



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Inhibición del crecimiento de fitopatógenos y patógenos del hombre frente al extracto de *Quercus rugosa* Nee.

T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A:
CRUZ MEJIA ANAHY

COLÍN DIRECTORA DE TESIS: M en C. MARÍA DE JESUS SÁNCHEZ

México D.F.

Noviembre 2010

MEXICO D. F
NOVIEMBRE 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Por haberme prestado vida y no olvidar ponerme nada, pero por haberme brindado la familia que ahora tengo la cual me da la satisfacción de todas las metas de mi vida.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Estudios Superiores Zaragoza, por haberme permitido estudiar y crecer académicamente al brindarme el acceso al conocimiento y la cultura; y por enseñarme que “Por mi raza hablará el espíritu”.

Agradezco a mi madre, la M en C María de Jesús Sánchez Colin por el tiempo que me ha dedicado en esta investigación, su confianza, amistad, apoyo y conocimientos brindados.

Agradezco a las doctoras Elvia García Santos, Hortensia Rosas Acevedo y María del Socorro Sánchez García Figueroa quienes fungieron como revisoras de esta tesis por el tiempo brindado y las observaciones que contribuyeron a enriquecer este trabajo.

Al profesor Armando Cervantes Sandoval, quien además de ser uno de los revisores de esta tesis ha constituido un pilar importante para mi formación académica y personal al haberme brindado conocimientos y apoyo durante la realización de la misma así como su transparente amistad durante mi estancia en la facultad.

Agradezco a mi padre, ti Elías por tu incansable e incondicional apoyo durante todo este tiempo, confianza y comprensión.

Y finalmente agradezco a mis contados compañeros pero al final amigos, que en el transcurso de esta gran carrera, de una u otra manera me ayudaron, acompañaron y enseñaron diversas y valiosas experiencias de vida, a los cuales no es necesario mencionar ya que cada uno de ustedes sabe de que manera influyeron en mí.

DEDICATORIAS

Esta tesis esta dedicada íntegramente a mi gran familia:

A mis padres por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de seguir adelante a pesar de todo.

A mi madre Martha , mi Pecas hermosa por haberme dado la vida y el mayor ejemplo de lo que es ser una mujer cabal, exitosa, amorosa, buena madre y compañera. Gracias mami por que a pesar de no ser una excelente hija tu has sido ser siempre una excelente madre, gracias por acompañarme en cada uno de los momentos de mi vida buenos y malos, por hacer de unos cuantos metros de pared un gran hogar y de una hija como yo una profesionista y una persona capaz de hacer lo que se propone con tan solo 10 pesos, pero sobre todo gracias por no soltar el timón del gran barco al que siempre diriges tu familia.

A mi padre Jorge mi chivito que siempre ha sido y será mi héroe gracias papi por que sin un padre como tu no hubiera jamás forjado este carácter que siempre me ha sacado avante, gracias por que has luchado siempre a mi lado como guerrero ante todas las enormes pruebas que esta vida nos ha puesto como padre e hija, por permitirme ser una persona libre de acción y pensamiento , gracias por que simple y sencillamente tu me has enseñado que el cielo es mi meta y que yo decido que tan lejos deseo llegar y te prometo que será muuuuuy lejos.

A el motor y simplemente la razón de mi vida mi hija ALISON por enseñarme que las pequeñas cosas que otorga la vida simple y sencillamente son las mejores si tienes a tu lado a un ser como tú, gracias por que a pesar de no ser una madre de tiempo completo tu has sabido ser una excepcional hija con una gran capacidad de amor y comprensión, gracias por soportar días de stress y ausencia te prometo que compensare cada uno de esos momentos con amor y cuidados y que no dejare de luchar ni un solo día por darte todo lo que mereces alito .

A mis hermanos Yuriko y Jorge por ser parte esencial en este proceso, por los buenos y malos momentos que hemos pasado por ser además de hermanos buenos amigos y por que en ustedes tuve al ser la hermana mayor la necesidad de dejarles pequeña escuela con la firme esperanza de que este logro obtenido esta meta alcanzada sirva como inspiración que los haga crecer académicamente y también haga florecer al mejor ser humano que haya en ustedes mismos.

A el amor de mi vida Elías mi Pachekito por su cariño, amor, apoyo y comprensión durante todo este tiempo, por seguir a mi lado a pesar de todo. Por ser en mi vida el hombre que con dulzura entiende mis palabras y

ama mi locura y el que entrega todo sin pedirme nada. Te amo y espero que juntos con este nuevo paso que daremos cosechemos triunfos y metas como esta.

Los amo con todo mi corazón.

Y finalmente a cada uno de mis familiares que sin duda alguna fomentaron mi desarrollo y contribuyeron en este gran logro a mis abuelas Edna y Narcisa a mis Tíos(gracias Takechi y tía Lupita por todo ese gran apoyo moral que siempre me han brindado y que ha hecho de mi una mejor persona), a mis primos en especial a todos aquellos que nunca se han alejado y nunca han juzgado lo que soy (Chari, Daris, Lucí, , Yesi y Rox,) y a esos dos grandes abuelos Joel Cruz y José Mejia que se nos han adelantado pero se que estarían orgullosos de mi.

INDICE

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO I	4
MARCO TEÓRICO	
1.1 México y las plantas medicinales	4
1.1.1 Plantas medicinales como control biológico de fitopatógenos.....	4
1.1.2 Plantas medicinales y usos en la salud del hombre.....	5
1.2 Plantas medicinales y metabolitos secundarios.....	7
1.2.1 ¿Qué son los metabolitos secundarios?	7
1.2.2 Metabolitos secundarios con efecto antimicrobiano.....	8
1.2.3 Factores que intervienen en la producción de metabolitos secundarios....	9
1.2.4 Extracción de Metabolitos secundarios.....	12
1.2.5 Técnicas para evaluación de metabolitos secundarios.....	12
1.3 Fitopatógenos.....	14
1.3.1 Clasificación de las enfermedades de las plantas.....	14
1.3.2 Control de fitopatógenos.....	15
1.4 Características generales de los fitopatógenos utilizados en este trabajo.....	16
1.4.1 Cepas bacterianas.....	16
1.4.2 Cepas micóticas.....	17
1.5 Microorganismos patógenos del Hombre.....	19
1.5.1 Enfermedades bacterianas.....	19
1.5.2 Enfermedades micóticas.....	19
1.6 Características generales de los organismos patógenos utilizados en este trabajo	20
1.6.1 Cepas bacterias.....	20
1.6.2 Cepas micóticas	21
1.7 Pruebas de sensibilidad bacteriana	23
1.7.1 Agentes antimicrobianos.....	23
1.7.2 Efecto Antimicrobiano.....	24
1.7.2.1 Técnica de Kirby-Bauer.....	24
1.7.2.2. Escala de McFarland	24
1.8 Bosque de Quercus.....	25
1.8.1 Características botánicas de <i>Quercus rugosa</i> Nee.....	26
1.8.2 Importancia y uso	28
1.9 Zona de Muestreo.....	29
CAPITULO II	31
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1 Hipótesis	31
2.2 Objetivo general.....	31
2.3 Objetivos particulares.....	31

CAPITULO III	
MATERIAL Y METODO.	
3.1 Trabajo de gabinete	32
3.2 Trabajo de campo	32
3.2.1 Muestreo Vegetal.	32
3.2.2 Muestreo de suelo.	32
3.3 Trabajo de laboratorio	33
3.3.1 Análisis de suelo.....	33
3.3.2 Preparación del material vegetal.....	33
3.3.3 Obtención del extracto vegetal y del peso seco	33
3.3.4 Preparación de las concentraciones y sensidiscos.....	34
3.3.5 Diseño experimental.....	34
3.3.6 Pruebas de sensibilidad bacteriana.	35
3.3.7 Evaluación de los extractos.....	36
3.3.8 Prueba estadística.....	36
CAPITULO IV	37
RESULTADOS Y DISCUSION	
4.1 Rendimiento del extracto de <i>Quercus rugosa</i> Nee en peso seco.	37
4.2 Microorganismos fitopatógenos inhibidos por las diferentes estructuras y concentraciones del extracto.....	38
4.3 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana en fitopatógenos.	39
4.4 Concentración mínima inhibitoria para organismos fitopátogenos.....	50
4.5 Microorganismos patógenos inhibidos por las diferentes estructuras y concentraciones del extracto.....	52
4.6 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana en patógenos del hombre.	53
4.7 Concentración mínima inhibitoria en patógenos del hombre.....	65
4.8 Análisis del estudio de espectroscopia infrarroja.....	67
4.8.1 Extracto de Corteza.....	67
4.8.2 Extracto de Rama.....	68
4.8.3 Extracto de Hoja	69
4.9 Resultados de las propiedades físicas y químicas del suelo.....	72
CAPITULO V	
CONCLUSIONES.....	73
CAPITULO VI	
RECOMENDACIONES.....	74
APENDICE	75
LITERATURA CITADA	83

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mapa de localización de la zona de muestreo (San Antonio Tlaltecahuacan).....	30
Figura 2. Efecto del extracto de <i>Q. rugosa</i> sobre el cultivo de <i>Pseudomonas marginalis</i> (1H)	40
Figura 3. Efecto del extracto de <i>Q. rugosa</i> sobre el cultivo de <i>Erwinia carotovora</i> (LsN6SS5)	44
Figura 4. Efecto del extracto de <i>Q. rugosa</i> sobre el cultivo de <i>Penicillium spp</i> (JUGO6-MP14(2)).....	48
Figura 5. Efecto del extracto de <i>Q. rugosa</i> sobre el cultivo de <i>Penicillium spp</i> (JUGO6-MP14(3)).....	49
Figura 6. Efecto del extracto de <i>Q. rugosa</i> sobre el cultivo de <i>Mycobacterium phlei</i>	58
Figura 7. Efecto del extracto de <i>Q. rugosa</i> sobre el cultivo de <i>Candida stellatoidea</i>	63
Figura 8. Análisis de espectroscopia de infrarrojo para el extracto de Corteza de <i>Quercus rugosa</i> Nee.....	67
Figura 9. Análisis de espectroscopia de infrarrojo para el extracto de Rama de <i>Quercus rugosa</i> Nee.....	68
Figura 10. Análisis de espectroscopia de infrarrojo para el extracto de Hoja de <i>Quercus rugosa</i> Nee.....	69

INDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Escala de McFarland.....	24
Cuadro 2. Clasificación taxonómica de <i>Quercus rugosa</i> Nee.....	26
Cuadro 3. Propiedades Físicas y Químicas que se determinaran para el análisis del suelo donde crece <i>Quercus rugosa</i> Nee.....	33
Cuadro 4. Cepas de Patógenos del Hombre utilizados para las pruebas microbiológicas.....	34
Cuadro 5. Cepas de Fitopatógenos utilizados para las pruebas microbiológicas	35
Cuadro 6. Rendimiento del extracto de las diferentes estructuras de <i>Quercus rugosa</i> Nee.....	37
Cuadro 7. Inhibición de los microorganismos fitopatógenos por los diferentes extractos (hoja, rama y corteza) a las concentraciones de 120, 200 y 500 mg mL ⁻¹ de <i>Quercus rugosa</i> Nee.....	38
Cuadro 8. Inhibición de los microorganismos patógenos por los diferentes extractos (hoja, rama y corteza) a las concentraciones de 120, 200 y 500 mg mL ⁻¹ de <i>Quercus rugosa</i> Nee.....	52
Cuadro 9. Resultado de las propiedades físicas y químicas del suelo donde crece <i>Quercus rugosa</i> Nee.....	72

INDICE DE GRAFICAS

	Pág.
Gráfica 1. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Pseudomona marginalis</i> (1H).....	40
Gráfica 2. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Pseudomona marginalis</i> (Ls-1).....	41
Gráfica 3. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Pseudomona marginalis</i> (LsMM4).....	42
Gráfica 4. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Erwinia carotovora</i> (4p)...	43
Gráfica 5. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Erwinia carotovora</i> (LsN6SS5).....	44
Gráfica 6. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Sclerotinia spp.</i> (SS).....	45
Gráfica 7. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Sclerotinia spp.</i> (SP).....	46
Gráfica 8. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Sclerotium cepivorum</i> (Sc-As).....	47
Gráfica 9. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Penicillium spp</i> (JUGO6-MP14(2))	48
Gráfica 10. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Penicillium spp.</i> (JUGO6-MP14(3)).....	49
Gráfica 11. Tamaño promedio de halos de inhibición (mm) con las diferentes bacterias fitopatógenas a la concentración mínima inhibitoria del extracto de hoja rama y corteza de <i>Quercus rugosa</i> Nee.....	50
Gráfica 12. Tamaño promedio de halos de inhibición (mm) con los diferentes hongos fitopatógenos a la concentración mínima inhibitoria del extracto de hoja rama y corteza de <i>Quercus rugosa</i> Nee.....	51
Gráfica 13. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Corynebacterium xerosis.</i>	54
Gráfica 14. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>	54
Gráfica 15. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Enterococcus faecalis</i>	55

Gráfica 16.	Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Streptococcus B-hemolítico</i>	56
Gráfica 17.	Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Stapylococcus aureus</i>	57
Gráfica 18.	Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Mycobacterium phlei</i>	58
Gráfica 19.	Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Streptococcus mutans</i>	59
Gráfica 20.	Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Candida albicans</i>	60
Gráfica 21.	Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Candida tropicalis</i>	61
Gráfica 22.	Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Candida krusei</i>	62
Gráfica 23.	Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Candida stellatoidea</i>	62
Gráfica 24.	Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Geotrichum sp</i>	63
Gráfica 25.	Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de <i>Criptococcus neoformans</i>	64
Gráfica 26.	Tamaño promedio de halos de inhibición (mm) con las diferentes bacterias patógenas del hombre a la concentración mínima inhibitoria del extracto de hoja rama y corteza de <i>Quercus rugosa</i> Nee	65
Gráfica 27.	Tamaño promedio de halos de inhibición (mm) con los diferentes hongos patógenos del hombre a la concentración mínima inhibitoria del extracto de hoja rama y corteza de <i>Quercus rugosa</i> Nee	66

RESUMEN

México cuenta con 26 mil especies vegetales de las cuales 5 mil presentan alguna propiedad medicinal, entre ellas están los encinos (*Quercus*), especie de gran importancia ecológica, clave en la formación y conservación de suelos, control de la erosión, infiltración y conservación de mantos acuíferos, mantenimiento de la pureza del aire, control biológico y un sin fin de usos para la industria maderera; independientemente del valor intrínseco que este tipo de vegetación tiene *Quercus rugosa* Nee es una especie con uso medicinal relacionado con problemas bucales y del aparato digestivo. Por ello, en esta investigación se probará su efecto antimicrobiano mediante la inhibición de fitopatógenos y patógenos del hombre.

El sitio de muestreo fue: el poblado de San Antonio Tlaltecahuacan en el municipio de Tlalmanalco, Edo. de México, se llevó acabo la recolecta vegetal (hoja, rama y corteza) de las que se prepararon tinturas por medio de maceración hidroalcohólica (Método Galénico); se obtuvo el extracto en peso seco y se prepararon tres diferentes concentraciones 120, 200 y 500 mg mL⁻¹ que fueron probadas en los siguientes fitopatógenos; Bacterias: *Pseudomona marginalis* (1H), *Pseudomona marginalis* (Ls-1), *Pseudomona marginalis* (LsMM4), *Erwinia carotovora* (4P), *Erwinia carotovora* (Ls-N6SS5); Hongos: *Sclerotinia* spp. (SS), *Sclerotinia* spp. (SP), *Sclerotium cepivorum* (Sc-As), *Penicillium* spp. (JUGO6-MP14 (2)) y *Penicillium* spp. (JUGO6-MP14 (3)). Y los siguientes patógenos del hombre; bacterias: *Corynebacterium xerosis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus beta-hemolítico*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei*, *Streptococcus mutans*; Hongos: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida stellatoidea*, *Cryptococcus neoformans* y *Geotrichum* sp.

El mejor extracto fue corteza en sus tres concentraciones, ya que inhibió a los 13 patógenos del hombre; frente a los fitopatógenos inhibió 5 cepas bacterianas y 3 cepas micóticas; seguida del extracto de rama que a 120 y 200 mg mL⁻¹ inhibió solo a 12 patógenos del hombre y a 500 mg mL⁻¹ inhibió a todos; en cuanto a los fitopatógenos la hoja fue quien tuvo mejores resultados inhibiendo en la concentración de 120 mg mL⁻¹ un total de 6 microorganismos, para la de 200 mg mL⁻¹ 7 y finalmente a los 500 mg mL⁻¹ 8 de los 10 utilizados.

Los espectros de infrarrojo de las tres estructuras mostraron presencia de grupos funcionales como OH (asociados a un alcohol o a cetonas cíclicas) así como compuestos aromáticos, solo difieren en que para la estructura de la hoja se hallaron aldehídos y alcanos; así como la presencia de aldehídos y amidas para el extracto de corteza.

El suelo de *Quercus rugosa* Nee, se determinó como un suelo ácido, con un alto contenido de materia orgánica, arenoso con buena aireación y drenaje, y esta clasificado como andisol.

INTRODUCCIÓN

México es un país con una riqueza natural y una gran variedad de climas, animales y plantas; debido a que se ubica en un área de transición entre las zonas Neártica y Neotropical. Posee una geografía sumamente accidentada, por lo que cada elevación, valle, montaña o cañada presenta condiciones microclimáticas únicas, las cuales propician el desarrollo de una gran variedad de ecosistemas, desde selvas tropicales hasta desiertos y praderas o majestuosos bosques de coníferas. Se estima que a nivel mundial tiene una totalidad de 250 mil especies vegetales de las cuales solo se conoce para nuestro país una vegetación aproximada de 26 mil especies y que de ellas se considera con alguna propiedad medicinal a 5 mil plantas, llevando a la investigación científica a un aproximado de 3500 plantas medicinales, verificando las propiedades que se le atribuyen y descartando las que son inocuas (Aguilar, 2001; Jorge, 2004)

Dentro de esta gran biodiversidad se encuentran los “**bosques de encino**” uno de los ecosistemas más amenazados. Estos bosques, los cuales son llamados encinares están en peligro de extinción; muchos están muy degradados y aunque todavía hay algunos individuos grandes y viejos no existen bosques primarios de encino, la mayoría de los encinares se han convertidos en pastizales, debido al uso local de la madera en construcciones, muebles, postes; pero sobre todo como combustible ya sea directamente o bien transformada en carbón, se suman a estos motivos, la tala clandestina y el desmonte para prácticas agrícolas y fines ganaderos (Rzedowski, 1994).

Más allá de la utilidad que los bosques de encino tienen para la industria maderera y la comunidad, estos representan áreas exclusivas de organismos endémicos de la franja Neovolcánica y en ellos podemos hallar la presencia de principios activos con efectos inhibitorios en el crecimiento microbiano de patógenos (Macías, 2004).

Se ha dado una gran vertiente en la investigación del uso de las plantas medicinales como uso terapéutico y más aún se han realizado estudios de la acción que tienen los distintos principios activos en la rama de estomatología y microbiología por ejemplo, se incluyó información sobre numerosos extractos medicinales preparados a base de plantas como las siguientes: belladona, eucalipto, marihuana y solo un pequeño párrafo sobre pino y encino (Barquín, 1995; Ortiz, 2001).

En 1995 Soto y Sousa establecieron que el macerado acuoso o el cocimiento hecho con la corteza de “encino amarillo” o “encino barcino” se emplea para enjuagues bucales con el propósito de macizar la dentadura (Lozoya, 1999) y Macías en el 2004, utilizó el extracto de *Quercus* sp como agente antimicrobiano sobre algunos patógenos de la cavidad oral.

Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que muchas de las especies de este tipo de plantas, principalmente aquellas en las que su extracto

contiene aceites esenciales, tienen la posibilidad de emplearse como insecticidas y fungicidas naturales sobre insectos plagas y microorganismos que afectan a algunos cultivos. Hewady y colaboradores, indicaron que cuatro aceites esenciales, entre los que se encuentra el proveniente de *Cymbopogon citratus*, mostraron toxicidad contra larvas de dos especies de insectos que constituyen plaga en el algodón, *Pectinophora gossypiella*, Saund y *Earias insulana*, Bosid (Ortiz, 2001).

Ismail en 1994 estudió la actividad inhibitoria contra el potyvirus “y” de la papa, *in vitro* e *in vivo*, de los aceites esenciales de *Pelargonium graveolens*, *Cymbopogon citratus*, *Mentha piperita* y *Mentha spicata*. Todos inhibieron al virus. Otro importante uso de estos aceites fue estudiado evaluándolos como inhibidores de hongos que afectan a los alimentos almacenados.

Es conveniente apuntar que no sólo el aceite esencial contenido en el extracto etanólico de las plantas medicinales ha mostrado tener propiedades fungicidas e insecticidas, sino también el extracto acuoso. Una investigación realizada por Bonkole y Adebajo (1996) con el extracto de las hojas de plantas usadas tradicionalmente como medicinales entre las que se encuentran *Cymbopogon citratus* y *Muhlenbergia lucida*, reportó la inhibición *in vitro* e *in vivo* de cuatro hongos fitopatógenos (*Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani* y *Botryodiplodia theobromae*).

