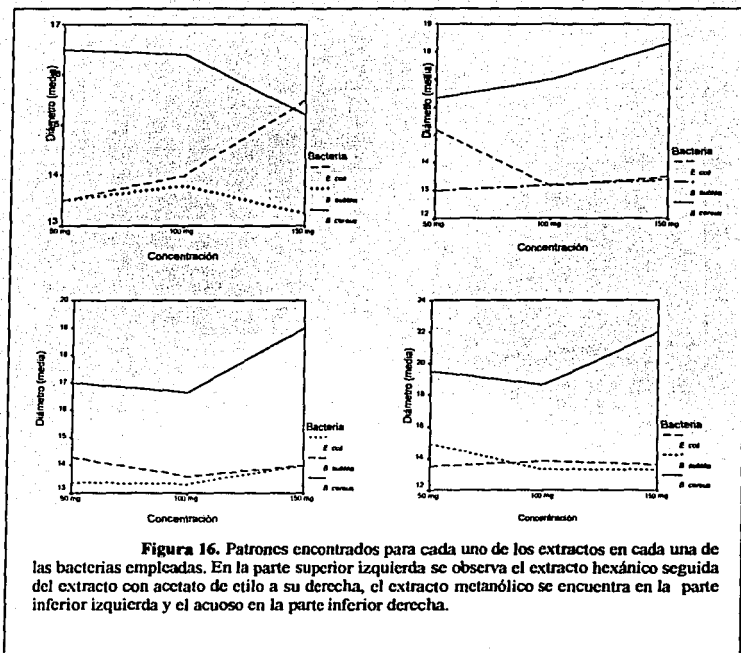


Figura 16. Patrones encontrados para cada uno de los extractos en cada una de las bacterias empleadas. En la parte superior izquierda se observa el extracto hexánico seguido del extracto con acetato de etilo a su derecha, el extracto metanólico se encuentra en la parte inferior izquierda y el acuoso en la parte inferior derecha.

Siendo que para *Escherichia coli* observamos halos de inhibición de mayor tamaño en el extracto hexánico, seguido en orden por el acuoso y el de acetato de etilo y por último el metanólico. Para el caso de *Bacillus subtilis* los extractos metanólico y acuoso responden de una manera semejante seguido por el hexánico y por último por el de acetato de etilo aunque éste presenta diferencias significativas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el bioensayo realizado con *Artemia salina* las concentraciones que presentan diferencias significativas en las pruebas de cada uno de los extractos con respecto al control son: las concentraciones del extracto hexánico solamente a 1000 ppm, el de acetato de etilo a las tres concentraciones utilizadas se presenta diferencias significativas (es decir a 10, 100 y 1000 ppm) y el extracto acuoso a 100 ppm y 1000 ppm, para el caso del extracto metanólico las concentraciones utilizadas no presentan diferencias significativas con respecto al control. Viendo los resultados se puede apreciar que el extracto que reduce la sobrevivencia del crustáceo es el extracto de acetato de etilo ya que a 10 ppm ya presenta diferencias con respecto al control.

Los resultados del análisis Probit nos indican que los extractos más activos son el acuoso con una DL_{50} de 7.77 ppm, seguido por el extracto de acetato de etilo con una DL_{50} 13.50 ppm y el extracto hexánico con una DL_{50} 156.22 ppm. Para el extracto metanólico la DL_{50} obtenida es mayor de 1000 ppm.

Jiménez-Cruz (1994) discute que el modelo de *Artemia salina* puede servir para determinar si el extracto probado en éste sistema tiene una posible aplicación como extracto con propiedades insecticidas, lo cual se ve confirmado con el trabajo de Hein *et al.* (en prensa), obteniendo compuestos con propiedades insecticidas del extracto de acetato de etilo realizado a partir del micelio de *Gymnopus dryophilus* en *Helicoverpa zea* y *Spodoptera frugiperda* encontrando que los estadios larvales y adultos presentan irritantes gastrointestinales. Los tres compuestos aislados por Hein *et al.* (en prensa) dos de ellos ya habían sido aislados en *Rhodocollybia maculata* presentando las actividades antifúngicas, citotóxicas y actividad antiviral.

CONCLUSIÓN

A partir de la extracción química se puede indicar que el extracto con mayor rendimiento fue el extracto acuoso seguido por el extracto metanólico y éste a su vez por el extracto de acetato de etilo y por último el extracto hexánico.

De las pruebas de los metabolitos secundarios realizadas en los cuatro extractos la prueba de terpenos y esteroides se presentó positiva para los extractos hexánico, acetato de etilo y acuoso. La prueba de alcaloides sólo resultó positiva para el extracto de acetato de etilo. La prueba de flavonoides resultó positiva para el extracto metanólico y acuoso siendo éste último el que obtuvo una coloración más intensa. La prueba de glucósidos resultó negativa para los cuatro extractos.

El desarrollo del perfil cromatográfico del extracto hexánico en la mezcla de eluyentes hexano: acetato de etilo 8:2 presenta el mayor número de manchas (siete) teniéndolo como el mejor sistema de elusión empleada para dicho extracto. El desarrollo del extracto hexánico en algunas zonas presenta semejanzas con el obtenido del extracto acetato de etilo, desarrollado en el mismo sistema de elusión.

Para el caso del extracto acetato de etilo se presenta el mejor sistema de elusión el hexano: acetato de etilo 6:4, obteniendo siete manchas. Pareciéndose algunas zonas del desarrollo del extracto con el obtenido con el extracto hexánico con el sistema hexano: acetato de etilo 6:4. También se presenta un buen desarrollo del extracto de acetato de etilo en la mezcla butanol: ac. acético: agua obteniendo seis manchas.