Es por ello que el uso de las plantas medicinales representa la punta de lanza para el desarrollo de investigaciones científicas que tengan como objetivo develar los secretos de estas y validar experimentalmente que una planta medicinal presente los efectos atribuidos en la medicina tradicional.

Todo lo anterior, justifica la investigación de la acción antimicrobiana del extracto del encino, en particular *Quercus rugosa* Nee, que crece en el área natural San Antonio Tlaltecahuacan, localizada en la zona de influencia del Parque Nacional Izta-Popo; con el fin de buscar si el extracto presenta actividad antimicrobiana en agricultura como control biológico de fitopatógenos y sobre patógenos del hombre; de tal forma que estas aplicaciones conformen una razón de peso para el uso razonable de este recurso así como la validación y reconocimiento del uso tradicional de los árboles de encino en la medicina tradicional mexicana.

CAPITULO I MARCO TEÓRICO

1.1 México y las plantas medicinales

Cualquier exposición, acerca de la vida del hombre estaría incompleta sin una reflexión sobre el papel que han desempeñado las plantas. Desde los primeros homínidos hasta las actuales sociedades postindustriales, las distintas culturas han dependido en mayor o menor medida de los recursos vegetales. Ya sea como sustento o como materia prima, las plantas han sido una fuente inagotable de satisfactores (Estrada, 1989). Fue la experiencia, quien guió a nuestros antepasados a encontrar esa convergencia entre el hombre y las plantas que diera como resultado el alivio de sus males haciendo uso de sus plantas nativas; luego la sucesiva verificación de la utilidad de cada planta dio paso al origen de la “Herbolaria Medicinal”. La herbolaria medicinal es entonces el conjunto de conocimientos relativos a las propiedades curativas de las plantas, que aun constituyen el recurso más conocido y accesible para grandes núcleos de la población mexicana (De la Peña, 2006).

De acuerdo a Pitman y Jorgensen (2002) (citados por Mendoza *et al.*, 2007) se estima que en el mundo existen entre 310,000 y 422,000 especies de plantas; y dentro de estas se estiman que existen 20,000 especies vegetales con propiedades de interés para la investigación y que menos del 10% de estas han sido evaluadas en búsqueda de actividad biológica. Actualmente se han registrado en México alrededor de 4000 especies con atributos medicinales (15% de la flora total). Este número coincide con lo informado en varias regiones del mundo por especialistas en la materia quienes consideran que una de cada siete especies posee una propiedad curativa. Sin embargo, se calcula que en México la validación química farmacológica y biomédica solo se ha llevado a cabo en 5% de estas especies (Harvey, 2000; Céspedes *et al.*, 2006).

1.1.2 Plantas medicinales como control biológico de fitopatógenos

Las plagas constituyen la principal limitante de la producción agrícola. Su control se basa, en el uso de productos químicos sintéticos, muchos de los cuales han producido, como efecto secundario, desequilibrio ambiental, problemas de salud humana y el surgimiento de plagas más agresivas y resistentes a ellos. En humanos, existe referencia de una alta incidencia de enfermedades y diversos cuadros clínicos por intoxicación, detectándose elevados niveles de pesticidas en la población (Agrios, 1996; Ramírez, 2001).

Estos problemas han llevado a la búsqueda de alternativas de control de plagas que se inserten en el desarrollo de agrosistemas sostenibles, basados en un manejo integrado del cultivo sin alterar el equilibrio del sistema. Una de estas alternativas es el uso de extractos de plantas que actúan como pesticidas o simplemente como reguladores del desarrollo de los patógenos (Cutler y Schmitterer, 1999).

El efecto fungistático o fungicida de extractos de plantas cultivadas o silvestres ha quedado demostrado en diversas investigaciones (Dubey y Kishore, 1987; Rao *et al.*, 1992; Northover y Schneider, 1993; Awuah, 1994; Pandey y Dubey, 1994; Müller-Riebau *et al.*, 1995; Tewari, 1995; Bianchi *et al.*, 1997; Rodríguez y Montilla, 2002).

La actividad antimicrobiana de los extractos de plantas está asociada a la presencia de metabolitos secundarios. La fracción fenólica de aceites esenciales de varias plantas aromáticas ha mostrado ser tóxica contra *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora capsici* (Müller-Riebau *et al.*, 1995). Los aceites esenciales combinados de *Ocimum canum*, *Chenopodium ambrosioides* y *Lippia alba* también fueron tóxicos contra un amplio rango de hospederos, entre los que estaban *Rhizoctonia solani*, *Alternaria solani*, *Alternaria alternata*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium oxysporum* (Dubey y Kishore, 1987).

Rao y colaboradores (1992), determinaron la fungitoxicidad de los aceites esenciales de la semilla de *Cuminum cyminum* y de los botones florales de *Syzygium aromaticum*, así como que la fracción aldehídica y fenólica de éstos eran los responsables del efecto contra los hongos.

1.1.3 Las plantas medicinales y usos en la salud del hombre

Se define como planta medicinal cualquier vegetal que contenga, en cualquiera de sus órganos, alguna sustancia con actividad farmacológica que se puede utilizar con fines terapéuticos, esta acción benéfica se debe a que contiene ciertas sustancias o metabolitos secundarios que se pueden emplear para obtener nuevos fármacos (Ratera y Ratera, 1980; Kuklinski, 2003).

Las plantas medicinales se utilizaban de muy diversas formas: emplastos, pócmas, sahumeros, vaporizaciones, ungüento y parches. Es por ello que los habitantes de la zona de México contaron con una medicina muy bien organizada (Bown, 1996).

Toda planta medicinal produce en el organismo algunos efectos, que dependen de los metabolitos secundarios contenidos en ellas, a continuación se describen algunas propiedades y efectos terapéuticos más importantes:

Afrodisíacos: son agentes a los que se les atribuye una acción estimulante del deseo sexual, lo podemos encontrar en las plantas como nuez, menta, lúpulo y ginseng (Youngken, 1951).

Amargos: sus efectos terapéuticos son tónicos, digestivos y febrífugos. Se deben usar como medicamentos, pues su abuso puede ser perjudicial para la salud. Se tiene hierba doncella, retama macho y naranjo (Gisbert, 1995).

Analgésicos: alivian o suprimen la sensibilidad al dolor por depresión de los centros nerviosos sensitivos. Las plantas que contienen estos metabolitos secundarios son belladona, opio, ortiga menor, sávila y pimienta (Luna, 2000).

Anestésicos: suprimen temporal, total o parcialmente la sensibilidad al dolor, pues actúan sobre nuestro sistema nervioso como el opio, coca, pie de león. (Lemus, 1998; Luna, 2000).

Antibióticos: agentes producidos por células vivas hongos, bacterias o plantas que destruyen y se oponen a la proliferación de microorganismos. Entre las plantas que contienen metabolitos secundarios son el moho de algunos frutos de naranja y limón, encino, pino, pericón y sávila (Chiereghin, 2000).

Antidiarreicos: combaten las diarreas y los desordenes intestinales y son: el avellano, castaño de indias, malvavisco, rosal silvestre, salvia, arroz hervido.

Antiespasmódicos: combaten los espasmos de los músculos voluntarios e involuntarios y los desordenes nerviosos, como: convulsiones, calambres y síncope. Las plantas que se han ocupado para estos casos son la albahaca, hierba buena, mejorana, menta, naranja y ruda (Youngken, 1951).

Antifúngicos: se encargan de combatir el desarrollo de algunos hongos; ejemplo de estas son el limón, las hojas de nogal, encino, pericón y pino.

Antiinflamatorios: tienen la propiedad de reducir y curar procesos inflamatorios. Las plantas que se han usado para estos casos son violeta, árnica, manzanilla, romero, salvia y papa (Sabatés, 1995).

Diuréticos: estimulan la secreción de orina. Las plantas que poseen propiedades diuréticas son el apio, cerezo, fresno, haba, judías, papa, perejil, rosas silvestre, maíz, y cebolla (Lemus, 1998).

Narcóticos: suprimen el dolor y el malestar e inducen el sueño. En dosis mayores producen un estado reversible de profunda inconciencia ejemplo de ellas son el opio, coca y marihuana (Gisbert, 1995; Ortega y Príncipe, 2005).

Vitamínicos: Contienen los metabolitos secundarios llamados vitaminas y se les encuentra en el tomate, zanahoria, limón, naranja, tamarindo, fresa, granada, sandía, manzana, uva, pera, piña, melocotón; así como todas las verduras que se comen crudas (Sabatés, 1995; Sagrera, 1989).

1.2 Plantas medicinales y metabolitos secundarios.

1.2.1 ¿Qué son los metabolitos secundarios?

Se llama metabolitos secundarios a los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario, es decir en su crecimiento y desarrollo (Kuklinski, 2003).

Los metabolitos secundarios de las plantas intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente; algunos de estos son responsables de olores característicos, causticidad y colores de las plantas; otros comunican a las plantas sus virtudes culinarias, medicinales o venenosas (Trease y Evans, 1987; Lock, 1994). Se diferencian de los metabolitos primarios en que cada uno de ellos tiene una distribución restringida en el reino de las plantas, a veces a sólo una especie o un grupo de ellas.

Estudios biológicos han demostrado que la mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o para atraer a los polinizadores o dispersores de las semillas (Lock, 1994). El reconocimiento de propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo de este campo, en la búsqueda de estos para la fabricación de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Sin embargo, no todos los productos metabólicos tienen propiedades con valor medicinal; en todas las especies están presentes al mismo tiempo metabolitos secundarios y sustancias indiferentes llamadas lastre. Los metabolitos secundarios no se distribuyen de un manera uniforme por toda la planta y esto depende del hábitat en el que las plantas se desarrollen, de la época de su colecta (hora y día); del manejo que se le de a cada planta; así como el tipo de suelo en el que se desarrolle (Domínguez, 1979; Acosta, 2003).

Muchos de los metabolitos secundarios son sumamente complejos y aún se desconoce su naturaleza química; otros han sido aislados, purificados e incluso sintetizados o imitados; hasta ahora se han identificado más de 12,000. Los metabolitos secundarios se pueden dividir en tres grandes grupos (Taiz *et al.*, 2006).

-Terpenoides: es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante, están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. La distribución en las plantas es más restringida, como los que forman los aceites esenciales.

-Compuestos fenólicos: este grupo juega una variedad de roles en las plantas, muchos son productos de defensa contra herbívoros y patógenos, otros proveen soporte mecánico a la planta, otros atraen polinizadores y algunos de ellos absorben la radiación ultravioleta o actúan como agentes alelopáticos.

- Alcaloides: (Compuestos Nitrogenados) los alcaloides poseen una gran diversidad de estructuras químicas. Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina (Kuklinski, 2003; Taiz *et al.*, 2006)

1.2.2 Metabolitos secundarios con efecto antimicrobiano.

Diversos metabolitos secundarios han mostrado tener efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan, 1999).

- **Aceites volátiles:** Tienen propiedades antiinflamatorias, estimulantes, laxantes y antisépticos (Cebrian, 2002).
- **Alcaloides:** Son sustancias que contienen una molécula de nitrógeno (pueden mostrarse muy activas incluso a pequeñas dosis) hidrogeno, carbono y oxígeno. Estos pueden cumplir funciones defensivas frente a parásitos o insectos, ser reguladores del crecimiento vegetal o ser productos de excreción del propio metabolismo vegetal; los podemos encontrar en tegumentos de la semilla, capas externas de la corteza, tallos, raíces y en las hojas (Pahlow, 1985; Schauenberg y Paris, 1980; Jorge, 2004)

Los alcaloides tienen además diferente actividad sobre el Sistema Nervioso Central como por ejemplo la morfina de la adormidera y el opio, que deprimen y producen marcada analgesia; actividad anestésica como la cocaína de las hojas de coca, o los alcaloides como la vincristina del *Catharanthus roseus* que presenta actividad antitumoral que han resultado de gran eficacia en el tratamiento de determinado tipos de cáncer (Trease y Evans, 1987; Jean, 1991)

- **Flavonoides:** Compuestos fenólicos hidrosolubles que son en su mayoría pigmentos responsables de la coloración de numerosas flores y de algunos frutos; participan en la atracción y guía de los polinizadores; así como protectores contra la radiación ultravioleta y defensa ante patógenos. Medicinalmente son útiles para mantener una buena circulación; son antihemorrágicos, antiinflamatorios, antibacterianos, antifúngicos, diuréticos y antiespasmódicos; se hayan en plantas como: espino blanco, cola de caballo, trigo negro, girasol, ortiga blanca y ruda (Hostettman *et al.* , 1995; Elizabeth *et al.*, 1998)
- **Saponinas:** Son heterósidos de azúcar mas aglicón y se caracterizan por su propiedad de producir espuma cuando se agita una solución acuosa. Las hay de dos tipos, triterpénicas y esteroidales. Tienen un efecto expectorante y diurético; son antimicrobianas, antifúngicos, y cicatrizantes (Kuklinski, 2003 Ortega y Príncipe, 2005).

- **Taninos:** Son compuestos hidrosolubles resultado de la combinación de un fenol y un azúcar; se localizan en la corteza y raíces principalmente y en menor cantidad en las hojas. Tienen efecto astringente y antihemorrágico. Los podemos encontrar en el encino, nogal, castaño y madroño (Jorge, 2004; Daniel, 2006).
- **Antocianinas:** Son pigmentos hidrosolubles responsables de la coloración roja, rosa, azul o violeta de las flores y los frutos, algunas veces de las hojas. Estas ejercen una acción antiinflamatoria, antiséptica y vasoprotectora y pueden ser encontradas en el rosal y la zarzamora (Jean 1991).
- **Aceites esenciales:** Son los responsables del olor característicos de las plantas, su papel se basa en la polinización y en la dispersión de las diásporas por su agradable olor para los insectos, además constituyen un medio de defensa contra bacterias, hongos, insectos y herbívoros. Son el resultado de la combinación de un número variable de sustancias orgánicas olorosas; pueden hallarse en todos los órganos vegetales en mayor concentración en las flores y hojas y en menor en raíces, rizomas, corteza, frutos o semillas, estos se encuentran entre el 0.1 al 10% del peso total de toda la planta. Las plantas que contienen este tipo de aceites presentan las siguientes propiedades curativas: antiinflamatorias, expectorantes, diuréticos, antiespasmódicas, tonificantes, antisépticas; entre ellas están manzanilla, menta, anís, eucalipto, canela y clavo (Pahlow, 1985).

1.2.3 Factores que intervienen en la producción de metabolitos secundarios

El contenido de metabolitos secundarios y la relación entre distintos constituyentes en un organismo no son valores estáticos, sino que varían durante la vida de la planta en relación a la interacción de factores internos o externos. La cantidad de los metabolitos secundarios depende esencialmente de si son plantas cultivadas o espontáneas, posteriormente los factores ambientales con los que interactúa la planta; temperatura, humedad, radiación solar, factores topográficos, suelo y factores endógenos (Ratera y Ratera, 1980; Villar, 1999).

A. Efecto de los factores genéticos o endógenos

Cuando las diferencias genéticas son suficientemente grandes pueden ser causa de diferencias no solamente morfológicas sino también de diversidad bioquímica; es decir pueden dar diferencias en las características y el tipo de constituyentes producidos. Siempre que ocurren tales diferencias bioquímicas cada tipo particular es denominado "variedad fisiológica".entre las que encontramos: mutaciones, poliploidismo e hibridación (Bruneton, 1991; Evans, 1991; Kuklinski, 2003).

B. Efectos ecológicos o exógenos

Plantas cultivadas y espontáneas

Las plantas medicinales cuando se intentan cultivar presentan claras ventajas sobre la flora espontánea;

- a) Se obtiene materia prima abundante, homogénea y de alta calidad.
- b) Se controlan las variables que pueden afectar a la producción (selección de climas apropiados, aporte de nutrientes al suelo, control de plagas) y, por lo tanto, mejora el rendimiento en los metabolitos secundarios; y
- c) Se obtienen vegetales en igual estadio de desarrollo lo que facilita la recolección, secado y extracción de principio activo (Villar, 1999).

Clima

El clima condiciona en gran medida el establecimiento de un determinado tipo de cultivo en una región, ya que no solo afecta al crecimiento y desarrollo de la planta, sino que incide en la biosíntesis de sus principios activos. Se ha comprobado como las mismas plantas, cuando son cultivadas en zonas de diferentes climatologías, presentan distinta composición química, tanto en calidad como en cantidad (Villar, 1999; Trease y Evans, 1987).

Temperatura

La temperatura es el factor de mayor importancia en el control y desarrollo del metabolismo de las plantas; aunque cada especie ha llegado a adaptarse a su propio entorno natural; en tiempo nublado por ejemplo la cantidad de hidratos de carbono producidos por las hojas esta en proporción a la intensidad luminosa recibida; la abundancia de hidratos de carbono sirve como materia prima para la biosíntesis de otros componentes secundarios. Los aumentos de temperatura pueden también afectar las reacciones, las temperaturas bajas tienden a bajar la velocidad de las reacciones enzimáticas. Un aumento de la temperatura aumenta más la velocidad de una vía biosintética que de otra, lo que provoca un desbalance en la producción y acumulación de algunos metabolitos secundarios (Tayler, 1979).

Humedad (Lluvia)

Se han citado resultados variables respecto a la producción de esencias bajo diferentes condiciones de lluvia y, en algunos casos una lluvia continua puede llegar a una pérdida de sustancias hidrosolubles de las hojas y raíces por maceración, hecho conocido y aplicable a algunas plantas productoras de alcaloides (especialmente de Solanáceas), heterósidos e incluso esencias. Por lo tanto el grado de hidratación del suelo y de la atmósfera incide directamente en el buen desarrollo de las plantas. El exceso y la escasez de agua en el suelo pueden ser entonces factores limitantes para el crecimiento y el metabolismo de determinadas plantas medicinales (Evans, 1991; Bruneton, 1991).

Radiación solar

La luz es indispensable para las plantas verdes, pues es la que suministra la energía necesaria para que se efectúe la síntesis clorofílica, cada planta necesita una determinada cantidad de luz para alcanzar un buen desarrollo y para poder realizar sus funciones metabólicas (Taiz *et al.*, 2006).

Factores edafológicos

Las diferentes especies vegetales varían enormemente en cuanto a sus requerimientos de suelos y de nutrientes. Este aspecto ha sido objeto de considerable atención respecto a las plantas medicinales; como las propiedades físicas y químicas (Trease y Evans, 1987; Villar, 1999).

a) Características físicas: la textura y la estructura unidas a la composición química del suelo confieren a este caracteres como son: porosidad y grado de aireación, capacidad de retención de agua y temperatura. Estas características pueden afectar positiva o negativamente la producción de ciertos metabolitos secundarios.

Las variaciones, en cuanto al tamaño de las partículas en los diferentes suelos, es un factor que influye en la capacidad de retención de agua, y ciertas plantas que producen mucílagos como producto que retiene agua, contienen menos mucílago cuando crecen sobre un suelo de alto contenido en humedad (Bruneton, 1991; Kuklinski, 2003).

b) Características químicas: la composición química del suelo puede afectar no solo el desarrollo y, por lo tanto, a la composición química de los metabolitos secundarios, sino también puede ser un factor que limite su crecimiento.

El pH del suelo, que depende de la composición del mismo, es una importante variable a tener en cuenta; existen plantas preferentemente acidófilas y plantas que requieren suelos alcalinos para su desarrollo. También es importante la riqueza de materia orgánica, debido a que esta es la que nutre al suelo (Villar, 1999).

Altitud o latitud

El relieve ejerce una influencia marcada sobre las condiciones térmicas originando climas locales especiales; el efecto de la latitud es importante para la producción de grasas por la planta. Las grasas de las plantas tropicales poseen una mayor cantidad de ácidos grasos saturados que los de las plantas de climas subtropicales; los ácidos grasos obtenidos de plantas que crecen en zonas templadas contienen más insaturaciones y la máxima insaturación aparece en grasas de plantas de clima frío. Cuando una misma planta crece en varias latitudes los aceites resultantes tienen diferente insaturación (Villar, 1999).

1.2.4 Extracción de metabolitos secundarios.

Existen diferentes procedimientos para llevar a cabo la extracción de metabolitos secundarios entre los procesos extractivos más comunes tenemos:

- **Decocción:** proceso por el cual la planta se hierve en agua durante un período de tiempo determinado; es utilizado para extraer el principio activo de estructuras duras de la planta como son la corteza, hojas coriáceas, raíces y tallos (Alesón, 2004).
- **Infusión:** en esta técnica se deja calentar agua hasta el primer hervor se agrega la planta y se deja reposar; al enfriarse se filtra. Se utiliza para estructuras blandas como las flores y las hojas (Luna, 2000).
- **Maceración:** consiste en mantener la planta sumergida en un líquido (agua, alcohol, vinagre, etc.) a temperatura ambiente por un tiempo determinado y así extraer las sustancias solubles. Esta técnica se utiliza para cualquier estructura de la planta (Lemus, 1998).
- **Tinturas:** en esta técnica la estructura de la planta se sumerge en alcohol aproximadamente de una a dos semanas, no olvidando agitarla por lo menos dos veces al día. Posteriormente se realiza la extracción a través de la lixiviación de la materia prima para eliminar todas las impurezas; el líquido obtenido será la tintura (De la Fuente *et al.*, 1998; Ticli, 2005).
- **Destilación:** en este procedimiento se van separando o extrayendo los componentes de una mezcla líquida por vaporización de la misma. Con el calentamiento se desprenden primero los componentes más volátiles quedando como residuo las sustancias de punto de ebullición más alto (Umland, 2000; Jorge, 2004).