Con el extracto metanólico se presentó como mejor sistema de elusión la mezcla cloroformo: metanol 3:7 obteniéndose cuatro manchas, dos de las cuales se presentan en el extracto acuoso, desarrollado en el mismo sistema de elusión.

Del extracto acuoso se obtienen cinco manchas con el sistema de elusión butanol: ac. acético: agua 5:1:4 siendo para éste extracto el mejor sistema de desarrollo. El desarrollo del extracto acuoso no presenta semejanza con el de otro extracto.

La actividad biológica presentada para las bacterias a 150 mg es principalmente bactericida en los cuatro extractos siendo que para 100 y 50 mg la actividad que se presenta es tanto bactericida como bacteriostático. Los análisis de las tablas de contingencia indican que para *E. coli* y *B. subtilis* el tipo de actividad reportada depende del extracto empleado y las ANOVAS reportan que para *B. subtilis* la actividad depende, además del extracto empleado, la concentración a la que es sometida la bacteria; dichas concentraciones son las empleadas en los extractos hexánico y acetato de etilo. Las concentraciones del extracto metanólico no presentaron diferencias significativas en alguno de los organismos en los que se probó.

Para el caso de *Artemia salina* la sobrevivencia se ve afectada al utilizar el extracto hexánico, el de acetato de etilo y el acuoso no siendo el caso para el extracto metanólico.

La DL_{50} calculada a partir del bioensayo con *A. salina* se presenta el extracto acuoso como el más activo siguiéndolo el extracto de acetato de etilo y el extracto hexánico, siendo para el caso del extracto metanólico el que presenta la menor actividad.

LITERATURA CITADA

- Acar, J.F. & F.W. Goldstein. 1989. *Disc susceptibility test*. In: Lorian, V. (ed.), **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 2nd edition William and Wilkins, Baltimore.
- Antonín, V. & M.E. Noordeloos. 1997. **A monograph of *Marasmius*, *Collybia* and related genera in Europe**. Part 2. *Collybia*, *Gymnopus*, *Rhodocollybia*, *Crinipellis*, *Chaetocalathus* and additions to *Marasmiellus*. Libri Botanici Vol. 17. IHW-Verlag. München.
- Antonín, V., R.E Halling & M.E. Noordeloos. 1997. Generic concepts within the groups of *Marasmius* and *Collybia* Sensu Lato. **Mycotaxon** 63:359-368.
- Aroche, R.M., J. Cifuentes, F. Lorea, P. Fuentes, J. Benavides, H. Galicia, E. Méndez, O. Aguilar & V. Valenzuela. 1984. Macromicetos tóxicos y comestibles de una región comunal del valle de México, I. **Bol. Soc. Mex. Mic.** 19: 291-318.
- Barry, A. L. 1986. Procedure for testing antimicrobial agents in agar media: Theoretical considerations. In: Lorian, V. (ed.), **Antibiotics in Laboratory Medicine**, 2nd edition William and Wilkins, Baltimore.
- Bauer, A.W., W.M. Kirby, J.C. Sherris & M. Turck. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **The American Journal of Clinical Pathology** 45(4): 493-496.
- Bennett, J.W. 1995. From molecular genetics and secondary metabolism to molecular metabolites and secondary genetics. **Canadian Journal of Botany** 73: S917-S924.
- Bianco-Coletto, M. A. & L. Giardino. 1996. Basidiomiceti in relazione all'antibiosi. Nota X. Attività antibiotica dei miceli e dei liquidi colturali di 25 nuovi ceppi. **Allionia** 34: 39-43.
- Bianco-Coletto, M.A., M. Pizzinat & M. Rossi 1993. Antibiotic activity in Basidiomycetes. VII. Antibiotic activity of mycelia and cultural filtrates. **Allionia** 32(0): 79-83.
- Cifuentes, J., M. Villegas & L. Pérez-Ramírez. 1986. Hongos. In: Lot, A. y Chiang, F. (ed.) **Manual de herbario. Administración y manejo de colecciones, técnicas de recolección y preparación de ejemplares botánicos**. Consejo Nacional de la Flora de México.

- Concepcion G.P., J.E. Lazaro & K.H. Hyde. 2001. Screening for Bioactive Novel Compounds. *In*: Pointing, S.B & Hyde K.D. (ed.), **Bio-Exploitation of Filamentous Fungi**. Fungal Diversity Press, Hong Kong.
- Deacon, J. W. 1997. **Modern Mycology**. Blackwell Science, Oxford.
- Domínguez, X. A. 1988. **Método de Investigación Fitoquímica**. Editorial Limusa, D.F.
- Duran-Murillo, E. 1991. **Métodos simples para la evaluación de actividad biológica**. Tesis de Licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, UNAM.
- Garraway, M.O. & R. C. Evans. 1996. **Fungal nutrition and physiology**. John Wiley & Sons, New York..
- Gloer, J.B. 1995. The chemistry of fungal antagonism and defense. **Canadian Journal of Botany** 73: S1265-S1274.
- Griffin, D.H. 1994. **Fungal physiology**, 2nd edition. Wiley-Liss Inc., New York.
- Groombridge, B. 1992. **Global Biodiversity**. Chapman & Hall, London.
- Gross, E.G., A.B. Pomilio, A.M. Seldes & G. Burton. 1985. **Introducción al estudio de los productos naturales**. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C.
- Guzmán Dávalos. & G. Guzmán. 1979. Estudio ecológico comparativo entre los hongos (Macromicetos) de los bosques tropicales y los de coníferas del sureste de México. **Bol. Soc. Mex. Mic.** 13: 89-116.
- Guzmán, G. & L. Villarreal. 1984. Estudios sobre los hongos, líquenes y mixomicetos del Cofre de Perote, Veracruz, I: Introducción a la micoflora de la región. **Bol. Soc. Mex. Mic.** 19: 107-124.
- Halling, R.E. 1983. The genus *Collybia* (Agaricales) in the Northeastern United States and adjacent Canada. **Mycologia Memoir** 8. J. Cramer, Braunschwaig.
- Hawksworth, D. L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance and conservation. **Mycological Research** 95: 641-655.
- Hawksworth, D. L. 1992. Fungi a neglected component of biodiversity crucial to ecosystem function and maintenance. **Canadian Biodiversity** 1 (4): 4-10.
- Hawksworth, D.L., P.M. Kirki; B. C. Sutto & D. N. Pegler. 1995. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**. CAB International, United Kingdom.