1.2.5 Técnicas para evaluación de metabolitos secundarios.

Para llevar a cabo la evaluación de la naturaleza química de los metabolitos secundarios de las plantas medicinales existen variadas técnicas; entre las más conocidas y utilizadas están:

Cromatografía: engloba a un conjunto de técnicas (basadas en el principio de adsorción selectiva) cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla y en algunos casos identificar estos si es que no se conoce su composición. Las técnicas cromatográficas son muy variadas (por fragmentación; adsorción; intercambio iónico y con filtración en gel), pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido fijado en un sólido.

Los componentes de la mezcla interaccionan en distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil (Skoog, 1994; Harold, 2001).

Resonancia magnética nuclear (RMN): es un fenómeno físico basado en las propiedades magnéticas que poseen los núcleos atómicos. La RMN permite alinear los campos magnéticos de diferentes núcleos en la dirección de un campo magnético externo. La respuesta a este campo externo depende del tipo de núcleos atómicos, por lo que esta técnica puede utilizarse para obtener información sobre una muestra. La RMN hace uso de las propiedades de resonancia aplicando radiofrecuencias a los átomos o dipolos entre los campos alineados de la muestra, y permite estudiar la información estructural o química de una muestra. La RMN se utiliza también en el campo de la investigación de ordenadores cuánticos. Sus aplicaciones más frecuentes se encuentran ligadas al campo de la medicina, la bioquímica y la química orgánica (Bovey y Jelinski, 1988; Pedrozo y Torrenegra, 2001).

Espectroscopia infrarroja (Espectroscopia IR): es la rama de la espectroscopia que trata con la parte infrarroja del espectro electromagnético. Esta cubre un conjunto de técnicas, siendo la más común una forma de espectroscopia de absorción. Así como otras técnicas espectroscópicas, puede usarse para identificar un compuesto e investigar la composición de una muestra. En sistemas orgánicos se aplica como técnica analítica cuantitativa y cualitativa.

El análisis infrarrojo desde el punto de vista cualitativo, se emplea para determinar la presencia o ausencia de grupos funcionales específicos en una mezcla de reacción.

En esta técnica los espectros de la muestra pueden ser registrados en modo de transmitancia o absorbancia. Cada compuesto químico tiene asociado un espectro infrarrojo característico (Conley, 1979; Rubio y Segade, 1985).

Espectrometría de masas: esta técnica permite obtener la masa molecular de una sustancia e información de sus características estructurales; con base en un patrón de fragmentación relativamente específico de cada sustancia por medio de la comparación del espectro de masas con los almacenados en una base de datos y con ello es posible identificar la sustancia (Pedrozo y Torrenegra, 2001).

En caso de tratarse de una nueva molécula se debe de realizar un análisis fotoquímico el cual tiene como objetivo determinar los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal a estudiar, aplicando para ello una serie de técnicas de extracción, de separación y purificación y de determinación estructural (ultravioleta (UV) Infrarrojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas) (Hartmann, 2007).

1.3 Fitopatógenos

Las enfermedades de las plantas han sido conocidas desde la antigüedad, pero generalmente eran atribuidas a fuerzas sobrenaturales. La primera enfermedad vegetal para la que se describió un origen patológico fue la caries o carbón del trigo. En promedio cada tipo de cultivo puede ser infectado por un centenar o más de enfermedades (Agrios, 1996).

1.3.1 Clasificación de las enfermedades de las plantas

Las enfermedades de las plantas se pueden clasificar de acuerdo al efecto sobre el cultivo en:

- Aniquiladoras: destruyen rápida y completamente un cultivo en un área de modo que solo quedan unos cuantos supervivientes.
- Limitante: aquellas cuya presencia hace incosteable la producción de ciertos cultivos en un área determinada.
- Devastadoras: atacan de forma destructiva los cultivos anuales.
- Debilitantes: causan efectos negativos aunque los síntomas son a veces imperceptibles (De la Isla, 1994; Agrios, 1996).

Sin embargo, el criterio más útil es el tipo de agente patógeno que la ocasiona de acuerdo con ello las enfermedades de las plantas se clasifican de la siguiente manera:

I) Enfermedades infecciosas o bióticas de las plantas ocasionadas por:

1. Hongos.
2. Procariontes (bacterias y micoplasmas).
3. Plantas superiores.
4. Virus y viroides.
5. Nemátodos.
6. Protozoarios.

II) Enfermedades no infecciosas o abióticas ocasionadas por:

1. Temperaturas extremas.
2. Humedad extrema.
3. Variación de pH.
4. Luz extrema.
5. Deficiencia de Nutrimentos.
6. Contaminantes (compuestos orgánicos, metales pesados) (Dickinson, 1987; Agrios, 1996).

1.3.2 Control de fitopatógenos

Los métodos que más se utilizan para controlar las enfermedades de las plantas en el campo y en el invernadero y, a veces en el almacén, consisten en el uso de compuestos químicos que son tóxicos para los fitopatógenos inhiben su germinación, crecimiento, o reproducción, o bien son letales para el. Dependiendo del tipo de fitopatógeno que afecten, los compuestos químicos se denominan como fungicidas, bactericidas, nematocidas, viricidas o en el caso de plantas superiores parásitas, herbicidas. (Agrios, 1996).

El combate de este tipo de enfermedades es difícil y las estrategias utilizadas actualmente son poco efectivas; la rotación de cultivos no es eficaz; el combate químico no es una técnica económica además de el riesgo de degradación de los productos en el suelo que conlleva, por otro lado no es posible una adecuada cobertura de los sitios de infección lo que provoca la presencia de residuos sobre las partes comestibles y contaminación ambiental (Granados, 2005).

Una alternativa de control biológico es el la actividad antifúngica de los extractos vegetales, penosamente ha sido poco estudiada; pero la resistencia a los distintos funguicidas comerciales utilizados normalmente en el control de enfermedades de cultivos ha estimulado en los últimos años la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas. Dada la efectividad de las plantas como fuente medicinal se han planteado estudios para evaluar la actividad antimicrobiana ante fitopatógenos.

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades en el marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa promisoría, debido a su elevada efectividad, bajo costo y no ser contaminantes del ambiente. (Tagliaferro , 2002).

1.4 Características generales de los fitopatógenos utilizados en este trabajo

Para realizar el trabajo se contó con una batería de las siguientes cepas:

- Bacterianas: (*Pseudomona marginalis* (1H), *Pseudomona marginalis* (Ls-1), *Pseudomona marginalis* (LsMM4), *Erwinia carotovora* (4P), *Erwinia carotovora* (Ls-N6SS5) .
- Micóticas: (*Sclerotinia spp.* (SS), *Sclerotinia spp.* (SP), *Sclerotium cepivorum* (Sc-As), *Penicillium spp.* (JUGO6-MP14(2)) y *Penicillium spp.* (JUGO6-MP14(3)); cuyas características generales son:

1.4.1 Cepas bacterianas

Se conocen alrededor de 1,600 especies de bacterias patógenas y más de 80 son bacterias fitopatógenas, aunque se estiman alrededor de 200 incluidas en los patovares (Agrios, 1996).

Cerca de una mitad de las bacterias patógenas de plantas pertenecen al género *Pseudomonas*, una tercera parte al género *Xanthomonas* y una octava parte al género *Erwinia* (Roberts *et al.*, 1978; De la isla, 1994).

Las características específicas de las bacterias fitopatógenas son: la mayoría son saprofitas facultativas, su proliferación es por fisión binaria, producen enzimas extracelulares, todas tienen forma de bastón (bacilos), la mayoría poseen flagelos, casi todas son móviles, todas son aerobias o anaerobias facultativas. Todas son Gram negativas con excepción del género *Clavibacter* (Roberts *et al.*, 1978, Agrios, 1996).

Pseudomona marginalis

Este género muestra una gran diversidad metabólica, y consecuentemente son capaces de colonizar un amplio rango de nichos se encuentra normalmente en las superficies de las plantas en la rizosfera y en suelos agrícolas (Bender, 1999).

Algunos de los síntomas más típicos de enfermedades causadas por estas bacterias son: podredumbres de tejidos de reserva y tejidos blandos de hojas y tallos, afectan los canales que conducen el agua en las plantas y los matan por medio de toxinas, a consecuencia de esto la planta se enferma y demuestra síntomas de marchitez "wilt" o tizón "blight". Si la bacteria mata las células foliares causa una mancha foliar normalmente de color oscuro; otros síntomas pueden ser: reducción en el crecimiento o enanismo de la planta, cambios en color de verde a marrón o negro. Sus principales hospederos son: apio, coliflor, clavel, girasol, lechuga, tomate, tabaco, frijol, durazno, papa (Smith, 1992).

Erwinia carotovora

Erwinia carotovora es un importante patógeno de las plantas; perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, provoca la pudrición suave del ajo, apio, camote, cebolla y zanahoria, entre otras. Es una bacteria muy común en el suelo o en la rizosfera, requiere de humedades superiores al 90%; se caracteriza por tener un amplio rango de hospedantes atacando principalmente los tejidos blandos (García; 2000). *Erwinia carotovora* es considerado un patógeno débil porque requiere heridas para poder penetrar, es incapaz de penetrar las células vivas, pero produce sustancias que terminan por matarlas y desintegrarlas (Kunstmann *et al.*, 2006).

1.4.2. Cepas micóticas

Existen alrededor de 100,000 especies de hongos, de las cuales más de 8,000 producen enfermedades en las plantas. (Agrios, 1996). A diferencia de otros patógenos, los hongos presentan mayor variedad de formas, funciones y ciclos de vida (Anónimo, 1988).

De manera general, los hongos fitopatógenos son organismos microscópicos, eucariotas, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila, tienen pared celular de quitina, celulosa o ambos, lo cual les permite tener un alto grado de interacción con el sustrato; en el caso de los hongos fitopatógenos eso tiene gran importancia, tanto para la absorción de nutrimentos como para la secreción de enzimas y metabolitos. Su nivel de parasitismo fluctúa de saprofitismo facultativo a parasitismo obligado (Dickinson *et al.*, 1987).

Sclerotinia sp

Sclerotinia es un hongo ascomicete, fitopatógeno, necrotrófico que causa un gran número de enfermedades en los cultivos, como así también en plantas no cultivadas. Es cosmopolita y tiene una amplia distribución ecológica, aunque es más común en las regiones templadas. Provoca enfermedades como moho blanco, marchitamiento o pudrición del tallo y puede atacar más de 360 especies de plantas. Algunos de los cultivos más frecuentemente afectados son, frijol, apio, cilantro, melón, calabaza, soya, tomate, lechuga, pepino y cítricos en general (Purdy, 1979).

Las lesiones provocadas por esta especie se producen cerca de los frutos, tallos y hojas y son ligeramente hundidas, ovaladas o alargadas, extendiéndose hacia arriba por el tallo. La rotación con cultivos no susceptibles, junto con la remoción y destrucción de las plantas infectadas, ayuda a reducir la incidencia de esta enfermedad (Kimati, *et al.*, 1995; Tu, 1997).

Sclerotium cepivorum.

Es considerado un hongo parásito débil con características de saprofito facultativo, de aparición frecuente en plantas de las regiones templada y tropical y causal de la Pudrición Blanca.

Este patógeno está incluido taxonómicamente dentro de la clase Deuteromycetes, en el Orden o Grupo Especial Micelia Sterilia el cual recientemente ha sido denominado como Orden Aganomycetales (Luna, *et al.*, 2003). Este hongo causa la pudrición de las raíces y las partes externas de los bulbos cercanos al suelo; en la planta, los primeros síntomas que se observan son un amarillamiento apical que, con el tiempo se distribuye en todo el área de las hojas en forma descendente, hasta causar necrosis y muerte del tejido, ocasionando la caída de las hojas inferiores. En los bulbos se puede apreciar la formación de un micelio blanquecino y una vez que este madura, se observan los esclerocios esféricos, de color negro y sumamente pequeños.

Esta enfermedad puede afectar plantas en cualquier estado de desarrollo y se incrementan conforme se desarrolla el sistema radical (Moreno *et al.*, 2002; Luna *et al.*, 2003; Granados, 2005).

Penicillium sp.

El *Penicillium* es un género grande y encontrado casi por todas partes, y siendo comúnmente el género de hongos más abundante en suelos se desarrollan sobre los más diversos substratos: granos, paja, cueros o frutas.

La fácil proliferación de los *Penicillium* en las plantas es un problema. Las especies de penicilios producen varios metabolitos secundarios (toxinas), entre ellos ácido ciclopiazónico, ácido penicílico, citrinina, penitrem, entre otras todas estas substancias son originadas por los hongos para afianzarse en su ambiente natural inhibiendo a otros organismos que compiten por el substrato y pueden hacer a la planta no comestible o aún peligrosa (Trapero, 1996).

Las colonias de *Penicillium* son circulares si no hay impedimento alguno para su crecimiento. Éste es generalmente blanco, pero en algunas especies es amarillo, anaranjado, púrpura o pardo claro. La superficie de la colonia madura, puede ser aterciopelada o ligeramente algodonosa (Gams, 1987).

Las pudriciones al principio tienen el aspecto de manchas blandas, aguanasas, ligeramente decoloradas y de tamaño variable, las cuales pueden aparecer en cualquier parte del fruto. Estas manchas son superficiales al principio, pero se hundan con rapidez y, a la temperatura ambiente, gran parte del fruto o todo el fruto se descompone en tan solo unos cuantos días.

Afectan a todo tipo de cítricos, manzanas, peras, membrillos, uvas, cebollas melones y muchos otros frutos y hortalizas (Agrios, 1996).

1.5 Microorganismos patógenos del Hombre

El hombre a través de su historia, ha superado muchos problemas para su existencia; sin embargo no ha podido desalojar la enfermedad. Desde el nacimiento hasta la muerte, nuestro cuerpo es habitado por cientos de especies bacterianas y de hongos. Algunos hacen del cuerpo humano su hogar permanente, y otros residen en él solo temporalmente, aunque son inocuos.

En realidad la diferencia no es tan clara, por que el estado de salud del hospedero es crítico para determinar si se producirá enfermedad o no (Ingraham, 1998). Los organismos que producen las enfermedades reciben el nombre de patógenos y entre los más comunes en el hombre están los causantes de enfermedades bacterianas y micóticas

1.5.1 Enfermedades bacterianas

Unas 200 especies de bacterias son patógenas del hombre, es decir, que pueden provocar enfermedades graves, como el cólera, la tuberculosis, la fiebre tifoidea, la lepra y la neumonía, principalmente produciendo toxinas o destruyendo los tejidos (Murray *et al.*, 1997).

Un organismo infeccioso puede entrar en el cuerpo de varias maneras: puede ser inhalado en forma de aerosol (como sucede con muchos virus causantes de resfriados y gripes); ingerido en aguas y alimentos contaminados (como el agente causal del cólera y las bacterias del género *Salmonella*); inyectado por un insecto hematófago (como los microorganismos responsables de la malaria y de la tripanosomiasis o enfermedad del sueño); la severidad de la infección depende de la virulencia y la cantidad de los organismos infecciosos (Murray *et al.*, 1997; Ingraham, 1998).

1.5.2 Enfermedades micóticas

Muchos de los hongos que ocasionan infecciones viven asociados a los seres humanos como comensales o están presentes en el entorno. Las infecciones micóticas se denominan micosis, en general se pueden dividir en superficiales (afectan a la piel, uñas, cuero cabelludo o membranas mucosas) y sistémicas (afectan a tejidos y órganos más profundos) (Duerden; 1993).

Uno de los factores que han colaborado a la disminución de las micosis ha sido la utilización generalizada de antibióticos de amplio espectro, que eliminan o reducen las poblaciones de este tipo de agentes micóticos (Ingraham; 1998).

1.6 Características generales de los organismos patógenos utilizados en este trabajo

Para realizar el trabajo se contó con una batería de 7 cepas bacterianas y 6 micóticas cuyas características generales son las siguientes:

1.6.1 Cepas bacterias

Corynebacterium xerosis

Se trata de una bacteria grampositivo, esta puede ser localizada en las membranas mucosas de la piel, el tracto respiratorio alto, en el gastrointestinal y urogenital. Es causante de infecciones humanas que incluyen bacteriemia clínica, endocarditis, neumonía y osteomielitis vertebral (González y Cameros, 1996).

Enterococcus faecalis

Flora normal del intestino grueso, sin embargo causa infecciones en el tracto genitourinario y en sistema cardiovascular. Está compuesto por cocos grampositivos dispuestos en parejas y cadenas cortas; se encuentran principalmente en el tracto respiratorio alto y el intestino delgado, pero en mayor cantidad en el intestino grueso. Es causante de infecciones en el tracto urinario y son capaces de causar endocarditis bacteriana, infecciones de heridas eternas y mediastinitis (Bailón *et al.*, 2005).

Escherichia coli

Bacteria con forma de bastón, gramnegativo, móvil, anaerobio y facultativo; está considerada como el material biológico más utilizado en experimentación, es un organismo adecuado para la investigación por su crecimiento rápido y porque su cultivo es sencillo, ha facilitado descubrimientos muy importantes sobre metabolismo, reproducción celular e ingeniería genética. Se localiza principalmente en el tracto urinario o en el tracto gastrointestinal, puede participar en la sepsis bacteriana, meningitis neonatal, infección del tracto urinario y gastroenteritis (Ronald y Richard, 2002).

Mycobacterium phlei

Son células compuestas por bacilos rectos o curvos que se ramifican o forman filamentos grampositivo. Se encuentra en el ambiente, en animales de sangre fría y caliente. Es micelial, causante de la tuberculosis y la lepra. (Stuart, 2000).

Staphylococcus aureus

La bacteria *Staphylococcus aureus* es un patógeno común en el ser humano que se localiza principalmente en las mucosas y la piel. Puede originar accesos en la piel además de provocar osteomielitis, endocarditis y otro gran número de infecciones. Es un grampositivo unicelular que causa enfermedad mediante la producción de toxinas o invasión directa y destrucción del tejido. Se puede adquirir en hospitales mediante alguna intervención quirúrgica pues estos se encuentran en el aire (Murray *et al.*, 1997).

Streptococcus – β – hemolítico

Puede estar presente en grandes números como componentes de la flora normal, pero bajo ciertas circunstancias puede estar asociado con infecciones o ser el responsable principal de las mismas. Generalmente pueden demostrarse por la producción de hemólisis en los medios que contienen sangre. *Streptococcus – β – hemolítico* pertenece a los grampositivos y es responsable de las infecciones humanas; como la erisipela, fiebre puerperal e infecciones generalizadas, endocarditis bacteriana, faringitis (Koneman, 1999).

Streptococcus mutans

Es un grampositivo unicelular, forma cocos en cadena, sus colonias son grandes y mucoides ligeramente azules; se encuentra presente dentro de la cavidad oral, nasofaringe grietas gingivales, tracto gastrointestinal, tracto genital femenino y ocasionalmente en la piel.

Este puede provocar fiebre reumática, endocarditis bacteriana, faringitis, participa en la formación y la patogéna de la caries dental. Se considera como el principal agente criogénico y formador de la placa dental (Zinsser, 1998).

1.6.2 Cepas micóticas (patógenas del hombre)

Cándida albicans

Las candidas son un grupo de hongos primitivos, miembros de la familia *Cryptococcaceae*, muy esparcidos por la naturaleza. Las infecciones por *Candida* consisten en micosis, son organismos patógenos oportunistas capaces de causar infecciones profundas. *Candida albicans* se considera como miembro de la flora normal de las mucosas de la boca, la faringe, las fosas nasales y la vagina. Se considera como un hongo oportunista pues da origen a la candidiasis o moniliasis, en individuos débiles y diabéticos, infecciones crónicas o agudas, pueden afectar cualquier parte del cuerpo (Murray, *et al.*, 1997; Zinsser 1998).

Cándida krusei

Forma hifas verdaderas, crecen en forma de colonias de levadura de color blanco opaco. Dentro de las enfermedades que genera están la endocarditis, vaginitis y candidiasis (Koneman, 1999).

Cándida stellatoidea

Puede producir blastoporos, pseudohifas, tubos germinales y rara vez clamidosporos. Ocasionalmente produce infecciones como la endocarditis o diarreas infantiles, afecta la piel (intertrigo, paroniquia y onicomicosis) (Granados y Villaverde, 1998).

Cándida tropicalis

Blastoconidios distribuidos esparcidamente a lo largo de las pseudohifas, ausencia de clamidosporas, produce micelios pero nunca tubos germinales. Provoca infecciones tales como; mucocutáneas: boqueras, perianal, la endocarditis o diarreas infantiles (Braude y Davis, 1984).

Cryptococcus neoformans

Microorganismo ovalado a esférico, de gemación única, de paredes gruesas y semejantes a una levadura, rodeados por una cápsula ancha, refrigerante y gelatinosa. La criptococosis es una micosis que afecta primeramente pulmones, produciendo una enfermedad que generalmente cursa en forma asintomático pudiendo diseminarse a cualquier órgano, particularmente a meninges y sistema nervioso central donde produce una meningitis subaguda o crónica (Murray, *et al.*, 1997).