- Hawksworth, D.L. 2001^a. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research** **105** (12):1422-1432.
- Hawksworth, D.L. 2001^b. Horizons in exploiting filamentous fungi. *In*: Pointing, S.B & Hyde K.D. (ed.), **Bio- Exploitation of Filamentous Fungi**. Fungal Diversity Press, Hong Kong.
- Hein, S.M., J.B. Gloer, D.T. Wiclow, H.D. Thiers & P.F. Dowd. 2002. Antiinsectan pyridine and purine metabolites from mushroom *Collybia dryophila*. **Applied and Environmental Microbiology**, en prensa.
- Herrera, T. & M. Ulloa. 1990. **El reino de los hongos. Micología básica y aplicada**. Fondo de Cultura Económica, Ciudad de México.
- Jennings, D.H. & G. Lysek. 1996. **Fungal Biology**. Bios Scientific Publishers. Oxford.
- Jiménez-Cruz, A.R. 1994. **Síntesis de derivados de sorbato de etilo y su determinación de actividad biológica en *Artemia salina***. Tesis de Licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, UNAM.
- Kendrick, B. 1985. **The fifth Kingdom**. Mycology Publications, Ontario.
- Kües, U. & Y. Liu. 2000. Fruiting body production in Basidiomycetes. **Applied Microbiology Biotechnology** **54**: 141-152.
- Lin, C.N., Y.F. Fann & M.I. Chung. 1997. Steroids of formosan *Ganoderma tsugae*. **Phytochemistry** **46**(6):1143-1146.
- Lourenco, A. A.M. Lobo, B. Rodriguez & M.L. Jimeno. 1996. Ceramides from the fungus *Phellinus pini*. **Phytochemistry** **43**(3):617-620.
- Mann, 1987. **Secondary metabolism**. General Editors. Oxford.
- Meyer, B. N., N.R. Ferrignl, J. Putnam, L. Jacobsen, D. Nichols & J.L. McLaughlin. 1982. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Plant Research** **45**:31-34.
- Moore-Landecker, E. 1990. **Fundamentals of the Fungi**. 3rd edition, Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Moss, M.O. 1996. Centenary Review. Mycotoxins. **Mycological Research** **100**(5): 513-523.

- Nisbet, L.J. & F.M. Fox. 1991. The importance of Microbial Biodiversity to Biotechnology. *In*: Hawksworth D.L. (ed.), **The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its role in sustainable agriculture**. CAB International..
- Pellicer-González, E. 1998. **Cultivo micelial de *Gymnopus dryophilus* (Bull.: Fr) Murril bajo diferentes parámetros**. Tesis de Licenciatura, Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Rossmann, A.Y. 1994. A Strategy for all-taxa inventory of fungal biodiversity. *In*: Peng C.I. y Chou C.H. (ed.), **Biodiversity and Terrestrial Ecosystems**. Inst. Botany, Acad. Sinica Monograph Series No. 14.
- Rumack, B.H. & E. Salzman. 1978. **Mushroom poisoning : Diagnosis and treatment**. West Palm Beach.
- Sonnenbichler, J., M. Bliestle, H. Peipp & O. Holdenrieder. 1989. Secondary fungal metabolites and their biological activities, I. Isolation of antibiotics compound from cultures of *Heterobasidion annosum* synthesized in the presence of antagonistic fungi or host plant cell. **Biol. Chem. Hoppe. Seyler.** 370(12):1295-303.
- Thomson, R.H. 1993. **The chemistry of Natural Products**. Blackie Academic & Professional. United Kingdom.
- Villarruel-Ordaz, J.L. 1992. **Contribución al conocimiento del género *Collybia* (Tricholomataceae) del centro y sur de México**. Tesis de Licenciatura, Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Villarruel-Ordaz, J.L., L. Pérez-Ramírez & J. Cifuentes. 1993. Nuevos registros del género *Collybia* (Tricholomataceae) y descripción de especies poco estudiadas en México. **Rev. Mex. Mic.** 9: 139-164.
- Villarruel-Ordaz, J.L. 1995. **Análisis cromatográfico y morfológico de algunas especies del género *Collybia* (Fungi: Agaricales) en el centro de México**. Tesis de Maestría, Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Zar, J. H. 1996. **Biostatistical Analysis**. Prentice-Hall Inc., New Jersey.