Geotrichum sp

Este hongo produce micelios tabicados y se reproducen de manera asexual por medio de conidios que no se hallan dentro de un estroma altamente especializado. En el organismos humano se han aislado del aparato respiratorio, cavidad bucal y aparato digestivo, pero también se ha encontrado en otras partes del cuerpo, este organismo patógeno causa graves lesiones sobre todo a nivel bucal (Koneman, 1999).

1.7 Pruebas de sensibilidad bacteriana

Las pruebas de sensibilidad son técnicas que permiten evaluar la actividad de distintos agentes antimicrobianos frente a un microorganismo; estas permiten saber que tan susceptible es ante un antibiótico con el fin de implementar la terapia más efectiva. La prueba más utilizada es el antibiograma, esta es una técnica estandarizada que da resultados en cuanto a sensibilidad y resistencia del patógeno *in vitro* e *in vivo* a un antibiótico; el objetivo de este es medir la sensibilidad de patógeno a uno o varios antibióticos (Ramírez-Gama *et al.*, 2003; Beedson, 2002).

1.7.1 Agentes antimicrobianos

Los agentes microbianos son sustancias naturales (sintetizadas por hongos o bacterias), sintéticas o semisintéticas capaces de inhibir el desarrollo o de destruir los microorganismos patógenos infecciosos. Pueden dividirse en dos grupos: Quimioterapéuticos: son los que impiden el crecimiento bacteriano, compitiendo con intermediarios metabólicos y los Antibióticos: son de uso sistémico pueden reducir y controlar la presencia de microorganismos contaminantes del huésped y son administrados por ingestión oral, uso tópico o inyectados.

Estos agentes tienen diferentes mecanismos de acción: alteración de la membrana celular, interfiriendo en la biosíntesis de proteínas, inhibiendo la síntesis de DNA y por competitividad (González de Buitrago, 1997). En los estudios de sensibilidad antimicrobiana se utilizan los siguientes parámetros:

Concentración mínima inhibitoria: (CMI) se refiere a la menor concentración de la sustancia antimicrobiana con la que se inhibe la proliferación de un determinado microorganismo (Levinson y Ernest, 1992).

Concentración mínima letal: (CML) es la menor concentración de la sustancia antimicrobiana con la que no quedan microorganismos viables de una determinada cepa (Granados y Villaverde, 1998).

Resistencia: aquella que presenta un microorganismo ante un antimicrobiano cuando su sensibilidad es muy pequeña, de forma que se necesita una elevada concentración del agente antimicrobiano para impedir su crecimiento (Duerden; 1993).

Sensibilidad: es la concentración de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo (Sacsquispe y Velásquez, 2002).

1.7.2 Efecto Antimicrobiano

Una vez efectuada la identificación del microorganismo, se aplican pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos. Se han descrito tres pruebas de gran valor para la determinación rutinaria de los antibióticos la de diluciones seriadas en un medio líquido, la de diluciones seriadas en un medio sólido y la de difusión en placa que utiliza el método de Kirby- Bauer el cual permite determinar la sensibilidad del microorganismo a diferentes antibióticos y es el más ampliamente usado (Duerden, 1993).

1.7.2.1 Técnica de Kirby-Bauer

Es empleada para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a fármacos específicos

Forma de aplicación: sobre la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton (medio de cultivo rico, diseñado para hacer ensayos de sensibilidad) se inocula una cantidad estandarizada de bacterias, sembrándolas en forma pareja para obtener después de la inoculación un "césped" bacteriano. A continuación se colocan discos de papel filtro impregnado con concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos. El antibiótico difundirá desde el papel filtro al agar en forma radial. Se incuba la placa durante determinadas horas y a determinada temperatura (dependiendo del agente microbiano), luego se miden los halos de inhibición de desarrollo y se interpretan de acuerdo a tablas confeccionadas previamente (Koneman, 1999; Granados y Villaverde, 1998; Ingraham, 1998).

1.7.2.2. Escala de McFarland

A través de esta se originara una turbidez de la reacción entre ácido sulfúrico con cloruro de bario que formara un precipitado blanco de sulfato de bario; cuando este precipitado se sacude cada tubo posee una turbidez diferente que corresponde aproximadamente a las suspensiones bacterianas del Cuadro 1 (Lennette, 1991).

Cuadro 1. Escala de McFarland.

Tubo N°	Cloruro de Bario 1% (mL)	Ácido sulfúrico 1% (mL)	Suspensión bacteriana por ml (x10 ⁸) UFC.
1	0.1	9.9	3
2	0.2	9.8	6
3	0.3	9.7	9
4	0.4	9.6	12
5	0.5	9.5	15
6	0.6	9.4	18
7	0.7	9.3	21
8	0.8	9.2	24
9	0.9	9.1	27
10	1	9	30

(Tomado de Lennette, 1991).

1.8 Bosque de Quercus.

Los bosques de *Quercus* o encinares son comunidades vegetales que presentan árboles de 6 a 8 o hasta de 30 m de altura; muy característicos de las zonas montañosas de México. De hecho junto con los pinares constituyen la mayor parte de la cubierta vegetal de áreas de clima templado y semihúmedo.

Para México existen más de 150 especies; si se toma en cuenta que de este número más de la mitad son árboles dominantes o codominantes en los bosques podrá comprenderse la gran diversidad florística, fisonómica y ecológica de los encinares mexicanos. Se conocen encinares de todos los estados y territorios de la república, excepción hecha de Yucatán y Quintana Roo y se encuentran desde el nivel del mar hasta 3100 m; aunque más del 95% de su extensión se halla en altitudes entre 1200 y 2800 m (Rzedowski, 1994).

Este tipo de vegetación se ha observado sobre diversas clases de roca madre tanto ígnea como sedimentaria y metamórfica, así como en suelos profundos de terrenos aluviales planos. No toleran aparentemente deficiencias de drenaje. Típicamente el suelo es de reacción ácida moderada (pH 5.5 a 6.5) con abundante hojarasca y material orgánico en el horizonte superficial y a menudo también a mayor profundidad.

Los encinares arbóreos de México prosperan típicamente en condiciones de Clima Cw de la Clasificación de Koeppen (1948), pero también se extienden hacia Cf, Cs, Cx, Af, Am, Aw, y BS. La precipitación media anual varía de 350mm a más de 2000 mm. Las temperaturas medias anuales tienen una amplitud global de 10 a 26°C y más frecuentemente de 12 a 20°C. El número de meses secos oscila entre 0 y 9 e igualmente amplios son los límites de la humedad relativa, de la oscilación de la temperatura (Zavala, 2003).

Con respecto a su aprovechamiento cabe observar que los encinares mexicanos son en general bastante explotados a escala local pero muy poco a nivel industrial; este hecho se debe principalmente a que la mayor parte de los bosques de *Quercus* de este país está formado por árboles bajos y con troncos más bien delgados; además los encinos son de crecimiento relativamente lento los que alcanza mayores tamaños tampoco son utilizables por la inaccesibilidad del terreno, por que no reconocen bien las características de su madera o por ignorar las técnicas para su debido secado. Localmente la madera de encino se emplea para construcciones, muebles, postes y de gran uso como combustible (Zavala, 1990).

Dentro de la biodiversidad de especies contenidas en el Bosque de encino se encuentra *Quercus Rugosa* Nee. Perteneciente a la familia fagácea (Rzedowski, 1994).

1.8.1 Características botánicas de *Quercus rugosa* Nee

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Quercus rugosa* Nee.

Reino.	Vegetal.
Phyllum.	Angiosperma.
Subphyllum.	Dicotiledóneas.
Orden.	Fagales.
Familia.	Fagáceas.
Genero.	Quercus.
Subgénero.	<i>Leucobalanus</i>
Especie.	<i>Quercus rugosa</i> . Nee
Nombre común.	Encino

CONABIO, 2005

Descripción

- Forma: árbol perennifolio o caducifolio de 3 a 8 m; 10 a 20 m (hasta 30 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de 30 a 50 cm (hasta 1.2 m).
- Copa/hojas: copa amplia y redondeada que proporciona una sombra densa. Hoja ovada a elíptico-obovada o casi suborbicular, de (4) 8 a 15 (20) cm de largo, por (2) 3 a 8 (13) cm de ancho, al madurar suavemente engrosadas y rígidas, notablemente cóncavas por el envés, muy rugosas; haz lustrosos y glabo, envés de color ámbar o rojizo.
- Tronco/ ramas: el tronco tiene un diámetro de 10 a 80 cm o más; ramillas de 3 a 6 mm de grueso, tomentulosas al principio, después casi glabras color café grisáceo (Valencia, 1995).
- Corteza: con fisuras profundas de color café oscuro.
- Flor (es): amentos masculinos de 3 a 7 cm de largo con muchas flores, tomentosos, periantosésiles; flores femeninas de 5 a 30 distribuidas a lo largo de un pedúnculo largo, delgado y pubescente.
- Fruto (s): fruto anual solitario o en grupos de 2 a 3 (5) largo-ovoides, miden de (8) 15 a 25 (30) mm de largo y 5 (8) a 122 (15) mm de diámetro
- Semilla (s): Es recalcitrante, bellota ovoide, con frecuencia angosta y puntiaguda, envuelta por una cubierta rígida. El embrión está formado en su mayor parte por los cotiledones que se mantienen turgentes dentro del pericarpio y constituye una alta proporción del total del peso seco de la semilla (53 a 75%) (Vázquez, 1992).
- Raíz: tiene un sistema radical profundo.
- Sexualidad: monoíca.
- Número cromosómico: $2n = 24$ (Zavala, 2003).

Fenología

- Follaje: perennifolio/caducifolio. Hojas decíduas muy tardíamente.
- Floración: florece de marzo a junio.
- Fructificación: fructifica de octubre a febrero.
- Polinización: anemócora (viento) (Zavala, 2003).

Distribución

Se distribuye ampliamente en las regiones montañosas de Sonora, Chihuahua, Coahuila, Veracruz a Chiapas, pero es particularmente abundante en el centro del país Colima, Hidalgo, Michoacán, Morelia, Puebla y el Estado de México, donde forma extensos bosques. Altitud (1,100) 1800 a 2800 (3,050) m.

En el valle de México es abundante formando parte de los bosques de pino y encino o en los encinares que cubren la parte alta de los cerros entre 2500 y 3150 m.s.n.m. se conoce en Tepotzotlán a Tlalpan y de Real del Monte y Pachuca a Amecameca (Rzedowski y Calderón R, 2001).

Origen /Estatus

Se extiende desde el oeste de Texas y sur de Arizona, Estados Unidos, hasta Chiapas, México. Es nativa, silvestre (Rzedowski y Calderón R, 2001).

Hábitat

Prospera en laderas de cerros, barrancas y cañadas húmedas, en terrenos planos y en lugares secos o muy húmedos. Se desarrolla en climas templados fríos y semifríos. Temperatura media anual de 12 a 13° C y una precipitación de 1,540 a 1,619 mm anuales. Se le encuentra en suelos someros o profundos, en pocas ocasiones rocosos y pedregosos.

Suelos: rojizo-arenoso, blanco calizo, somero pardo y profundo, roca basáltica, migajón arenosos, rocas volcánicas, delgados, ácidos, secos o húmedos (Rzedowski y Calderón R, 2001).

Vegetación asociada

Pinus pseudostrobus, *Pinus montezumae*, *Quercus crassipes*, *Quercus laurina*, *Quercus obtusata*, *Arbutus xalapensis*, *Prunus serotina*.

Aspectos fisiológicos

- Adaptación: especie de fácil adaptación una vez establecida.
- Crecimiento: especie de lento crecimiento, vive de 100 a 150 años. Presentan una forma de crecimiento en “pulsos”, presentan tasas bajas de crecimiento y tienen una marcada estacionalidad.
- Descomposición: foliar lenta.
- Establecimiento: las semillas presentan gran variación en el tamaño lo que confiere a *Quercus rugosa* la habilidad para establecerse en un mosaico de micrositios con diferentes condiciones físicas y bióticas.
- Regeneración: la regeneración natural de esta especie es buena en los sitios que presentan condiciones adecuadas de suelo y luminosidad (Vázquez, 1992).

1.8.2 Importancia y uso

- Importancia Ecológica: Se ha sugerido como especie clave en la rehabilitación y restauración de bosques por su participación en la formación de suelos y conservación de mismo, control de erosión, preservar el equilibrio ecológico de cuencas y en su participación en la infiltración y conservación de los mantos acuíferos; así como ser un importante nicho ecológico (Rzedowski y Calderón R, 2001).
- Usos generales: Combustible (leña y carbón), comestible (bebidas y bellotas), forrajero (hojas y frutos), industrial (madera se utiliza para la elaboración de pulpa para papel) (Niembro, 1990).
- Usos medicinales: a inicios del siglo XVIII, Juan de Esteyneffer la usa para detener la hemorragia de la nariz, fijar las muelas flojas, enjuagar llagas, deshacer granos de sangre en heridas y úlceras; contra las almorranas, la hidropesía y la ascitis. En el siglo XX, la Sociedad Farmacéutica de México la define como astringente (UNAM, 2009)

La corteza tiene propiedades astringentes y es auxiliar para detener pequeñas hemorragias y reducir inflamaciones de la piel producidas por ortigas y picaduras de insectos, ayuda a apretar los dientes y tratar úlceras.

En el estado de México y Morelos es común usar esta planta para macizar los dientes flojos y evitar el sangrado de las encías, con este propósito se hacen enjuagues bucales con la infusión de la corteza. Se ha demostrado que contiene propiedades analgésicas (Samano, 1998).

La corteza y las agallas que se forman en las hojas de estos tienen una gran cantidad de taninos por lo que son eficaces como curtientes. (Macías, 2004).

Las duchas vaginales se recomiendan en caso de vaginitis y leucorreas. Los supositorios hechos con extractos de corteza de encino se emplean en caso de hemorroides. También resulta útil la corteza en forma de baño en presencia de excesiva transpiración de los pies (Linares *et al.*, 1999)

Desafortunadamente no se han realizado estudios químicos o farmacológicos que corroboren su efectividad. (UNAM, 2009)

1.9 Zona de Muestreo

El Parque Nacional Izta-Popo es un área natural protegida que cuenta con una gran biodiversidad en cuanto a comunidades vegetales las cuales están contenidas en la zona de influencia de éste. Tal es el caso de San Antonio Tlaltecahuacan, donde se ubica una amplia zona de Bosque de *Quercus sp.*

1.9.1 San Antonio Tlaltecahuacan

Es una localidad ubicada en Tlalmanalco (Estado de México). Tlalmanalco es un vocablo náhuatl, compuesto de tlalli, “tierra”, manalli, “aplanada” o “allanada” y co, “lugar”, y significa “lugar de tierra aplanada o nivelada”. El municipio está ubicado al sureste del Estado de México, limita al este con el estado de Puebla, siguiendo la línea del parteaguas occidental del volcán Iztaccíhuatl; al norte con los municipios de Chalco, Ixtapaluca y Cocotitlán, al oeste con el municipio de Temamatla y al sur con los municipios de Tenango del Aire, Ayapango y Amecameca. La superficie total del municipio es de 158.76 km², la cual representa el 0.743% de la superficie del Estado de México. El Poblado de San Antonio Tlaltecahuaca se localiza en la zona de influencia del Parque Nacional Izta-Popo y se ubica en las coordenadas 19° 33' 19.6" de latitud norte y 98° 8' 25.1" longitud oeste a una altitud de 2459 m. Figura 1 (INEGI E14B41, 2001). El poblado presenta las siguientes características:

Orografía: ocupa la vertiente occidental del Iztaccíhuatl, volcán originado por varias etapas de erupción

Hidrografía: la hidrografía forma parte de la subcuenca del río de la Compañía. Parte de las aguas de los manantiales de La Peña se almacenan y se canalizan para abastecer de agua potable al municipio de Tlalmanalco y sus localidades (San Antonio Tlaltecahuacan)

Clima: el clima es templado subhúmedo cb (w2) con régimen de lluvias de verano, su temperatura media anual es de 13.2°C. La precipitación anual es de 1092 mm, Por sus condiciones de temperatura se considera templado con verano fresco largo. Por su precipitación, se clasifica como el más húmedo de los subhúmedos (Gobierno del Estado de México, 2008; INEGI 2001).

Flora: la vegetación son los bosques de coníferas y encinos, localizado entre los 2,350 y 2,600 m, se presentan asociaciones de pinos y varias especies de encino como *crassipes*, *lacta*, *castanea* y *rugosa*; bosque de encino, se presenta entre los 2,250 y 3,100 m, especies *rugosa*, *crassipes* y *laurina*; entre los 2,500 y 2,800 m bosques de *rugosa* puro o asociado con *crassipes*. Se establecen entre los 4,000 y 4,500 m; gramíneas amacolladas, con un estrato rasante de musgos y plantas acojinadas; Pastizal inducido así como cultivos agrícolas: plantas introducidas cultivadas para la alimentación humana como trigo, haba, maíz y papa para la agricultura de temporal y permanentemente frutales leñosos.

Fauna: el orden de los roedores (ardillas, tuzas, ratas y ratones) es el mejor representado; le siguen en orden decreciente los carnívoros, los quirópteros, los insectívoros y los lagomorfos (conejos). Además se albergan algunas especies de aves migratorias familias parulinae, enberizidae que se desplazan desde Canadá y Estados Unidos.

Recursos Naturales: la característica de los montes de esta localidad está constituida por bosques que son el mayor recurso natural, los cuales cubren el 65% de la superficie municipal con 10,325 hectáreas (Gobierno del Estado de México, 2008).

Características y uso del Suelo: los suelos están formados por cenizas volcánicas y pómez (tefras) de diferentes edades que favorecen el desarrollo de andosoles, los cuales ocupan grandes superficies. De ellos el 17.6% agrícola, 65% forestal, 6.9% son suelos erosionados, 3.9% son urbanos, 2.9% pecuarios y un 3.2% son otro tipo de suelos (INEGI E14B41, 2001).

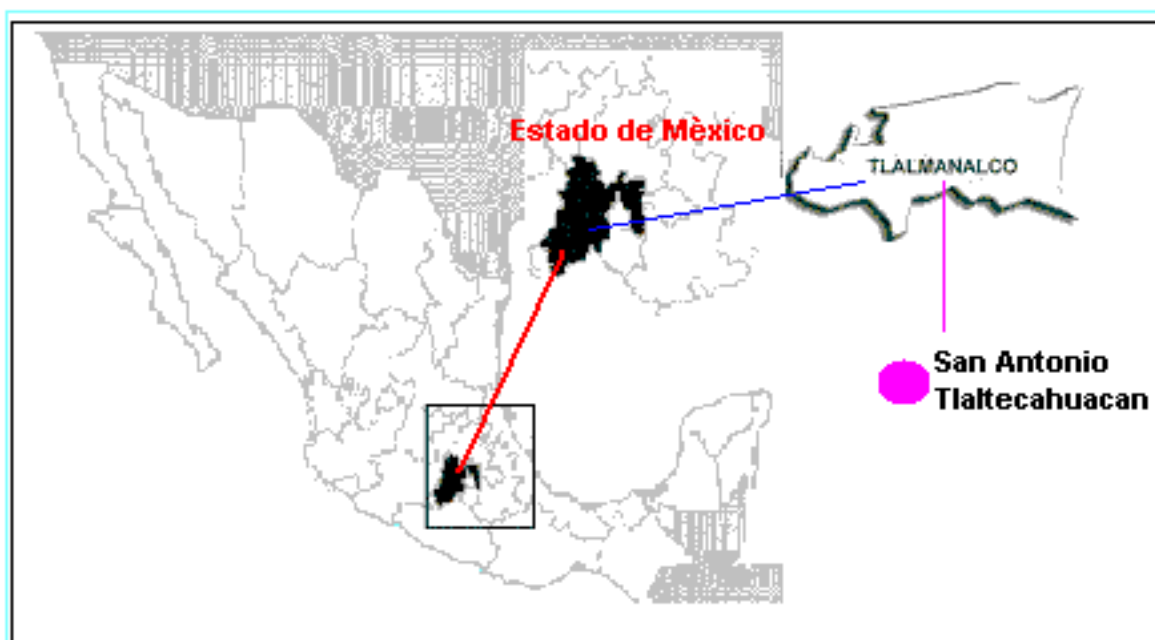


Figura 1. Mapa de localización de la zona de muestreo (San Antonio Tlaltecahuacan)

Tomado de www.mapasmexico.net

2.1 HIPÓTESIS

Se ha informado el uso medicinal de los encinos en enfermedades relacionadas con problemas bucales y del aparato digestivo, siendo la corteza la estructura más utilizada para dichos padecimientos, es por ello que se espera encontrar inhibición del crecimiento de fitopatógenos y patógenos del hombre ante el extracto de *Quercus rugosa* Née.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la acción antimicrobiana (*in vitro*) de *Quercus rugosa* Née en algunos fitopatógenos y patógenos del hombre.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES.