Apéndice A

Tablas y gráficas de la revisión bibliográfica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para saber cómo se agrupa el conocimiento micológico respecto a los metabolitos secundarios de ésta división se realizó una búsqueda bibliográfica en bases de datos especializadas (Biological Abstract y MEDLINE) que comprende el periodo de 1983 a 1999 bajo los criterios: Basidiomycetes y metabolitos secundarios, obteniendo un total de 609 citas las cuales se agruparon de acuerdo al siguiente discernimiento:

Químico.- comprende los trabajos que abarcan la composición de los compuestos y sus cambios estructurales.

Bioquímico.- los estudios vinculados con la síntesis de metabolitos secundarios.

Actividad biológica.- estudios que evalúan el efecto de los metabolitos secundarios en sistemas biológicos de prueba.

Quimiotaxonomía.- trata aspectos de relaciones taxonómicas mediante metabolitos.

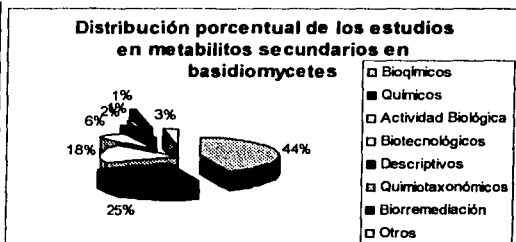
Descriptiva.- la descripción de algún hongo.

Biotechnológico.- estudios aplicados a procesos de producción industrial, utilización de metodologías de transformación, así como la manipulación de los ácidos nucleicos.

Otros.- los trabajos que abarcan temas como ecología, análisis cuantitativos, etc.

Se muestra la agrupación de las citas reportadas en Basidiomycetes. Los campos que presentan un mayor estudio son los catalogados como bioquímicos, químicos y los que reportan actividad biológica entre los más importantes.

Categorías	Citas reportadas
Bioquímicos	265
Químicos	154
Actividad Biológica	109
Biotechnológicos	38
Descriptivos	10
Quimiotaxonómicos	7
Biorremediación	7
Otros	19
Total	609



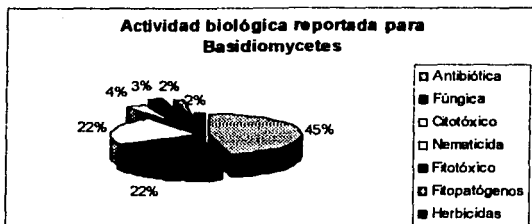
Actividad biológica	Citas reportadas
Antibiótica	50
Fúngica	24
Citotóxico	24
Nematocida	4
Fitotóxico	3
Fitopatógenos	2
Herbicidas	2
Total	109

En los trabajos que se catalogaron dentro de actividad biológica se desglosan a continuación para observar el tipo de actividad que se reporta.

Tabla que muestra las citas reportadas con actividad biológica.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

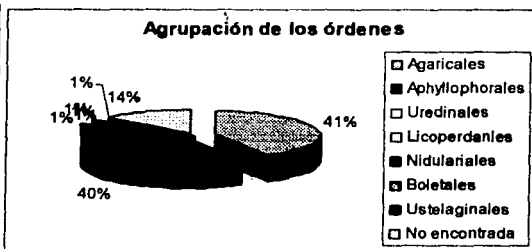
ESTA TESIS NO SE
PUEDE REPRODUCIR



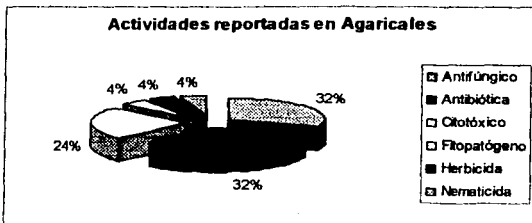
Los criterios utilizados para agrupar los trabajos reportados corresponden a la actividad reportada en los mismos.

En la tabla inferior se observa los órdenes más citados dentro de los Basidiomycetes.

Orden	Citas
<i>Agaricales</i>	45
<i>Aphylophorales</i>	44
<i>Uredinales</i>	1
<i>Licoperdantes</i>	1
<i>Nidulariales</i>	1
<i>Boletales</i>	1
<i>Ustelaginales</i>	1
<i>No encontrada</i>	15
Total	109



Se desglosan a continuación para los dos primeros órdenes el reporte de la actividad.



Actividad reportada	citas
Antifúngico	14
Antibiótica	14
Citotóxico	11
Fitopatógeno	2
Herbicida	2
Nematocida	2
Total	45

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE B

Tablas de contingencia
cia bi- y tri-dimensionales
de:

Escherichia coli

Bacillus subtilis

Bacillus cereus

Tabla de contingencia tridimensional para la variable discreta Actividad Biológica

Escherichia coli

Frecuencias observadas

Extracto	Actividad bactericida		
	baja	media	alta
Hexanico	1	1	0
AcOEt	2	1	0
MeOH	0	0	0
Acuoso	1	1	2

Actividad bacteriostática			Total
baja	media	alta	
1	1	2	R1= 6
1	2	3	R2= 9
4	3	3	R3= 10
3	2	2	R4= 11

T1= 9	C1= 13
T2= 27	C2= 11
	C3= 12

n2= 1296	n= 36
----------	-------

t= 2
c= 3

Frecuencias esperadas

0.54166667	0.45833333	0.5	1.625	1.375	1.5	R1= 6
0.8125	0.6875	0.75	2.4375	2.0625	2.25	R2= 9
0.90277778	0.76388889	0.83333333	2.70833333	2.29166667	2.5	R3= 10
0.99305556	0.84027778	0.91666667	2.97916667	2.52083333	2.75	R4= 11
T1= 9		C1= 13				n= 36
T2= 27		C2= 11				
		C3= 12				

Observado-esperado

0.45833333	0.54166667	-0.5	-0.625	-0.375	0.5
1.1875	0.3125	-0.75	-1.4375	-0.0625	0.75
-0.90277778	-0.76388889	-0.83333333	1.29166667	0.70833333	0.5
0.00694444	0.15972222	1.08333333	0.02083333	-0.52083333	-0.75

Cuadrados

0.21006944	0.29340278	0.25	0.390825	0.140625	0.25
1.41015625	0.09765625	0.5625	2.06640625	0.00390625	0.5625
0.81500772	0.58352623	0.69444444	1.68840278	0.50173611	0.25
4.8225E-05	0.02551119	1.17361111	0.00043403	0.27126736	0.5625

Cuadrados/esperados

0.38782051	0.84015152	0.5	0.24038462	0.10227273	0.16666667
1.73557692	0.14204545	0.75	0.84775641	0.00189394	0.25
0.90277778	0.76388889	0.83333333	0.61802584	0.21893939	0.1
4.8563E-05	0.03036042	1.28630303	0.00014569	0.10761019	0.20454545

Sumatoria de todos los cuadrados/esperados

$$X^2 = 10.8228471 \quad v = 17$$

$$X^2 \text{ tabla} = 27.587$$

Ho=>Todas las variables son mutuamente independientes

Ha=>No todas las variables son mutuamente independientes

Se acepta Ho. Sin embargo dado que hay un par de variables (concentración y extracto) que son mutuamente independientes puede englobar a la variable actividad biológica que tal ves no lo sea. Para ello se realizaron tablas de contingencia de bidimensionales, las cuales se presentan a continuación:

**Tabla de contingencia bidimensional de *E. coli*.
Variables concentración y actividad biológica.**

Concentración	Actividad biológica		Total
	Bactericida	Bacteriostático	
baja	4	9	R1= 13
media	3	8	R2= 11
alta	2	10	R3= 12

C1= 9

C2= 27

n= 36

Ho=> La actividad biológica es independiente de la concentración

Ha=> La actividad biológica no es independiente de la concentración

Frecuencias esperadas

3.25	9.75	R1= 13
2.75	8.25	R2= 11
3	9	R3= 12

C1= 9

C2= 27

n= 36

Frecuencias observadas-esperadas

0.75	-0.75
0.25	-0.25
-1	1

Cuadros

0.5625	0.5625
0.0625	0.0625
1	1

Cuadros/esperados

0.17307692	0.057692308
0.02272727	0.007575758
0.33333333	0.111111111

Sumatoria

X2= 0.70551671

v= 2

X2 tabla= 5.991

Se acepta Ho

Se acepta Ho. La actividad es independiente de la concentración empleada.

Tabla de contingencia bidimensional de *E. coli*.
Variables tipo de extracción y actividad biológica.

Extracto	Actividad Biológica		Total
	Bactericida	Bacterioestática	
Hexánico	4	2	R1= 6
AcOEt	3	6	R2= 9
MeOH	0	10	R3= 10
Acuoso	4	7	R4= 11

C1= 11
C2= 25

n= 36

Ho=> La actividad biológica es independiente de la concentración
Ha=> La actividad biológica no es independiente de la concentración

Frecuencias esperadas

1.83333333	4.16666667	R1= 6
2.75	6.25	R2= 9
3.05555556	6.94444444	R3= 10
3.36111111	7.63888889	R4= 11

C1= 11
C2= 25

n= 36

Frecuencias observadas-esperadas

2.16666667	-2.16666667
0.25	-0.25
-3.05555556	3.05555556
0.63888889	-0.63888889

Cuadrados

4.69444444	4.69444444
0.0625	0.0625
9.33641975	9.33641975
0.40817901	0.40817901

Cuadrados/esperados

2.56060606	1.12666667
0.02272727	0.01
3.05555556	1.34444444
0.12144169	0.05343434

Suma

X2= 8.29487603

v= 3

X2 tabla= 7.815

Ho=>se rechaza.
Ha=>la actividad biológica es dependiente del tipo de extracto realizado.

Tabla de contingencia tridimensional para la variable discreta Actividad Biológica

Bacillus subtilis

Frecuencias observadas

Extracto	Actividad bactericida		
	baja	media	alta
Hexanico	3	3	3
AcOEt	5	5	5
MeOH	3	4	3
Acuoso	1	5	4

T1= 44	C1= 20
T2= 16	C2= 20
	C3= 19

t= 2
c= 3

Actividad bacteriostática			Total
baja	media	alta	
2	2	1	R1= 14
0	0	0	R2= 16
2	1	2	R3= 16
4	0	1	R4= 15

n2= 3481	n= 68
----------	-------

Frecuencias esperadas

3.53921287	3.53621287	3.36225223
3.79201379	3.79201379	3.6024131
3.79201379	3.79201379	3.6024131
3.79201379	3.79201379	3.6024131

1.20654984	1.20654984	1.14622235
1.29273197	1.29273197	1.22809537
1.29273197	1.29273197	1.22809537
1.29273197	1.29273197	1.22809537

T1= 44	C1= 20
T2= 16	C2= 20
	C3= 19

R1= 14
R2= 16
R3= 16
R4= 15

n= 68

Observado-esperado

-0.53921287	-0.53921287	-0.36225223
1.20796621	1.20796621	1.3975668
-0.79201379	0.20796621	-0.6024131
-2.79201379	1.20796621	0.3975668