- * Obtener el extracto de rama hoja y corteza de *Quercus rugosa* Née.
- * Evaluar la acción antimicrobiana de los extractos alcohólicos de rama, hoja y corteza de *Quercus rugosa* Née a diferentes concentraciones (120, 200 y 500 mg mL⁻¹) sobre los siguientes fitopatógenos y patógenos del hombre.
- * Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de rama, hoja y corteza.
- * Realizar un análisis químico cualitativo del extracto de hoja, rama y corteza de *Quercus rugosa* Née mediante espectroscopia de infrarrojo.
- * Determinar las propiedades físicas y químicas del suelo donde crece *Quercus rugosa* Née.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODO.

El trabajo se dividió en tres fases: de campo, de laboratorio y de gabinete.

3.1 Trabajo de gabinete

En esta etapa se realizó la búsqueda de información bibliográfica del tema, el uso de cartografía de la zona de muestreo, la obtención y análisis de resultados, así como la elaboración del trabajo final.

3.2 Trabajo de campo

3.2.1 Muestreo Vegetal.

Establecida la zona de muestreo se realizó la recolecta vegetal de *Quercus rugosa* Nee; se colectó un ejemplar del encino completo (ramas, hojas y bellotas) para su herborización, el cual fue determinado taxonómicamente con el apoyo del personal del herbario de la FES Zaragoza mediante claves fanerogámicas (Zavala, 2003).

El material vegetal se separó en las diferentes estructuras (rama, hoja y corteza) y se depositaron en bolsas de papel estraza, con el fin de no alterar su humedad y temperatura además de evitar que se desarrollaran patógenos (Martín, 1995) y se etiquetó (especie recolectada, la localidad en la que fue recolectada, ubicación geográfica y fecha) (Rzedowsky y Calderón, 2001).

3.2.2 Muestreo de suelo.

Se realizó un muestreo de suelo con la finalidad de conocer las características edáficas del sitio en donde crece *Quercus rugosa*; debido a que estas determinan el rango de adaptación, la interrelación que guarda con las especies que crecen sobre el mismo suelo y bajo su dosel; la influencia de estas respecto a la producción de metabolitos secundarios así como conocer cual es el clima fundamental y el tipo de suelo y altitud donde este se desarrolla. Por ello se recolectó una muestra compuesta de suelo donde crece *Quercus rugosa* Nee, realizada en un área de 10 X 10 m tomando 10 submuestras de diferentes puntos con una distancia de 1 m entre ellas con la finalidad de obtener una muestra compuesta de 1kg aprox., a una profundidad de 0 a 30 cm (capa arable) dicha muestra fue transportada al laboratorio para determinar las propiedades físicas y químicas (Jackson y Beltrán, 1964).

3.3 Trabajo de laboratorio

3.3.1 Análisis de suelo

Se determinaron las siguientes propiedades físicas y químicas del suelo donde crece *Quercus rugosa* Nee (Cuadro 3).

Cuadro 3. Propiedades Físicas y Químicas para el análisis del suelo donde crece *Quercus rugosa* Nee.

Método	Propiedad	Cita Bibliográfica
Walkley and Black	% de materia orgánica del suelo	(Jackson y Beltrán, 1964; Robert y Frederick, 1980;; Reyes,1996)
Potenciométrico	pH real y pH potencial	(Robert y Frederick, 1980; Reyes,1996)
Picnómetro	Densidad real,	(Robert y Frederick, 1980; Reyes,1996)
Probeta	Densidad aparente	(Robert y Frederick, 1980; Reyes,1996)
Hidrómetro de Bouyoucus	Textura	(Robert y Frederick, 1980; Reyes,1996)
Gravimétrico	% de Humedad	(Robert y Frederick, 1980; Reyes,1996)

3.3.2 Preparación del material vegetal

El material vegetal recolectado se corto en trozos pequeños con el fin de obtener una mayor superficie de contacto con el disolvente; este fue desinfectado usando una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 10%, durante 5 minutos, se enjuagó 4 veces con agua destilada, una vez realizado esto se dejó secar a temperatura ambiente de 3 a 5 días dentro de una campana estéril (Alfaro *et al.*, 2000)

3.3.3 Obtención del extracto vegetal y del peso seco

El extracto se obtuvo por medio de una maceración alcohólica (Método Galénico) utilizando como agente extractante alcohol etílico (96°) para lo cual el material vegetal se colocó en frascos ámbar de boca ancha con tapa no metálica, se agregó alcohol hasta que este lo cubrió totalmente y se taparon perfectamente para evitar la evaporación del etanol, los frascos fueron etiquetados y se colocaron en un lugar oscuro, seco, y a temperatura ambiente, durante 15 días (maceración) y fueron agitados cada tercer día. La tintura obtenida se filtró utilizando papel filtro estéril Whatman No. 42 Kuklinski, 2003; Maldonado, *et al.*, 2004).

La filtración de la tintura se llevó a cabo bajo campana estéril y el material utilizado para la filtración y medición del volumen de la tintura fue esterilizado a 120 lb/plg² durante 20 minutos.

El extracto se concentró mediante una destilación a vacío con un rotavapor con baño maría a una temperatura de 60°C y una presión de vacío de 10⁻⁴ (Miranda, 2000). El extracto obtenido se colocó en cajas Petri estériles previamente pesadas, y se determinó el peso exacto del extracto.

3.3.4 Preparación de las concentraciones y sensidiscos

Se prepararon una serie de tres disoluciones con los extractos secos de *Quercus* con 1 mL de alcohol (en las concentraciones de 120, 200 y 500 mg mL⁻¹) bajo campana estéril; y se colocaron en frascos ámbar y se taparon perfectamente. Se elaboraron sensidiscos de papel Whatman N° 41 con un diámetro de 6mm se esterilizaron en autoclave a 120 lb/plg² por 20 minutos. Posteriormente se impregnaron con cada una de las concentraciones además de un testigo absoluto (impregnado con alcohol) y un testigo cero (impregnado con agua destilada) se dejaron secar por 24 horas (Koneman *et al*; 1999).

3.3.5 Diseño experimental

Constó de 5 tratamientos con 10 repeticiones y 22 cepas de microorganismos. Los 5 tratamientos corresponden a las 3 concentraciones del extracto y testigos que se indicaron anteriormente. Las cepas que se utilizaron en el diseño experimental fueron donadas por el cepario de la FES – Zaragoza y el cepario del Colegio de Posgraduados del Laboratorio de Microbiología del Dr. R. Ferrera Cerrato

Cuadro 4. Cepas de Patógenos del Hombre utilizados para las pruebas microbiológicas.

Bacterias	Hongos.
<i>Corynebacterium xerosis.</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Escherichia coli.</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Enterococcus faecalis.</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Streptococcus beta-hemolítico.</i>	<i>Candida stellatoidea</i>
<i>Staphylococcus aureus.</i>	<i>Geotrichum sp.</i>
<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Cryptococcus neoformans.</i>
<i>Streptococcus mutans</i>	

Cuadro 5. Cepas de Fitopatógenos utilizados para las pruebas microbiológicas.

Hongos			
Clave de cepas	Clasificación taxonómica	Planta hospedera	Lugar de procedencia
SP	<i>Sclerotinia sclerotium</i>	Lechuga	Salamanca, Gto.
SS	<i>Sclerotinia sp.</i>	Lechuga	San Miguel de Allende, Gto
Sc-As	<i>Sclerotium cepivorum</i>	Ajo	Salamanca, Gto.
JUGO6Mp14(2)	<i>Penicillium sp.</i>	Ajo	Salamanca, Gto.
JUGO6Mp14(3)	<i>Penicillium sp.</i>	Ajo	Salamanca, Gto.
Bacterias			
1H	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Ajo	León, Gto
Ls-1	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Lechuga	Salamanca, Gto.
Ls-MM4	<i>Pseudomonas marginalis</i>	Lechuga	Salamanca, Gto.
4P	<i>Erwinia Carotovora</i>	Ajo	León, Gto
Ls-N6ss5	<i>Erwinia Carotovora</i>	Lechuga	Salamanca, Gto.

3.3.6 Pruebas de sensibilidad bacteriana

La estandarización del inóculo se llevó a cabo mediante el método de Kirby-Bauer y la escala turbidimétrica de McFarland. Se preparó el tubo 1 de dicha escala según lo establecido en el Cuadro 1; se estandarizaron los inóculos de cada microorganismo a partir de un cultivo fresco colocando 1 mL de solución salina (NaCl al 0.1%) en un tubo de ensaye y agregando de 3 a 4 colonias de bacterias y hongos según el caso, se resuspendió y se ajustó visualmente a la turbidez del tubo 1 de la escala de Mc Farland (Koneman *et al.*, 1999; Celeste *et al.*, 2008). La siembra del inóculo se llevó a cabo mediante la Técnica de Barry que consistió en preparar el medio de cultivo agar Mueller–Hinton para bacterias y agar Dextrosa Sabouraud para hongos, se esterilizaron en autoclave por 20 minutos y se vertieron aproximadamente 15 mL en cajas petri estériles antes de solidificar se inóculo agregando 1 mL de los microorganismos estandarizados se mezcló con el medio de cultivo y se dejó enfriar hasta solidificar perfectamente (González 1997; Jiménez, 1999).

La determinación de la sensibilidad de los patógenos del hombre y fitopatógenos ante los extractos de *Quercus rugosa* se realizó por el método de Difusión en Agar; colocando en las cajas petri con el medio de cultivo inoculado 3 sensibilizadores impregnados con cada una de las concentraciones de 120, 200 y 500 mg mL⁻¹, del extracto en peso seco así como los dos testigos las cajas se sellaron con papel parafilm y se incubaron a 28°C por 24 hrs. para bacterias y 48 hrs. en el caso de los hongos bajo condiciones de oscuridad y para las bacterias también bajo anaerobiosis; transcurrido el tiempo se observaron los halos de inhibición, se midieron con un Vernier, registrándose el efecto inhibitorio en el crecimiento de los microorganismos y las estructuras que presentaron dicho efecto (Koneman *et al.*, 1999; Celeste *et al.*, 2008).

3.3.7 Evaluación de los extractos

Para ello se utilizó la técnica de Espectrofotometría de infrarrojo: con el fin de conocer que tipos de grupos funcionales están presentes en el extracto de *Quercus rugosa* Nee. Se obtuvo el espectro del extracto vegetal de cada estructura de la planta con el instrumento conocido como Espectrofotómetro de Infrarrojo con Transformadora de Fourier (FTIR), de la marca PERKIN ELMER, modelo 1600 del laboratorio de espectroscopia de la FES Zaragoza, los cuales fueron interpretados con tablas de referencia para cada longitud de onda de los espectros (Rubio y Segade, 1985).

3.3.8 Prueba estadística

Una vez obtenidos los resultados de la medición de halos de inhibición se analizaron mediante una prueba de Tukey (comparación de medias) con un nivel de confianza del 95 %. El nivel de significancia en todos los análisis fue de $\alpha < 0.05$ (Cervantes *et al.*, 2006).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Rendimiento del extracto de *Quercus rugosa* Nee en peso seco.

En el cuadro 6 se pueden observar los resultados del porcentaje de rendimiento obtenidos de los extractos en peso seco, a partir del extracto vegetal del encino *Quercus rugosa* Nee, de cada una de sus estructuras: corteza, rama y hoja.

Cuadro 6. Rendimiento del extracto de las diferentes estructuras de *Quercus rugosa* Nee

Estructura	Peso de la muestra (g)	Peso de extracto seco (g)	% de rendimiento
Corteza	602	24.68	4.0
Rama	253.9	3.3	1.2
Hoja	227	4.8	2.1

El mayor porcentaje de rendimiento de extracto lo obtuvo la corteza (4.0%) con un peso en seco de 24.68 g; seguida de la hoja (2.1%) con un peso seco de 4.8 g y por último la rama (1.2%) con un peso seco de 3.3 g.

Conocer el rendimiento que presenta un extracto vegetal es importante debido a que, mientras mayor sea el rendimiento de este, menor será la cantidad de material vegetal que deberá ser utilizado y debido a ello disminuirá el impacto originado a las comunidades vegetales.

De manera particular el conocimiento del rendimiento de un extracto vegetal es útil para conocer y determinar la cantidad de material vegetal que se debe de utilizar para obtener la dosis deseada o previamente determinada y con esto poder combatir un patógeno o tratar un padecimiento. En el campo de la investigación es importante ya que nos permite determinar con que cantidad de material vegetal seco es posible obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) para combatir un patógeno y así tener bases para futuras investigaciones.

4.2 Microorganismos fitopatógenos inhibidos por las diferentes estructuras y concentraciones del extracto.

En el cuadro 7 se muestran los casos donde hubo inhibición, así como la concentración, estructura y el número total de organismos que presentaron sensibilidad (+) o resistencia (-) frente al extracto de hoja rama y corteza.

Cuadro 7. Inhibición de los microorganismos fitopatógenos por los diferentes extractos (hoja, rama y corteza) a las concentraciones de 120, 200 y 500 mg mL⁻¹ de *Quercus rugosa* Nee.

Extracto	Concentración (mg mL ⁻¹)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total.
Hoja	120	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	6
	200	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	7
	500	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	8
Rama.	120	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	4
	200	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	5
	500	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	5
Corteza.	120	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	8
	200	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	8
	500	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	8

1. *Pseudomona marginalis*. (1H); 2. *Pseudomona marginalis*. (Ls-1); 3. *Pseudomona marginalis*. (LsMM4); 4. *Erwinia carotovora* (4P); 5. *Erwinia carotovora* (Ls-N6SS5); 6. *Sclerotinia* spp. (SS); 7. *Sclerotinia* spp. (SP); 8. *Sclerotium cepivorum* (Sc-As); 9. *Penicillium* spp. (JUGO6-MP14(2)); 10. *Penicillium* spp. (JUGO6-MP14(3)).

Analizando el cuadro 5 se puede deducir que la estructura de la corteza fue la que presentó una mayor inhibición ya que en cada una de las concentraciones utilizadas (120, 200 y 500 mg mL⁻¹) se inhibieron las 5 cepas bacterianas (*Pseudomona marginalis* (1H); *Pseudomona marginalis* (Ls-1); *Pseudomona marginalis* (LsMM4); *Erwinia carotovora* (4P) y *Erwinia carotovora* (Ls-N6SS5)) así como 3 cepas micóticas (*Sclerotinia* spp. (SP); *Sclerotium cepivorum* (Sc-As) y *Penicillium* spp. (JUGO6-MP14(3))).

Para el extracto de hoja la única bacteria que presentó resistencia a la concentración de 120 mg mL⁻¹ fue *Pseudomona marginalis*. (1H) así como el hongo *Penicillium* spp. (JUGO6-MP14(2)) para las concentraciones de 120 y 200 mg mL⁻¹ mientras que los hongos *Sclerotium cepivorum* (Sc-As) y *Penicillium* spp. (JUGO6-MP14(3)) mostraron resistencia ante las tres diferentes concentraciones. En cuanto al extracto de rama solo 2 bacterias mostraron resistencia *Pseudomona marginalis*. (1H) que no desarrolló halos de inhibición en ninguna de las concentraciones probadas y *Erwinia carotovora* (4P) que mostró resistencia solo para la concentración de 120 mg mL⁻¹ en cuanto a las cepas micóticas solo una de ellas *Penicillium* spp. (JUGO6-MP14(2)) mostró sensibilidad para las tres concentraciones utilizadas; siendo este extracto el que presentó el efecto mas bajo de inhibición respecto a las tres estructuras.

4.3 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana en fitopatógenos.

En las siguientes gráficas se presentan los resultados promedio obtenidos del tamaño de los halos de inhibición del extracto de hoja rama y corteza de *Quercus rugosa* Nee, en las diferentes cepas estudiadas en las concentraciones de 120, 200 y 500 mg mL⁻¹

Bacterias fitopatógenas.

Las bacterias causan importantes pérdidas a la agricultura mundial, estos patógenos son importantes porque causan enfermedades devastadoras, cuando se presentan las condiciones ambientales adecuadas; entre los géneros de importancia agrícola se encuentran las bacterias *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. (Aranda, 2002). La aplicación excesiva e indiscriminada de bactericidas para el control de enfermedades agrícolas ha ocasionado un sin número de problemas de resistencia, afectación del medio ambiente y graves complicaciones a la salud humana. Además de que elevan los costos de producción por la utilización de esta clase de bactericidas. Ante esta situación, el nuevo enfoque en el combate de las bacterias trata de integrar nuevas opciones encaminadas a la protección y aumento de cosechas pero con alternativas no perjudiciales; en este caso la utilización de sustancias de origen natural, que las mismas plantas han desarrollado a través de la evolución pueden ser una alternativa para limitar poco a poco el uso de agroquímicos (Tanaka y Andomuro, 1993).

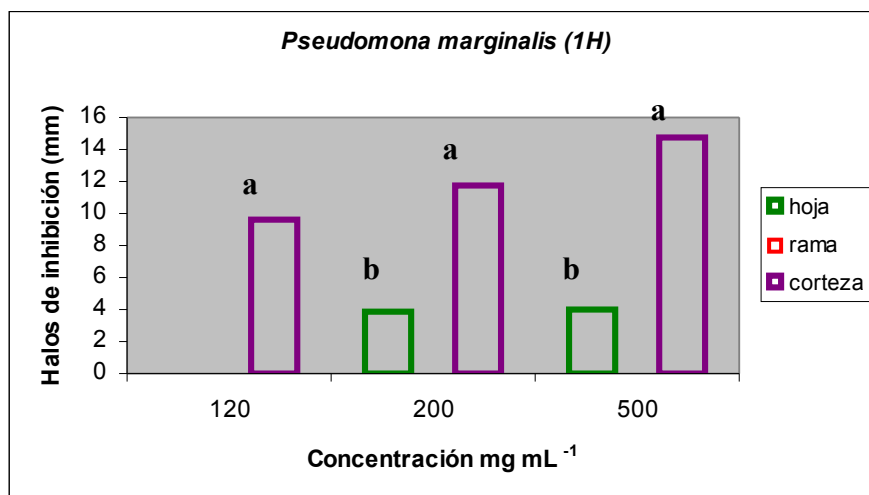
La tendencia mundial por encontrar productos de origen natural para el control de enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas, ha creado la necesidad de detectar y estudiar plantas que tengan un potencial de uso como bactericidas naturales, debido a los metabolitos secundarios que biosintetizan y que tienen un efecto bactericida, como el realizado en esta investigación de la cual se presentan los siguiente resultados:

***Pseudomonas marginalis* (1H).**

Se ha documentado que *Pseudomonas marginalis* es un patógeno que produce la pudrición blanda en las hojas y tallos, principalmente en productos como la papa, frijol y girasol los cuales están considerados entre los cultivos más importantes para la alimentación humana a nivel mundial (Smith, 1992).

Los métodos de control tradicionales para esta bacteria resultan caros y perjudiciales para el medio ambiente; ante este panorama el control y prevención de enfermedades de origen bacteriano se están desarrollando estrategias alternativas como lo son el uso de compuestos naturales extraídos a partir de plantas como es el caso de *Quercus rugosa* (Vasinauskiene *et al.*, 2006).

El extracto de *Quercus rugosa* Nee probado en este trabajo resultó efectivo y la gráfica 1 brinda un panorama general del tamaño promedio de los halos de inhibición presente en la cepa mencionada.



Gráfica 1. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Pseudomonas marginalis* (1H), a y b denotan diferencia estadística significativa

La estructura que presentó los mayores halos de inhibición fue la corteza, se observa que a medida que se incrementa la concentración aumenta también el tamaño del halo de inhibición lo cual se puede apreciar en la figura 2; la concentración mínima inhibitoria para esta estructura corresponde a 120 mg mL⁻¹, mientras que para la estructura de la hoja son los 200 mg mL⁻¹ y para el extracto de rama no hubo inhibición en el crecimiento bacteriano.

El extracto de hoja se mostró homogéneo en cuanto al tamaño de los halos de inhibición para las concentraciones de 200 y 500 mg mL⁻¹ con valores promedio de 4 mm siendo estos los menores halos de inhibición. La diferencia estadística apreciada en la gráfica 1 entre las estructuras de hoja y corteza fue corroborada mediante una prueba de Tukey ($\alpha < 0.05$) (Apéndice 1.1 *Pseudomonas marginalis* (1H)).