0.79345016	0.79345016	-0.14622235
-1.29273197	-1.29273197	-1.22809537
0.70726803	-0.29273197	0.77190463
2.70726803	-1.29273197	-0.22809537

Cuadrados

0.29075052	0.29075052	0.13122668
1.45923069	1.45923069	1.95324914
0.62728584	0.04325826	0.36290154
7.795341	1.45923069	0.15807534

0.62956315	0.62956315	0.02138088
1.67115596	1.67115596	1.50821825
0.50022806	0.08569201	0.59583675
7.32930017	1.67115596	0.0520275

Cuadrados/esperados

0.06215118	0.06215118	0.0390294
0.38481682	0.38481682	0.54220576
0.16542288	0.01140773	0.10073846
2.05572591	0.38481682	0.0438804

0.52178794	0.52178794	0.01865343
1.29273197	1.29273197	1.22809537
0.3869542	0.06928753	0.4051714
5.96962086	1.29273197	0.04236436

Sumatoria de todos los cuadrados/esperados

X2= 17.0960823

vn= 17

X2 tabla= 27.587

Ho=>las variables actividad, concentración y extractos son mutuamente independientes
 Ha=>las variables actividad, concentración y extractos no son mutuamente independientes
 Ho es aceptada.

El resultado obtenido por la tabla de contingencia tridimensional acepta la hipótesis nula sin embargo alguna de nuestras variables puede estar englobando la frecuencia que presentan las otras dos variables por ello se realizaron tablas de contingencia bidimensionales con las variables.

TABLA DE CONTINGENCIA BIDIMENSIONAL

Variables: actividad biológica y concentración.

Concentración	Actividad biológica		Total
	Bactericida	Bacteriosfónica	
baja	12	8	R1= 20
media	17	3	R2= 20
alta	15	4	R3= 19

C1= 44

C2= 15

n= 59

H₀=> La actividad biológica es independiente de la concentración

H_a=> La actividad biológica no es independiente de la concentración

Frecuencias esperadas

14.9152542 5.084745763 R1= 20

14.9152542 5.084745763 R2= 20

14.1694915 4.830508475 R3= 19

C1= 44

C2= 15

n= 59

Frecuencias observadas-esperadas

-2.91525424 2.915254237

2.08474576 -2.084745763

0.83050847 -0.830508475

Cuadrados

8.49870727 8.498707268

4.3461649 4.346164895

0.68974433 0.689744326

Cuadrados/esperados

0.56979969 1.671412429

0.2913906 0.854745763

0.04867813 0.142789176

Sumatoria

X²= 3.57881579

v= 2

X² tabla= 5.991

Se acepta H₀

Variables: Extractos y Actividad biológica

Extracto	Actividad Biológica		Total
	Bactericida	Bacteriostática	
Hexánico	9	5	R1= 14
AcOEt	15	0	R2= 15
MeOH	10	5	R3= 15
Acuoso	10	5	R4= 15

C1= 44

n= 59

C2= 15

Ho=> La actividad biológica es independiente de la concentración

Ha=> La actividad biológica no es independiente de la concentración

Frecuencias esperadas

10.440678	3.559322034	R1= 14
11.1864407	3.813559322	R2= 15
11.1864407	3.813559322	R3= 15
11.1864407	3.813559322	R4= 15

C1= 44

n= 59

C2= 15

Frecuencias observadas-esperadas

-1.44067797	1.440677968
3.81355932	-3.813559322
-1.18644068	1.186440678
-1.18644068	1.186440678

Cuadrados

2.075553	2.075553002
14.5432347	14.5432347
1.40764148	1.407641482
1.40764148	1.407641482

Cuadrados/esperados

0.19879485	0.583131558
1.30007704	3.813559322
0.12583462	0.369114878
0.12583462	0.369114878

Suma

X2= 6.88546176

v= 3

X2 tabla= 7.815

Ho=>se acepta.

Tabla de contingencia tridimensional para la variable discreta Actividad Biológica *Bacillus cereus*

Frecuencias observadas

Extracto	Actividad bactericida		
	baja	media	alta
Hexanico	0	1	1
AcOEt	0	0	1
MeOH	2	3	3
Acuoso	1	1	2

T1= 15

C1= 12

T2= 26

C2= 14

C3= 16

m = 2

c = 3

Actividad bacteriológica			Total
baja	media	alta	
4	4	4	R1= 14
3	3	2	R2= 9
1	0	0	R3= 9
1	2	2	R4= 9

n2= 1681

n= 41

Frecuencias esperadas

1.49910767	1.74895895	1.87388459
0.96371208	1.12433076	1.20464011
0.96371208	1.12433076	1.20464011
0.96371208	1.12433076	1.20464011

2.5964533	3.03152885	3.24806663
1.67043427	1.94883996	2.08804283
1.67043427	1.94883996	2.08804283
1.67043427	1.94883996	2.08804283

R1= 14

R2= 9

R3= 9

R4= 9

T1= 15

C1= 12

T2= 26

C2= 14

C3= 16

n= 41

Observado-esperado

-1.49910767	-0.74895895	-0.87388459
-0.96371208	-1.12433076	-0.20464011
1.03628792	1.87566924	1.7953599
0.03628792	-0.12433076	0.7953599

1.4015467	0.96847115	0.75193337
1.32956573	1.05116002	-0.08804283
-0.67043427	-1.94883996	-2.08804283
-0.67043427	0.05116002	-0.08804283