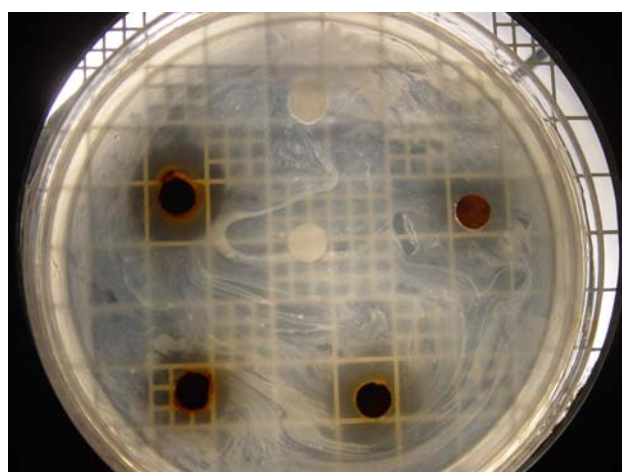
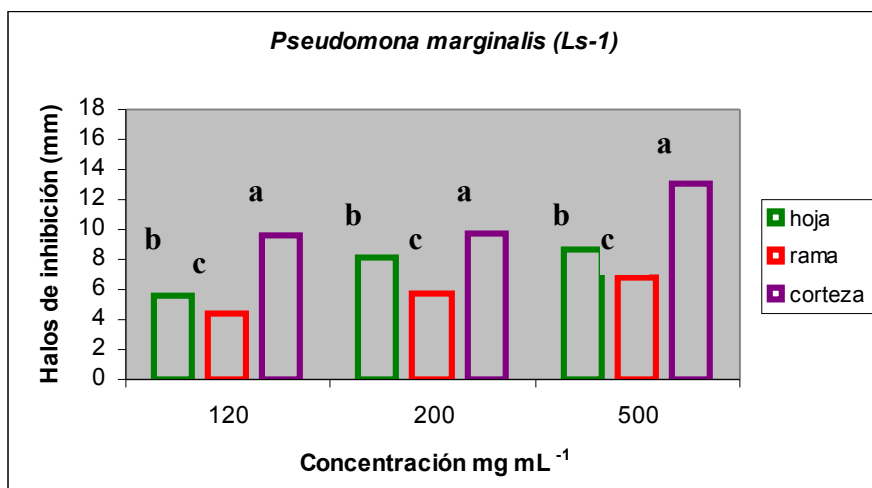


Figura 2. Efecto del extracto de *Q. rugosa* sobre el cultivo de *Pseudomonas marginalis* (1H).

Pseudomona marginalis (Ls-1)

Para la cepa de *Pseudomona marginalis* (Ls-1) las tres concentraciones probadas 120, 200 y 500 mg mL⁻¹ inhibieron crecimiento de la colonia.



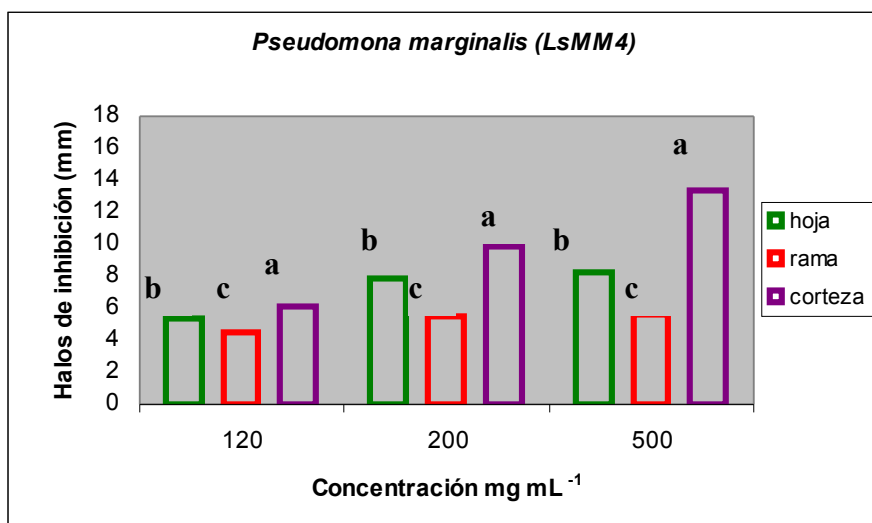
Gráfica 2. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Pseudomona marginalis* (Ls-1), a, b y c denotan diferencia estadística significativa.

La estructura que presentó los mayores halos de inhibición fue corteza con valores que oscilan entre los 9.5, 9.6 y 13 mm respectivamente, seguida de hoja y por último la rama como se observa en la gráfica 2; siendo la concentración mínima inhibitoria para esta bacteria los 120 mg mL⁻¹. En cuanto a comparaciones múltiples por estructura se presenta una diferencia estadística (Apéndice 1.2 *Pseudomona marginalis* (Ls-1)).

Existen antecedentes que indican el potencial antimicrobiano de componentes de especies vegetales distribuidas en la zona semidesértica de México, entre las cuales destacan la gobernadora (*Larrea tridentata* Cov.) (Lira, 2003), la nuez (*Carya illinoensis*) y la granada (*Punica granatum*) se caracterizan por tener una gran cantidad y variedad de polifenoles que resultan eficaces en el tratamiento contra *Pseudomona marginalis* (Gallegos y col., 2004).

Pseudomona marginalis (LsMM4)

La gráfica 3 exhibe la interacción Estructura-Concentración para dicha bacteria para la cual, los mayores halos de inhibición se encontraron para el extracto de corteza en las tres diferentes concentraciones probadas (120, 200 y 500 mg mL⁻¹) con valores promedio que oscilan entre los 6, 8 y 13 mm respectivamente, seguida de la hoja y por último la rama.



Gráfica 3. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Pseudomonas marginalis* (LsMM4); a, b y c denotan diferencia estadística significativa

Lo anterior se corrobora con el análisis estadístico realizado, el cual muestra que existe diferencia estadística entre los efectos causados por los extractos de *Quercus rugosa* para dicha bacteria. (Apéndice 1.3 *Pseudomonas marginalis* (LsMM4)).

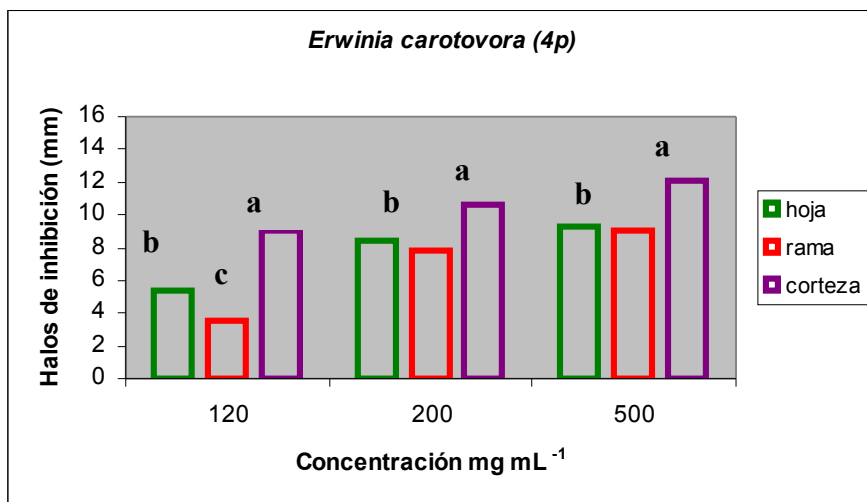
Cabe mencionar que la diferencia en el efecto que presentaron las cepas (Ls-1) y (LsMM4) de *Pseudomonas marginalis* en las que se reportó inhibición del crecimiento de las colonias para los tres diferentes extractos; y la cepa (1H) en la cual se observó menor actividad, puede deberse a que en una especie bacteriana existen subespecies las cuales manifiestan diferentes grados de patogenicidad y resistencia lo cual explica dicho comportamiento ante los diferentes extractos de *Quercus rugosa*.

Dicho comportamiento refleja que aun y cuando se tienen determinadas a estas 3 cepas como pertenecientes a la bacteria *Pseudomonas marginalis*, deben ser patovares diferentes, fenómeno que existe dentro de muchas especies de bacterias fitopatógenas y por otro lado se puede deber a que son cepas aisladas de regiones y hospederos diferentes.

***Erwinia carotovora* (4p)**

Erwinia carotovora es considerada uno de los patógenos más dañinos para los diferentes cultivos en especial el de la papa por ser la especie que ocupa el cuarto lugar entre los principales cultivos alimenticios en el mundo (Mayea, 1995). Este organismo patógeno se manifiesta cuando la humedad alcanza un 90% y los métodos de control que se usan contra este han sido el uso de bactericidas lo que tiene como consecuencia el daño a la microbiota edáfica en general, por lo cual es importante proponer métodos alternativos que inhiban el crecimiento de esta bacteria sin perjudicar a otros organismos. (García, 2000).

Los tres extractos de *Quercus rugosa* probados sobre la cepa bacteriana *Erwinia carotovora* (4p) mostrarán efecto inhibitorio para las diferentes concentraciones utilizadas ver gráfica 4.



Gráfica 4. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Erwinia carotovora* (4p); a, b y c denotan diferencia estadística significativa.

La estructura de corteza presenta para las tres concentraciones 120, 200 y 500 mg mL⁻¹ los mayores halos de inhibición con valores alrededor de los 8, 10 y 12 mm; este resultado concuerda con lo reportado por Kreckova y colaboradores (1988), acerca de que la corteza de los encinos presenta propiedades de resistencia al ataque de insectos y microorganismos fitopatógenos. Esta resistencia natural principalmente es resultado de las adaptaciones que estas especies han desarrollado para disminuir o eliminar dichos ataques; como lo es la biosíntesis de metabolitos secundarios que contienen uno o varios compuestos con una actividad significativa sobre el crecimiento y desarrollo de dichos fitopatógenos (Reyes, *et al.*, 1995).

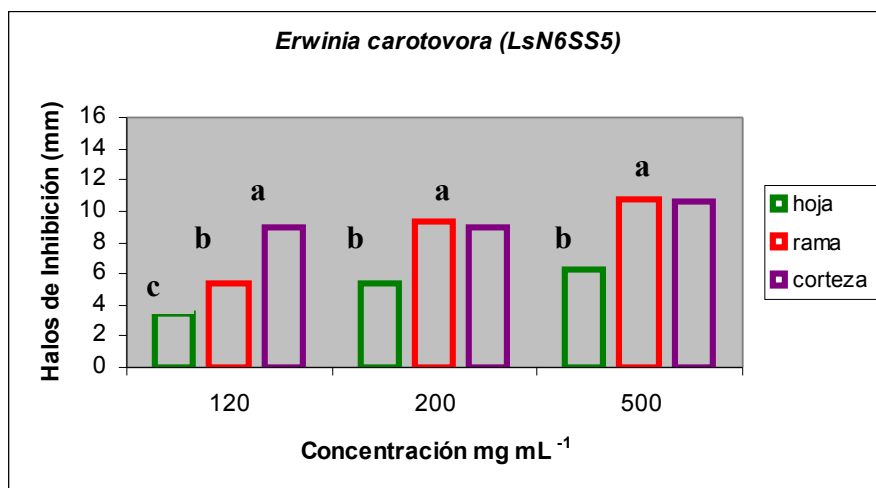
La menor inhibición en la prueba de sensibilidad practicada a *Erwinia carotovora* (4p) se presentó para el extracto de rama a la concentración de 120 mg mL⁻¹ con un valor promedio de 3.5 mm.

Para las tres estructuras la concentración mínima inhibitoria fue la de 120 mg mL⁻¹ y se aprecia que al elevarse la concentración se incrementa el tamaño del halo de inhibición. Estadísticamente las estructuras de rama y hoja a las concentraciones de 200 y 500 mg mL⁻¹ se muestran como grupos homogéneos (Apéndice 1.4 *Erwinia carotovora* (4p)).

Los reportes de inhibición del crecimiento de bacterias fitopatógenas por extractos vegetales son escasos de ellos podemos destacar el trabajo reportado por Pretorius y colaboradores (2003), quienes probaron extractos de 26 especies vegetales contra 5 bacterias fitopatógenas entre ellas *Erwinia* reportando que todos los extractos tuvieron efecto inhibitorio.

Erwinia carotovora (Ls-N6SS5)

La grafica 5 presenta el efecto de los diferentes extractos utilizados en la prueba de sensibilidad aplicada a *Erwinia carotovora* (LsN6SS5).



Gráfica 5. Interacción estructural/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Erwinia carotovora* (LsN6SS5); a, b y c denotan diferencia estadística significativa.

Erwinia carotovora (LsN6SS5) fue inhibida por las diferentes concentraciones estructuras probadas siendo la concentración mínima inhibitoria los 120 mg mL⁻¹ y encontrándose una relación directamente proporcional entre el efecto inhibitorio y la concentración utilizada.

La rama y la corteza se muestran como grupos homogéneos estadísticamente (Apéndice 1.5 *Erwinia carotovora* (Ls-N6SS5) y son las estructuras que exhiben los mayores halos de inhibición esto podría deberse al la diferencia de patogenicidad y resistencia que existe entre las diferentes subespecies de esta bacteria (Figura 3) y a que la concentración de los metabolitos secundarios no es uniforme dentro de los árboles; generalmente, las mayores cantidades se presentan en la corteza, raíces, ramas y en los tejidos con heridas. (Obst, 1998).

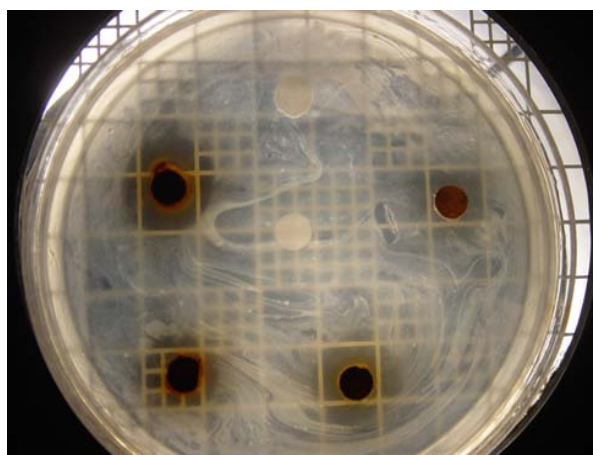


Figura 3. Efecto del extracto de *Q. rugosa* sobre el cultivo de *Erwinia carotovora* (LsN6SS5)

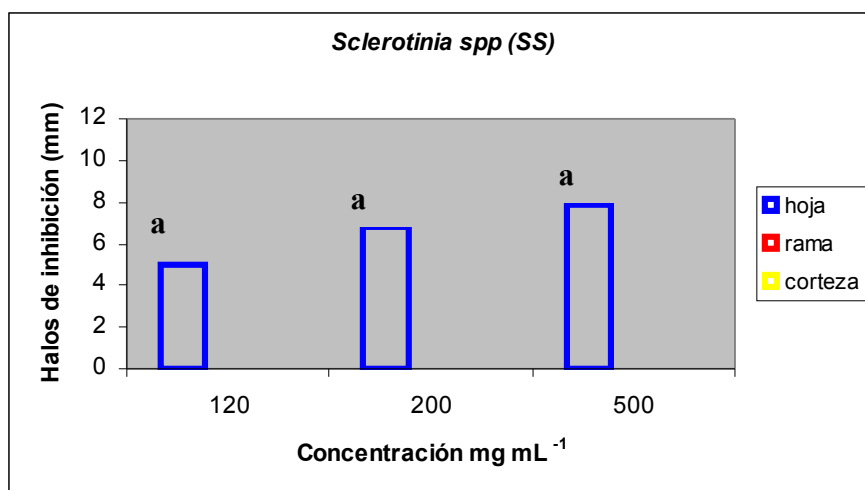
Hongos fitopatógenos

Tradicionalmente algunos agricultores han desarrollado actividades de agricultura sostenible, utilizando plantas nativas para varias prácticas agrícolas; de las cuales diferentes especies son reconocidas por sus propiedades bactericidas, insecticidas y sobre todo fungicidas. (Lee, 2002).

Esta forma de control ha despertado gran interés entre los investigadores con resultados promisorios bajo condiciones *in Vitro*. En la mayoría de los estudios recientes se ha comprobado que los metabolitos secundarios de plantas con efecto fungicida pueden actuar como controladores de organismos plaga sin afectar o alterar la micro y macro fauna en general (Adandonon *et al.*, 2006).

Sclerotinia spp. (SS)

La gráfica 6 muestra la información de la relación Estructura-Concentración y su efecto sobre el tamaño del halo de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Sclerotinia spp. (SS)*.



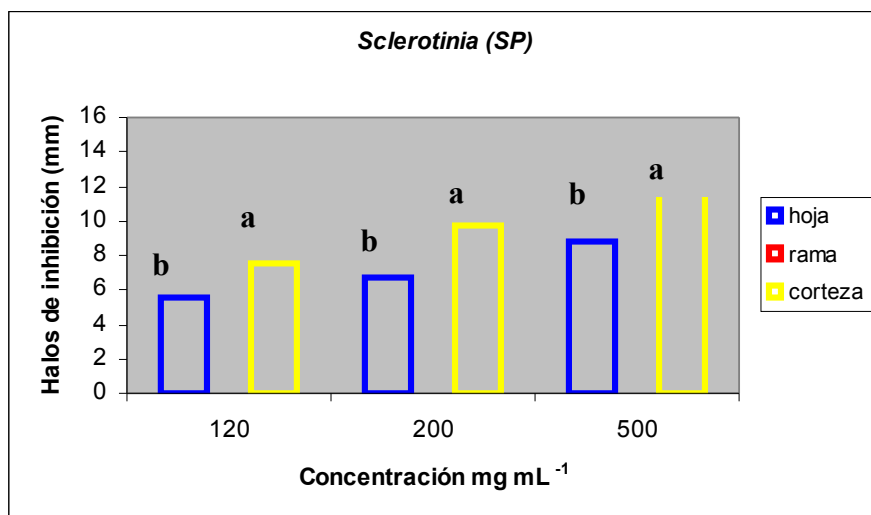
Gráfica 6. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Sclerotinia spp. (SS)*; a denota diferencia estadística significativa.

La estructura de la hoja inhibe el desarrollo de la cepa para cada una de las concentraciones probadas siendo la mínima inhibitoria la correspondiente a los 120 mg mL⁻¹.

Desafortunadamente los estudios realizados para el control de *Sclerotinia* son pocos y han sido desarrollados bajo condiciones *in Vitro*. Espinosa (2005) reporta el efecto inhibitorio en *Sclerotinia sclerotium* aislado de un cultivo de lechuga a partir de extractos vegetales de ajo y manzanilla. Por lo anterior es preciso realizar más estudios que muestren el efecto de diferentes extractos vegetales para el control de este fitopatógeno como lo es caso del encino en esta investigación.

Sclerotinia spp. (SP)

Esta cepa se mostró resistente al extracto rama y presentó los mayores halos de inhibición para el extracto de corteza; seguida de la hoja (Grafica 7).



Gráfica 7 Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Sclerotinia spp. (SP)*; a y b denotan diferencia estadística significativa.

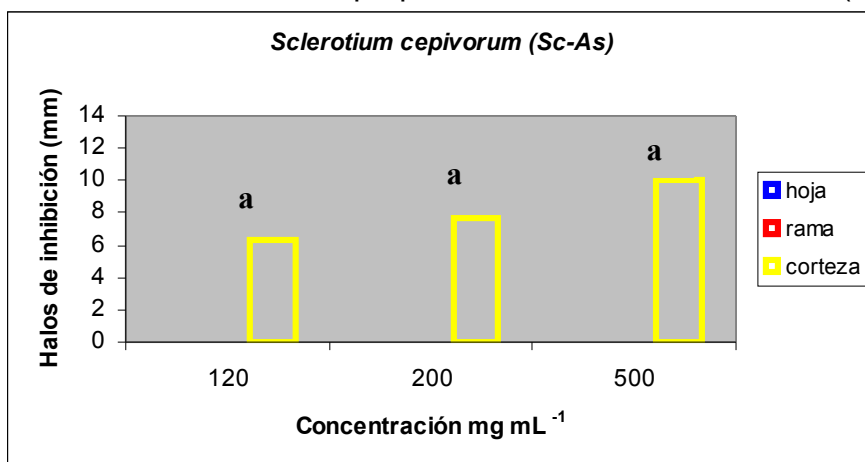
El aumento en el tamaño del halo de inhibición se dio al incrementar la concentración del extracto utilizado, la concentración mínima inhibitoria para *Sclerotinia spp. (SP)* son los 120 mg mL⁻¹. El análisis estadístico indica que entre dichas estructuras existe una diferencia estadística (Apéndice 2.2 *Sclerotinia spp. (SP)*).

Sclerotium cepivorum (Sc-As)

Sclerotium cepivorum es un hongo que produce la enfermedad denominada “pudrición blanda” misma que es considerada muy perjudicial ya que ocasiona pérdidas de hasta de un 100% de la producción particularmente en ajo. Según Hermosillo- Gómez *et al* (citado por Delgadillo *et al.*, 2002) el control de *S. cepivorum* representa un gran reto, debido principalmente a que este hongo tiene la capacidad para formar estructuras de resistencia denominadas esclerosios, los cuales le permiten mantenerse en un periodo de latencia durante mas de 20 años, por otro lado, los productos antimicóticos comerciales que se han empleado para su control no son del todo efectivo.

Lo anterior se refleja en los resultados obtenidos durante esta investigación al probar los diferentes extractos de *Q. rugosa* frente a *Sclerotium cepivorum (Sc-As)* en donde solo se encontró inhibición para el extracto de corteza con halos de tamaños promedios de 6.2 mm para la concentración de 120 mg mL⁻¹ siendo esta la mínima inhibitoria, 7.7 mm para los 200 mg mL⁻¹ y 10.0 mm para

la de 500 mg mL⁻¹. Estos valores demuestran que la inhibición del patógeno se da en una relación directamente proporcional con la concentración (Gráfica 8).



Gráfica 8 Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Sclerotium cepivorum* (Sc-As); a denota diferencia estadística significativa.