Cuadrados

2.24732382	0.56093951	0.76367428
0.92874097	1.26411965	0.04187757
1.07389266	3.51813511	3.22331719
0.00131681	0.01545814	0.83259738

1.96433315	0.93793636	0.5854038
1.78774504	1.1048374	0.00775154
0.4464821	3.79797725	4.35992287
0.4494821	0.00261735	0.00775154

Cuadrados/esperados

1.49910767	0.32072766	0.40753539
0.96371208	1.12433076	0.03476355
1.11432936	3.12909266	2.67575121
0.0013964	0.01374874	0.52513392

0.75596246	0.30939384	0.17407395
1.05825478	0.56697184	0.00371235
0.26908099	1.94883996	2.08804283
0.26908099	0.00134303	0.00371235

Sumatoria de todos los cuadrados/esperados

X2= 19.2680488

v= 17

X2 tabla= 27.587

Ho= actividad, concentración y extractos son mutuamente independientes en la muestra

H1= actividad, concentración y extractos son mutuamente dependientes en la muestra

Se acepta Ho.

El resultado obtenido por la tabla de contingencia tridimensional acepta la hipótesis nula sin embargo alguna de nuestras variables puede estar englobando la frecuencia que presentan las otras dos variables por ello se realizaron tablas de contingencia bidimensionales con las variables.

TABLA DE CONTINGENCIA BIDIMENSIONAL

Variables: actividad biológica y concentración.

Concentración	Actividad biológica		Total
	Bacteriodes	Bacteriostática	
baja	3	9	R1= 12
media	5	9	R2= 14
alta	7	8	R3= 15

C1= 15

C2= 26

n= 41

Ho=> La actividad biológica es independiente de la concentración

Ha=> La actividad biológica no es independiente de la concentración

Frecuencias esperadas

4.3902439	7.609756098	R1= 12
5.12195122	8.87804878	R2= 14
5.48780488	9.512195122	R3= 18

C1= 15

C2= 28

n= 41

Frecuencias observadas-esperadas

-1.3902439	1.390243902
-0.12195122	0.12195122
1.51219512	-1.512195122

Cuadrados

1.93277811	1.932778108
0.0148721	0.0148721
2.28673409	2.286734087

Cuadrados/esperados

0.4402439	0.253986867
0.0029036	0.001675154
0.41669377	0.24040025

Sumatoria

X2= 1.35590354

v= 2

X2 tabla= 5.991

Se acepta Ho

Variables: Extractos y Actividad biológica

Extracto	Actividad Biológica		Total
	Bactericida	Bacteriostática	
Hexánico	2	12	R1= 14
AcOEt	1	8	R2= 9
MeOH	8	1	R3= 9
Acuoso	4	5	R4= 9

C1= 15

n= 41

C2= 28

Frecuencias esperadas

5.12195122

8.87804878

R1= 14

3.29268293

5.707317073

R2= 9

3.29268293

5.707317073

R3= 9

3.29268293

5.707317073

R4= 9

C1= 15

n= 41

C2= 28

Frecuencias observadas-esperadas

-3.12195122

3.12195122

-2.29268293

2.292682927

4.70731707

-4.707317073

0.70731707

-0.707317073

Cuadrados

9.74657942

9.746579417

5.256395

5.256395003

22.158834

22.15883403

0.50029744

0.500297442

Cuadrados/esperados

1.9029036

1.097829

1.59638663

0.920992287

6.72971996

3.882530748

0.15194219

0.087658954

Suma

X2= 16.3699634

v= 3

X2 tabla= 7.815

Ho=>la actividad biológica es independiente del tipo de extracto realizado.

Ha=>la actividad biológica es dependiente del tipo de extracto realizado.

Ho=> es rechazada, se acepta Ha.

Apéndice C

ANÁLISIS PROBIT

* * * * * Análisis Probit del Extracto Hexánico* * * * *

Limites de confianza de la variable "Concentración"

Prob	CONCENTR	Limites de confianza a 95%	
		Inferior	Superior
.01	.97986	.34094	1.35141
.02	1.07691	.42125	1.44229
.03	1.14341	.48144	1.50406
.04	1.19613	.53210	1.55292
.05	1.24080	.57703	1.59435
.06	1.28013	.61809	1.63092
.07	1.31564	.65632	1.66406
.08	1.34828	.69242	1.69467
.09	1.37866	.72682	1.72332
.10	1.40723	.75986	1.75045
.15	1.53195	.91131	1.87172
.20	1.63891	1.04910	1.98126
.25	1.73661	1.17936	2.08816
.30	1.82930	1.30472	2.19803
.35	1.91960	1.42626	2.31549
.40	2.00941	1.54426	2.44501
.45	2.10029	1.65862	2.59134
.50	2.19375	1.76927	2.75965
.55	2.29136	1.87649	2.95582
.60	2.39500	1.98114	3.18697
.65	2.50704	2.08477	3.46253
.70	2.63080	2.18969	3.79629
.75	2.77122	2.29923	4.21021
.80	2.93641	2.41836	4.74260
.85	3.14144	2.55560	5.46884
.90	3.41987	2.72880	6.56806
.91	3.49074	2.77103	6.86842
.92	3.56939	2.81717	7.21154
.93	3.65792	2.86827	7.61004
.94	3.75940	2.92583	8.08283
.95	3.87857	2.99220	8.66003
.96	4.02342	3.07125	9.39363
.97	4.20893	3.17019	10.38484
.98	4.46883	3.30503	11.87215
.99	4.91145	3.52609	14.67375

Los valores de la concentración están en escala logarítmica en todos los análisis Probit.