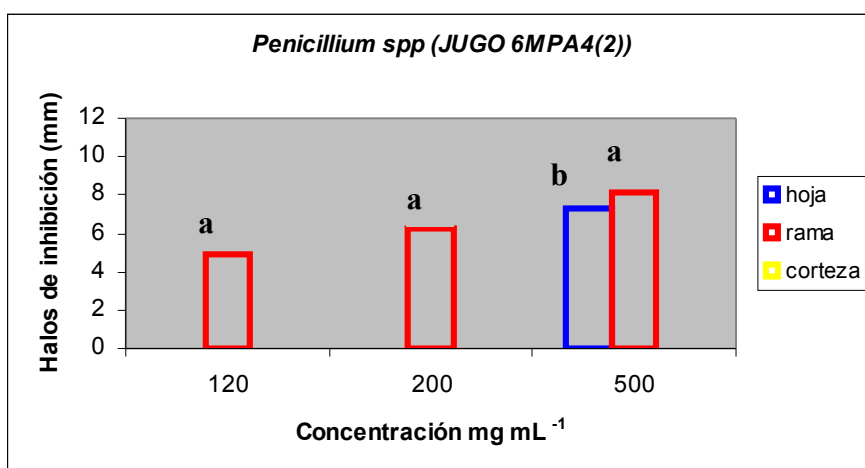
El uso del extracto de corteza para el manejo y control de *cepivorum* (Sc-As) puede ser entonces un nuevo método para vencer el reto que representa un control efectivo de este patógeno.

***Penicillium spp* (JUGO6-MP14(2))**

Las especies del género *Penicillium* son las más comunes y las más destructivas para productos postcosecha (como cítricos, uvas y cebollas) y causan grandes pérdidas económicas especialmente en productos de exportación (Meier, 2005)

El uso indiscriminado de fungicidas sintéticos para atacar a este género ha provocado la adquisición de resistencia así como efectos secundarios sobre organismos considerados como benéficos, debido a esto la legislación sobre el uso y producción de fungicidas es cada vez más estricto (Usall *et al.*, 2005). Es por ello que el uso de tratamientos alternativos como el realizado en este trabajo constituye una línea de investigación para el control de esta especie de hongo debido a los resultados obtenidos al probar los extractos de *Q. rugosa*.

En la gráfica 9 se observa la interacción Estructura-Concentración sobre el tamaño de halo de inhibición, para *Penicillium spp* (JUGO6-MP14 (2)); este hongo fue inhibido por la estructura de rama en sus tres concentraciones (figura 4) siendo la de 120 mg mL⁻¹ la concentración mínima inhibitoria y la estructura de hoja en los 500 mg mL⁻¹ siendo esta su concentración mínima inhibitoria.



Gráfica 9. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Penicillium spp* (JUGO6-MP14(2)); a y b denotan diferencia estadística significativa

Con base al análisis estadístico se determinó que existe diferencia estadística entre los efectos causados por los principios activos de hoja rama y corteza. (Apéndice 2.4 *Penicillium spp* (JUGO6-MP14(2))).

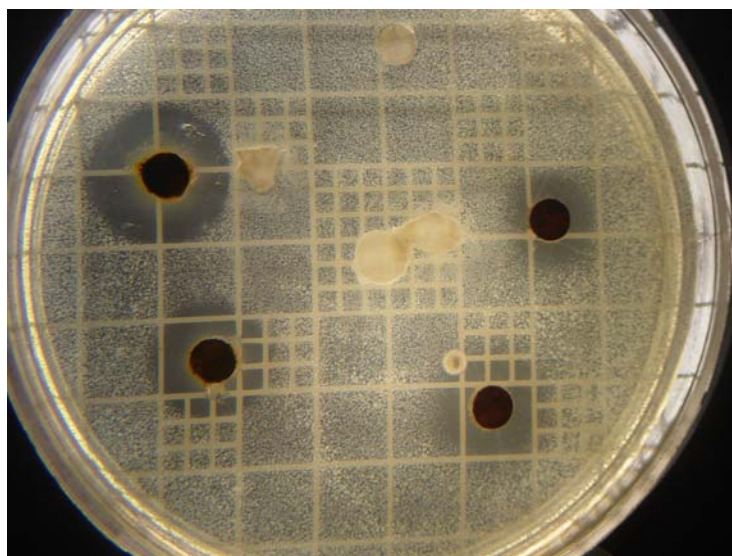
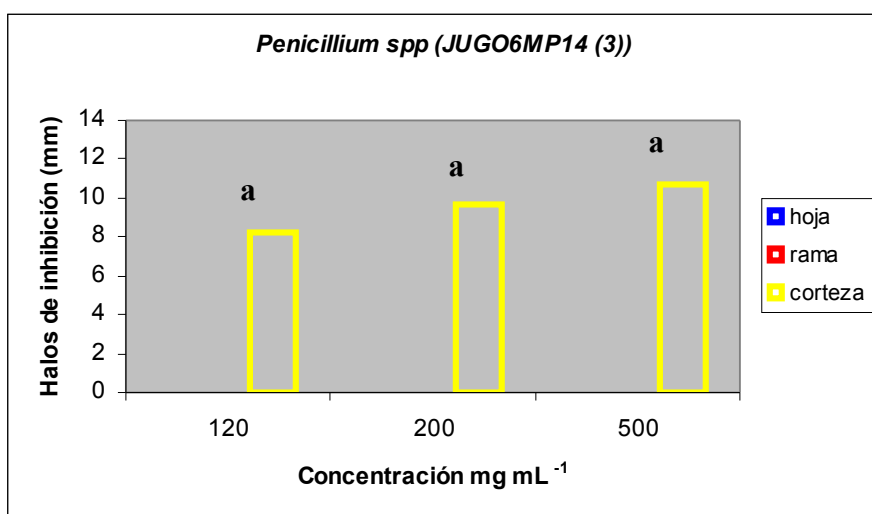


Figura 7. Efecto del extracto de *Q. rugosa* sobre el cultivo de *Penicillium spp* (JUGO6-MP14(2))

Penicillium spp. (JUGO6-MP14(3))

La cepa *Penicillium spp.* (JUGO6-MP14(3)) se muestra resistente ante los extractos de hoja y rama. Los halos de inhibición obtenidos por la estructura de la corteza se presentaron desde la concentración de 120 mg mL⁻¹ siendo esta la mínima inhibitoria; el tamaño del halo de inhibición aumenta conforme aumenta la concentración (Figura 5 y Grafica 10).



Gráfica 10. Interacción estructural/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Penicillium spp.* (JUGO6-MP14(3)); a denota diferencia estadística significativa.

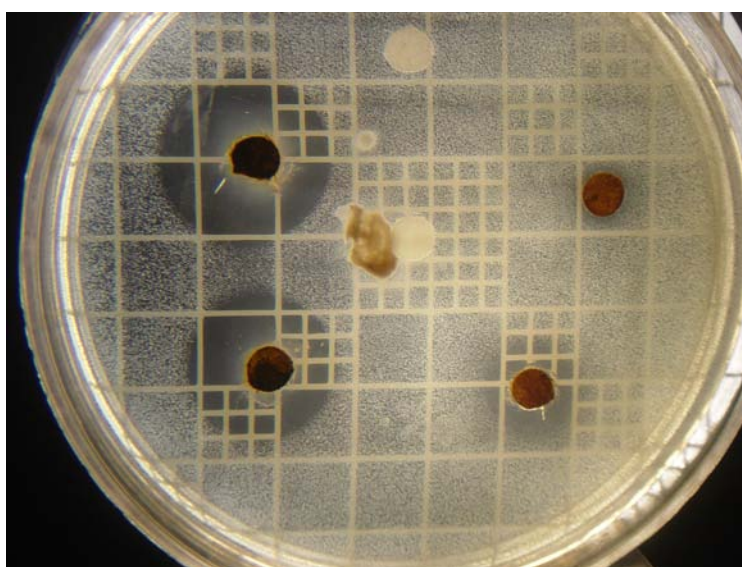


Figura 5. Efecto del extracto de *Q. rugosa* sobre el cultivo de *Penicillium spp.* (JUGO6-MP14(3))

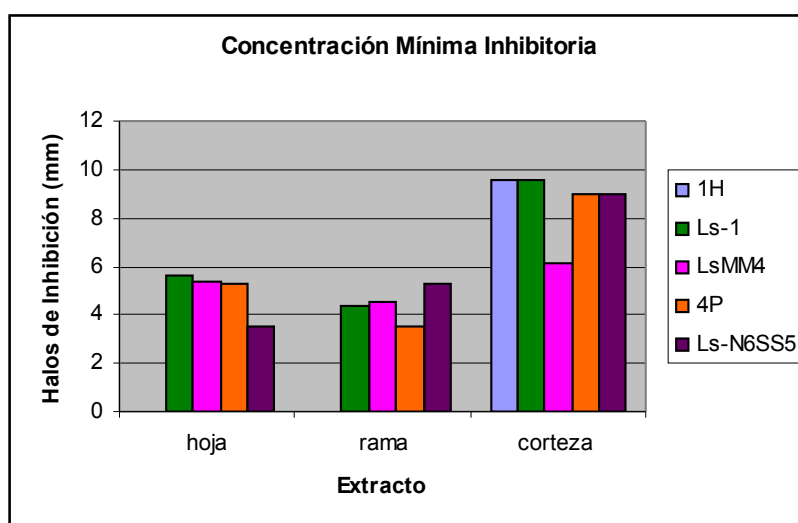
Los resultados obtenidos para este hongo fitopatógeno nos hace reflexionar sobre la agricultura del nuevo milenio ya que hoy en día deben establecerse nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental, que permitan reducir significativamente el uso de plaguicidas, los cuales por su elevado costo, también representan una limitante para los productores. La utilización de extractos vegetales como el estudiado en esta investigación para el control de enfermedades representa una alternativa para el manejo integrado de los cultivos, debido a su bajo costo y al menor impacto sobre el ambiente y los alimentos. No obstante, hay pocos trabajos sobre el control de bacterias y hongos fitopatógenos con extractos de plantas.

Zaccheo (1990) informó que extractos, de meristemas apicales de pera cv. Bartlett al 1% tuvieron efectos bacteriostáticos in vitro contra *E. amylovora*.

4.4 Concentración mínima inhibitoria para organismos fitopatógenos.

Resultados de la concentración mínima inhibitoria del extracto de hoja rama y corteza de *Quercus rugosa* Nee en las diferentes cepas de bacterias y hongos fitopatógenos.

Todas las bacterias fitopatógenas presentaron halos de inhibición en la concentración de los 120 mg mL⁻¹, siendo esta la mínima inhibitoria. *Pseudomona marginalis* (1H) fue la más resistente solo manifestó halos de inhibición para el extracto de corteza a esta concentración mínima (Gráfica 11).



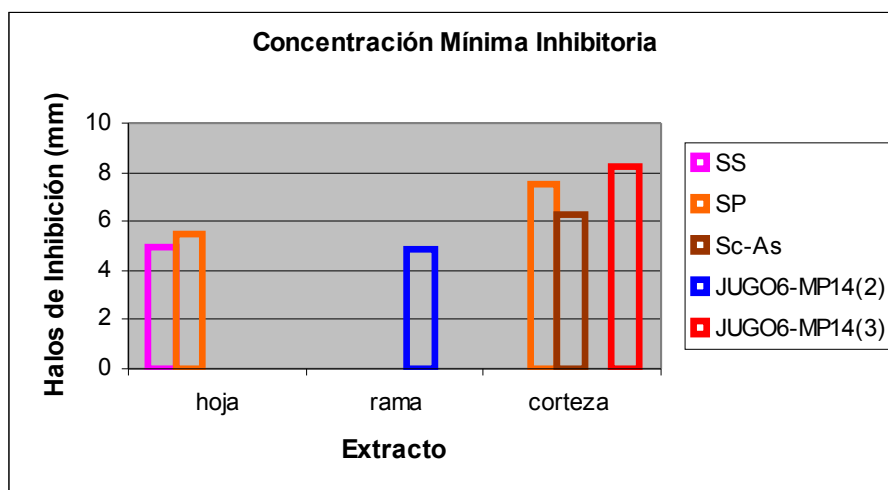
Gráfica 11. Tamaño promedio de halos de inhibición (mm) con las diferentes bacterias fitopatógenas a la concentración mínima inhibitoria del extracto de hoja rama y corteza de *Quercus rugosa* Nee

Pseudomona marginalis (1H); *Pseudomona marginalis* (Ls-1); *Pseudomona marginalis* (LsMM4); *Erwinia carotovora* (4P); y *Erwinia carotovora* (Ls-N6SS5)

Por otro lado los hongos fitopatógenos también presentaron halos de inhibición a esta concentración (120 mg/mL⁻¹) siendo esta la mínima inhibitoria.

El extracto de corteza inhibió a tres de los 5 microorganismos utilizados seguidos de las hojas y por último las ramas.

El hongo menos resistente al efecto inhibitorio de los extractos de *Quercus rugosa* Nee a la concentración mínima inhibitoria (120 mg mL⁻¹) fue *Sclerotinia spp.* (SP) inhibido por los extractos de hoja y corteza, mientras que los demás hongos solo fueron inhibidos por uno de los tres extractos utilizados en dicha prueba como se observa en la Gráfica 12.



Gráfica 12. Tamaño promedio de halos de inhibición (mm) con los diferentes hongos fitopatógenos a la concentración mínima inhibitoria del extracto de hoja rama y corteza de *Quercus rugosa* Nee

Sclerotinia spp. (SS); *Sclerotinia* spp. (SP); *Sclerotium cepivorum* (Sc-As); *Penicillium* spp. (JUGO6-MP14(2)) y *Penicillium* spp. (JUGO6-MP14(3))

La actividad encontrada para los tres diferentes extractos de *Quercus Rugosa* Nee, utilizados sobre cada uno de los fitopatógenos estudiados tanto hongos como bacterias, no solo se debe a la presencia de compuestos con efecto antimicrobiano sino también a la concentración de cada uno de ellos en las diferentes estructuras de la planta.

Así mismo se ha documentado que la concentración de los metabolitos secundarios en las plantas depende de múltiples factores como: la edad, el tipo de suelo, humedad, temperatura, la luz, entre otros por lo tanto es muy variada (Tayler, 1979).

Finalmente el empleo de las plantas medicinales como una alternativa para el control de plagas fitopatógenas así como la disminución del impacto antropogénico provocado por el uso incontrolado de insecticidas que no solo repercuten en la salud del ambiental sino también en la salud humana, resulta una fuente interesante para la obtención de extractos vegetales con actividad antimicrobiana; con el fin de obtener una agricultura sostenible debido a su efectividad, bajo costo pero sobre todo por no representar un contaminante más para el ambiente.

4.5 Microorganismos patógenos inhibidos por las diferentes estructuras y concentraciones del extracto.

El cuadro 8 muestra los casos donde hubo inhibición, así como la concentración y estructura y el número total de microorganismos que presentaron sensibilidad (+) y los que presentaron resistencia (-) al extracto de hoja, rama y corteza.

Cuadro 8. Inhibición de los microorganismos patógenos por los diferentes extractos (hoja, rama y corteza) a las concentraciones de 120, 200 y 500 mg mL⁻¹ de *Quercus rugosa* Nee.

Extracto	Concentración (mg mL ⁻¹)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Total.
Hoja	120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	12
	200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	12
	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	12
Rama.	120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	12
	200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	12
	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
Corteza.	120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
	200	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13
	500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	13

1. *Corybacterium xerosis*; 2. *Escherichia coli*; 3. *Enterococcus faecalis*; 4. *Streptococcus beta-hemolítico*; 5. *Staphylococcus aureus*; 6. *Mycobacterium phlei*; 7. *Streptococcus mutans*; 8. *Candida albicans*; 9. *Candida tropicales*; 10. *Candida krusei*; 11. *Candida stellatoidea*; 12. *Cryptococcus neoformans*; 13. *Geotrichum sp.*

La estructura de la corteza fue la que presentó una mayor inhibición ya que en todas las concentraciones utilizadas (120, 200 y 500 mg mL⁻¹) se inhibieron los patógenos estudiados.

En cuanto a las cepas micóticas para el extracto de rama solo *Candida stellatoidea* presentó resistencia en las concentraciones de 120 y 200 mg mL⁻¹; mientras que el extracto de hoja se presentó como el extracto con menor efecto inhibitorio (respecto al de rama y corteza) al no mostrar resultados ante *Geotrichum sp* que resultó ser el patógeno más resistente al no inhibirse ante ninguna de las concentraciones probadas.

4.6 Pruebas de sensibilidad antimicrobiana en patógenos del hombre.

Solo una pequeña parte de los miles de especies de bacterias causan enfermedades humanas conocidas. Cuando se producen, las enfermedades bacterianas se tratan con antibióticos, pero el abuso de estos compuestos en los últimos años ha favorecido el desarrollo de cepas bacterianas resistentes a su acción.

En la práctica de la medicina moderna es alarmante la generación de resistencia de los microorganismos a distintos antibióticos, esto crea la necesidad de encontrar nuevos compuestos que pueden actuar de forma directa sobre la actividad microbiana o inhibiendo los mecanismos de resistencia de los microorganismos, principalmente aquellos con importancia clínica. Las plantas medicinales representan una fuente muy importante para encontrar esta clase de compuestos (Cowan, 1999).

Por ello, en este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de hoja, rama y corteza frente a diferentes bacterias patógenas del hombre de importancia clínica, observando la siguiente actividad.

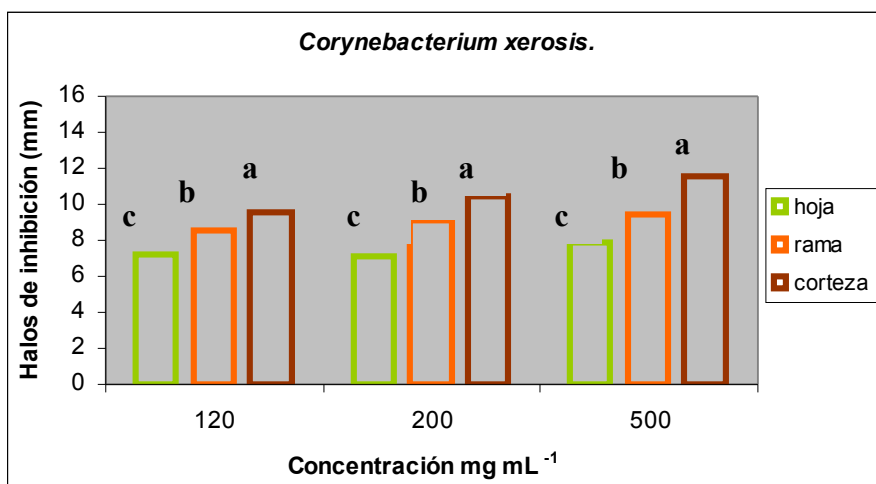
BACTERIAS

Numerosas son las investigaciones que se realizan encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas sobre diferentes bacterias patógenas del hombre a partir de fuentes naturales. Dentro de ellos un considerable número de estudios han sido encaminados hacia la evaluación de actividades antimicrobianas en extractos de plantas medicinales y aromáticas.

Por esta razón se propuso validar el uso tradicional como antimicrobiano de la especie vegetal *Quercus rugosa* obteniéndose los siguientes resultados:

Corynebacterium xerosis

La gráfica 13 muestra que los extractos de *Quercus rugosa* exhiben actividad antibacteriana contra *Corynebacterium xerosis*, formando halos de inhibición que van desde los 4.4 mm hasta los 8.8 mm y cuyo crecimiento se da al aumentar la concentración del extracto utilizado, por lo que la concentración mínima inhibitoria para *Corynebacterium xerosis* corresponde a 120 mg mL⁻¹.

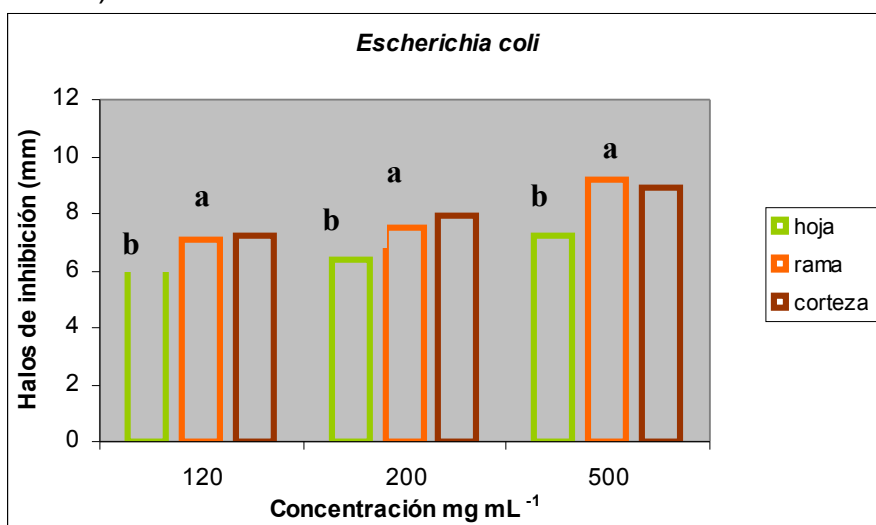


Gráfica 13. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Corynebacterium xerosis*; a, b y c denotan diferencia estadística significativa.