* * * * * Análisis Probit del Extracto AcOEt * * * * *

Limites de confianza de la variable "Concentración"

Prob	CONCENTR	Limites de confianza a 95%	
		Inferior	Superior
.01	.46392	.29137	.59998
.02	.51496	.33781	.65130
.03	.55021	.37095	.68626
.04	.57831	.39796	.71390
.05	.60223	.42132	.73729
.06	.62336	.44224	.75786
.07	.64250	.46141	.77642
.08	.66013	.47924	.79349
.09	.67659	.49603	.80938
.10	.69210	.51197	.82433
.15	.76020	.58324	.88982
.20	.81906	.64626	.94649
.25	.87319	.70505	.99892
.30	.92483	.76165	1.04949
.35	.97541	.81728	1.09982
.40	1.02596	.87278	1.15117
.45	1.07736	.92878	1.20477
.50	1.13046	.98586	1.26195
.55	1.18618	1.04453	1.32427
.60	1.24561	1.10539	1.39367
.65	1.31016	1.16922	1.47275
.70	1.38181	1.23718	1.56510
.75	1.46354	1.31116	1.67612
.80	1.56025	1.39444	1.81465
.85	1.68107	1.49323	1.99728
.90	1.84647	1.62143	2.26187
.91	1.88881	1.65323	2.33197
.92	1.93589	1.68819	2.41101
.93	1.98902	1.72716	2.50146
.94	2.05009	1.77140	2.60703
.95	2.12203	1.82282	2.73352
.96	2.20977	1.88463	2.89076
.97	2.32264	1.96284	3.09757
.98	2.48164	2.07086	3.39718
.99	2.75464	2.25141	3.93263

* * * * * Análisis Probit del Extracto MeOH * * * * *

Limites de confianza de la variable "Concentración"

Prob	CONCENTR	Limites de confianza a 95%	
		Inferior	Superior
.01	.07813	1.549357E-16	.37019
.02	.12923	5.200053E-14	.48400
.03	.17784	2.080165E-12	.57439
.04	.22612	3.333629E-11	.65390
.05	.27491	3.181411E-10	.72717
.06	.32465	2.168670E-09	.79653
.07	.37561	.00000	.86337
.08	.42799	.00000	.92863
.09	.48194	.00000	.99300
.10	.53760	.00000	1.05705
.15	.84523	.00013	1.38981
.20	1.21105	.00779	1.81381
.25	1.64876	.21061	2.79541
.30	2.17514	1.22836	13.65873
.35	2.81184	1.88288	198.61355
.40	3.58754	2.31877	3067.49946
.45	4.54115	2.72088	45183.74472
.50	5.72680	3.13703	647442.85671
.55	7.22200	3.59066	9344876.82197
.60	9.14169	4.10173	141393862.691
.65	11.66361	4.69388	2350042807.75
.70	15.07776	5.40031	45528501270.5
.75	19.89149	6.27313	1116924851513
.80	27.08076	7.40290	3.945495E+13
.85	38.80133	8.96895	2.518048E+15
.90	61.00481	11.40501	4.705716E+17
.91	68.05013	12.08474	1.664714E+18
.92	76.62900	12.86850	6.568484E+18
.93	87.31538	13.78830	2.971405E+19
.94	101.02133	14.89256	1.603528E+20
.95	119.29782	16.25914	1.096702E+21
.96	145.03775	18.02416	1.049926E+22
.97	184.41302	20.45645	1.687749E+23
.98	253.77814	24.20134	6.772421E+24
.99	419.76256	31.53405	2.280808E+27

* * * * * Análisis Probit del Extracto Acuoso * * * * *

Limites de confianza de la variable "Concentración"

Prob	CONCENTR	Limites de confianza a 95%	
		Inferior	Superior
.01	.11234	1.092980E-38	.42918
.02	.14319	3.380523E-35	.48717
.03	.16702	5.537848E-33	.52817
.04	.18753	2.564524E-31	.56141
.05	.20605	5.805187E-30	.59010
.06	.22325	8.258592E-29	.61576
.07	.23952	8.470011E-28	.63926
.08	.25508	6.808390E-27	.66114
.09	.27011	4.531129E-26	.68175
.10	.28472	2.593502E-25	.70137
.15	.35415	3.551117E-22	.78970
.20	.42121	1.102410E-19	.86937
.25	.48877	1.511546E-17	.94587
.30	.55864	1.252170E-15	1.02245
.35	.63226	7.483154E-14	1.10177
.40	.71108	3.616490E-12	1.18667
.45	.79667	1.533755E-10	1.28096
.50	.89096	6.086545E-09	1.39081
.55	.99641	.00000	1.52800
.60	1.11634	.00001	1.72017
.65	1.25550	.00042	2.05465
.70	1.42097	.01861	3.00839
.75	1.62408	.37860	13.23850
.80	1.88459	1.04520	715.36571
.85	2.24145	1.45065	176150.86426
.90	2.78798	1.79338	219671109.070
.91	2.93884	1.86792	1241893379.92
.92	3.11201	1.94767	8173857976.34
.93	3.31421	2.03469	65045704085.7
.94	3.55560	2.13190	660987146752
.95	3.85245	2.24373	9323251920598
.96	4.23303	2.37748	2.093498E+14
.97	4.75279	2.54687	9.619564E+15
.98	5.54385	2.78290	1.563560E+18
.99	7.06634	3.18614	4.794662E+21