La estructura que presentó los mayores halos de inhibición fue la corteza seguida de la rama y por último la hoja. Las tres estructuras según lo arrojado por el análisis estadístico muestran una diferencia estadística (Apéndice 3.1).

Escherichia coli

Para este microorganismo enteropatógeno agente causal predominante de diarrea en niños que viven en países en vías de desarrollo (Ronald y Richard, 2002), los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de encino probados se muestran en la gráfica 14; el análisis estadístico determinó que se presenta una homogeneidad para las concentraciones de 120 y 200 mg mL⁻¹ para las tres estructuras (Apéndice 3.2 *Escherichia coli*).



Gráfica 14. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Escherichia coli*; a y b denotan diferencia estadística significativa

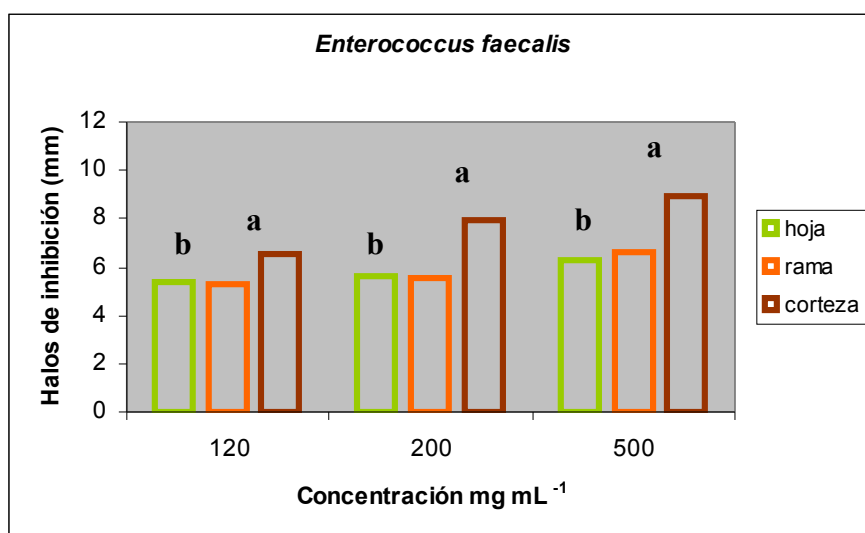
El encino presenta gran valor fitoquímico debido a los metabolitos secundarios que produce, y de manera particular los llamados polifenoles, ya que exhiben actividades antimicrobiana, antioxidante, antimutagénica; estos compuestos se encuentran de manera natural en hojas, corteza y semillas de árboles de encino, lo que significa que no interfieren con el aprovechamiento de la madera. Dentro de los compuestos fenólicos, los taninos son los que muestran una gran actividad antimicrobiana, según la herbolaria tradicional y se encuentran en mayor concentración en la corteza y hojas de encino (Tola, 2001), lo cual concuerda con los resultados obtenidos para *Escherichia coli* la cual fue inhibida por todos los extractos y sus diferentes concentración de *Quercus rugosa* probados en esta investigación

La concentración mínima inhibitoria para los extractos de las tres estructuras fue 120mg mL⁻¹.

Enterococcus faecalis

La inhibición del crecimiento de *Enterococcus faecalis*; debido a la actividad antimicrobiana del encino puede ser observada en la gráfica 15 donde para el extracto de corteza se presentaron los mayores halos de inhibición presentando valores promedios de 6.5, 7.9 y 9 respectivamente.

Para las estructuras de rama y hoja en las concentraciones de 120 y 200 mg mL⁻¹ el efecto inhibitorio del extracto frente a este patógeno es similar y no hay diferencia estadística según lo arrojado por el análisis estadístico en el cual también se observa que la corteza es la única estructura que presenta diferencia estadística marcada (Apéndice 3.3 *Enterococcus faecalis*).

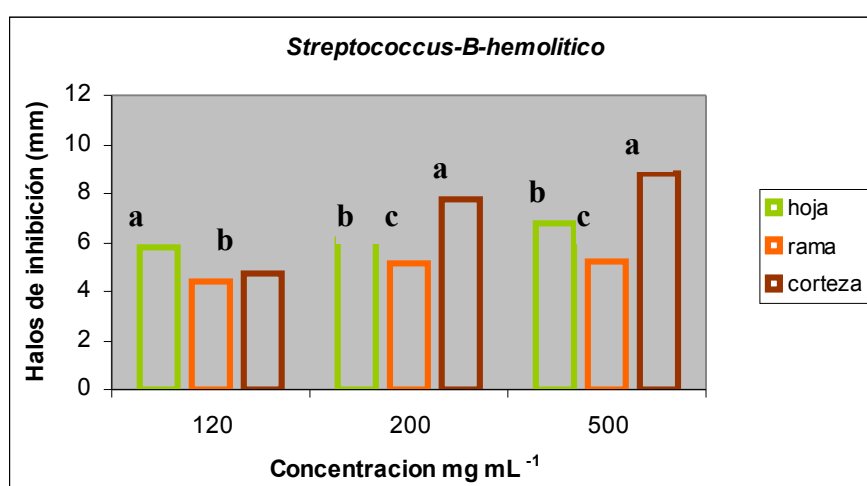


Gráfica 15. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Enterococcus faecalis*.; a y b denotan diferencia estadística significativa

Los trabajos realizados en otras especies plantas medicinales (*Castro et al.*, 1986, *Cáceres et al.*, 1990, *Avelladana et al.*, 2004) que demostraron la presencia de actividad antimicrobiana apoyan los resultados de este trabajo correspondientes a la especie *Quercus rugosa* Nee, lo cual pudiera deberse a la presencia de determinados compuestos comunes en las especies del género.

Finalmente se puede concluir que se requieren estudios posteriores para dilucidar la naturaleza de los principios activos de la corteza del tronco rama y hojas de este encino, responsables de las propiedades antibacterianas del extracto evaluado.

Streptococcus β -hemolítico



Gráfica 16. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Streptococcus* β -hemolítico. ; a, b y c denotan diferencia estadística significativa

Al aplicar los extractos de *Quercus rugosa* a, *Streptococcus* β -hemolítico los resultados mostraron que las diferentes concentraciones tienen actividad antimicrobiana desde la concentración mínima inhibitoria que fue la de 120 mg mL⁻¹.

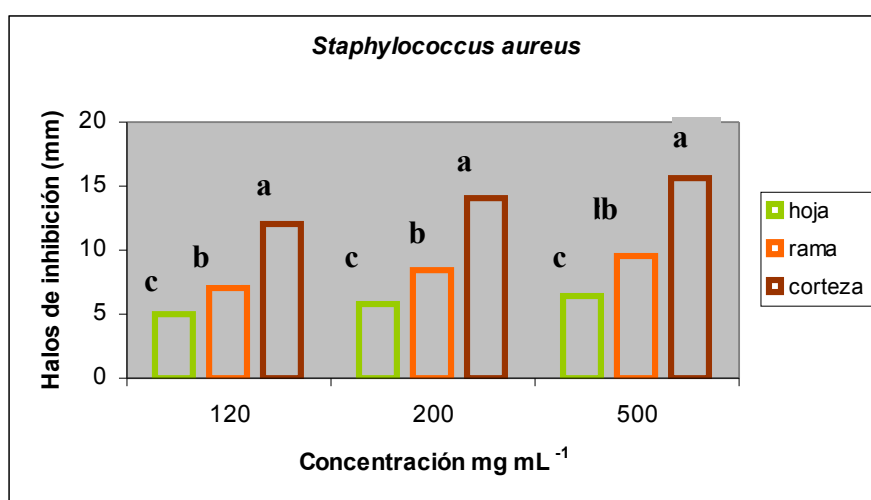
Este efecto se muestra en la gráfica 16 donde se aprecia que la estructura de corteza presenta para las concentraciones de 200 y 500 mg mL⁻¹ los mayores halos de inhibición (con valores alrededor de los 7 y 9 mm) no así para la concentración de 120 mg mL⁻¹ en donde los mejores halos de inhibición fueron presentados por la estructura de la hoja (con halos alrededor de los 6 mm).

En cuanto a la estructura de la rama esta presentó los menores halos de inhibición para todas las concentraciones.

Estadísticamente las tres concentraciones presentan una diferencia marcada. (Apéndice 3.4 *Streptococcus B-hemolítico*).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus demostró ser susceptible a la acción de los extractos de hoja rama y corteza de *Quercus*, proporcionalmente a las concentraciones de los mismos observando un aumento en el diámetro de inhibición en medida que aumentaba la concentración de estos, tal como se observa en la grafica 17.



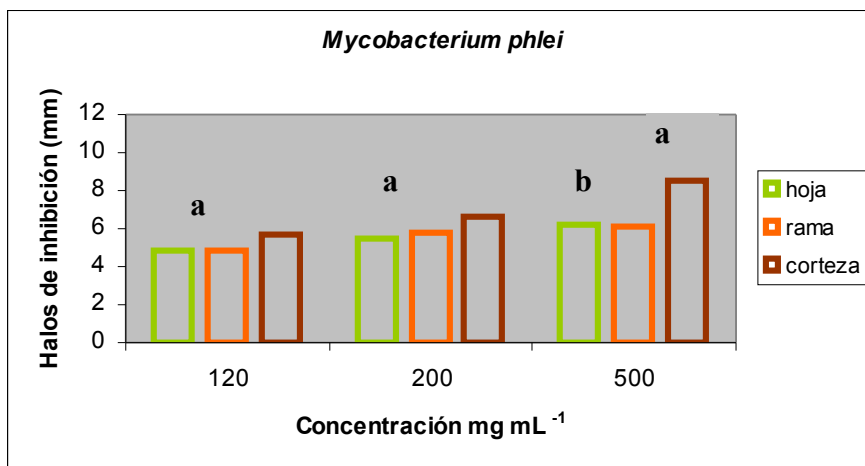
Gráfica 17. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Staphylococcus aureus*.; a, b y c denotan diferencia estadística significativa.

La concentración mínima inhibitoria fue la de 120 mg mL⁻¹, la corteza es la estructura que muestra los mayores halos de inhibición y la hoja los menores. En cuanto a comparaciones múltiples por concentración las estructuras de hoja y rama se comportan como grupos homogéneos (Apéndice 3.5 *Staphylococcus aureus*).

Mediante técnicas de difusión en agar, se demostró que los extractos de *Quercus rugosa* presenta actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* resultados que se encuentran en concordancia con lo demostrado por Romero y colaboradores (2005) quien con estas mismas técnicas, mostró que el extracto etanólico de hojas y corteza de *Polylepis australis* presenta actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, lo cual evidencia que el etanol 70 % es un solvente eficaz para la extracción de productos antimicrobianos debido a que muchos de los compuestos con actividad antibiótica identificados en las plantas son sustancias aromáticas o moléculas orgánicas saturadas, para los cuales el etanol es un solvente ideal.

Mycobacterium phlei

Los valores promedio que muestra la gráfica 18 analizan el tamaño de los halos de inhibición obtenidos en la prueba de sensibilidad aplicada a *Mycobacterium phlei* además se deduce que la concentración mínima es 120 mg mL⁻¹.



Gráfica 18. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Mycobacterium phlei*; a y b denotan diferencia estadística significativa.

Para el caso de la estructura de hoja y rama estas mantienen un comportamiento similar en las concentraciones de 200 y 500 mg mL⁻¹. La estructura que presentó los mejores halos de inhibición para las tres concentraciones fue la corteza con valores que oscilan entre los 5.7 y 8.5 mm como se puede apreciar en la figura 6.

Por otro lado el análisis de comparaciones múltiples realizado nos permite corroborar que las concentraciones de 120 y 500 mg mL⁻¹ se muestran como grupos homogéneos (Apéndice 3.6 *Mycobacterium phlei*).

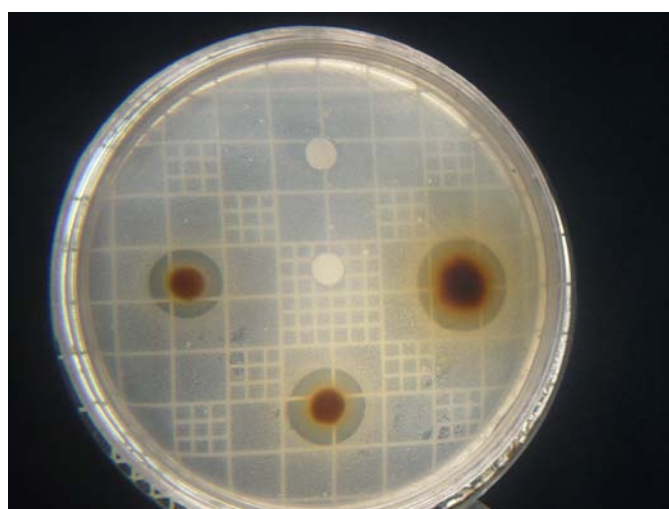
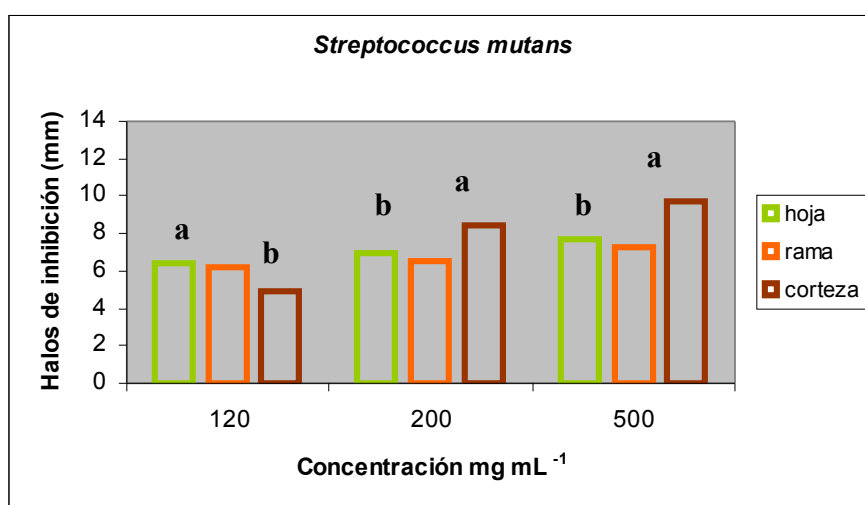


Figura 6. Efecto del extracto de *Q. rugosa* sobre el cultivo de *Mycobacterium phlei*.
Streptococcus mutans

Streptococcus mutans muestra respuesta ante el extracto de encino, la concentración mínima inhibitoria es 120 mg mL^{-1} y la inhibición del patógeno se da en una relación directamente proporcional con la concentración.

Las estructuras que se presentan según el análisis estadístico (Apéndice 3.7 *Streptococcus mutans*) como grupos homogéneos son la hoja y la rama para las tres diferentes concentraciones probadas en este estudio; además dichas estructuras presentan los mayores halos de inhibición para la concentración de los 120 mg mL^{-1} mientras que para los 200 y 500 mg mL^{-1} la corteza es quién presenta dichos halos como se puede apreciar en la gráfica 19.



Gráfica 19. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Streptococcus mutans*; a y b denotan diferencia estadística significativa

Macías en el 2004 en su tesis La Herbolaria Medicinal del Parque Nacional Izta-Popo como Antimicrobiano de Patógenos de la Cavidad Oral menciona que se trabajaron tres tipos de encino entre los que figura *Quercus rugosa* encontrando en las pruebas de sensibilidad antimicrobiana realizadas que los extractos de hoja rama y corteza de dicho encino inhiben el desarrollo de *Streptococcus mutans* lo apoya los resultados obtenidos durante esta investigación.

HONGOS

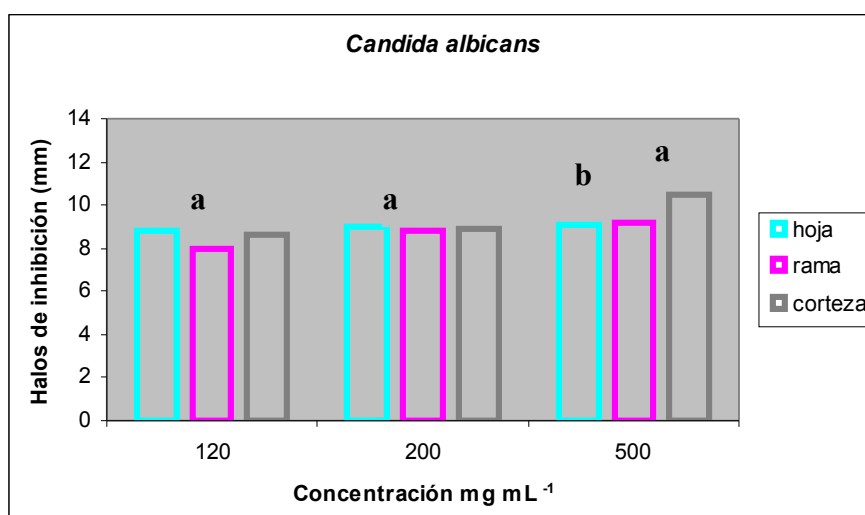
Las micosis varían considerablemente en sus manifestaciones, pero tienden a ser enfermedades subagudas o crónicas de curso indolente y recurrente. Los hongos rara vez causan infecciones agudas como las producidas por muchos virus y bacterias. Las infecciones causadas por hongos afectan la piel, las uñas u otras zonas superficiales y hay muchos fármacos para tratar las infecciones por hongos, entre los que se incluyen medicamentos orales e intravenosos así como muchos agentes de aplicación tópica los cuales generalmente son muy costosos (González y Cameros F, 1996). Los hongos que pertenecen al género *Candida* en especial *Candida albicans* (el cual produce candidiasis), puede

infectar los órganos internos y las membranas mucosas de la boca, garganta y tracto genital y son cada vez mas comunes en la población lo que crea la necesidad de encontrar en las plantas medicinales nuevos compuestos que actúen de forma directa sobre la actividad patógena de estos organismos (González y Cameros F, 1996).

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos utilizados en este trabajo aparecen en las siguientes tablas.

Candida albicans.

En la gráfica 20 se observan los resultados en las distintas condiciones experimentales demostraron que el extracto de corteza evidencia una actividad antimicótica ligeramente mayor que el de hoja y rama para la concentración de 500 mg mL⁻¹ lo que la hace estadísticamente diferente según la pruebas estadística aplicada. Las tres estructuras manifiestan efecto inhibitorio desde los 120 mg mL⁻¹.



Gráfica 20. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Candida albicans*; a y b denotan diferencia estadística significativa.

Para las concentraciones de 120 y 200 mg mL⁻¹ las estructuras se comportan como grupos homogéneos (Apéndice 4.1 *Candida albicans*).

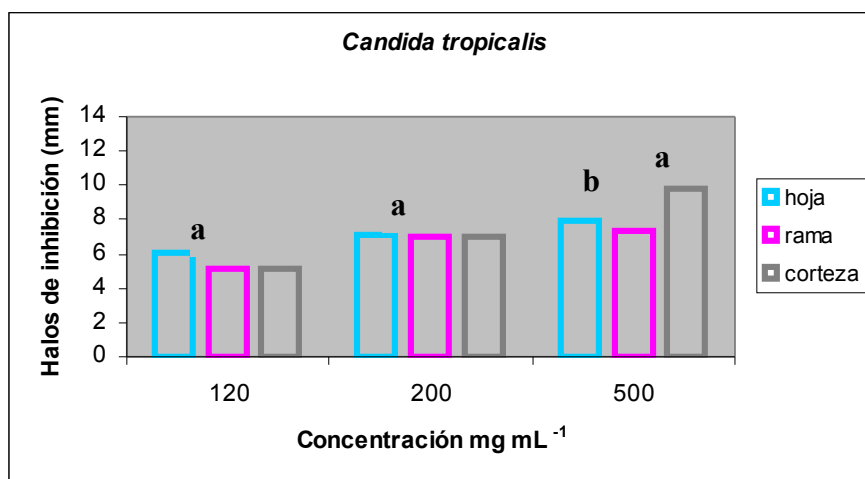
A los 120 mg mL⁻¹ la estructura de la rama obtuvo los menores halos de inhibición con valores promedio de 8 mm; para la concentración de 200 mg mL⁻¹ las tres estructuras presentaron halos de inhibición similares con valores promedio de 9 mm.

La acción antimicrobiana de los extractos vegetales frente a *Candida albicans* se han mostrado en algunos otros estudios como los realizados por Hernández y Rodríguez en el 2001 en donde Con el extracto de *O. Basilicum* L se pone de manifiesto que de las especies microbianas estudiadas las más sensibles resultaron ser las bacterias Gram (+) y la levadura *Candida albicans*.

***Candida tropicalis*.**

El hongo analizado se inhibe ante las tres estructuras probadas a partir de los 120 mg mL⁻¹ siendo esta la concentración mínima inhibitoria (Gráfica 21).

El mayor efecto inhibitorio para la concentración de 120 mg mL⁻¹ lo presentó la estructura de la hoja y las estructuras de rama y corteza tuvieron halos de inhibición similares con valores promedio de 5.1mm, para los 200 mg mL⁻¹ las tres estructuras tuvieron comportamiento similar con halos de 6.9 y 7.1 mm y finalmente para la concentración de 500 mg mL⁻¹ la corteza fue la que manifestó los mayores halos con valores de 9.8 mm.



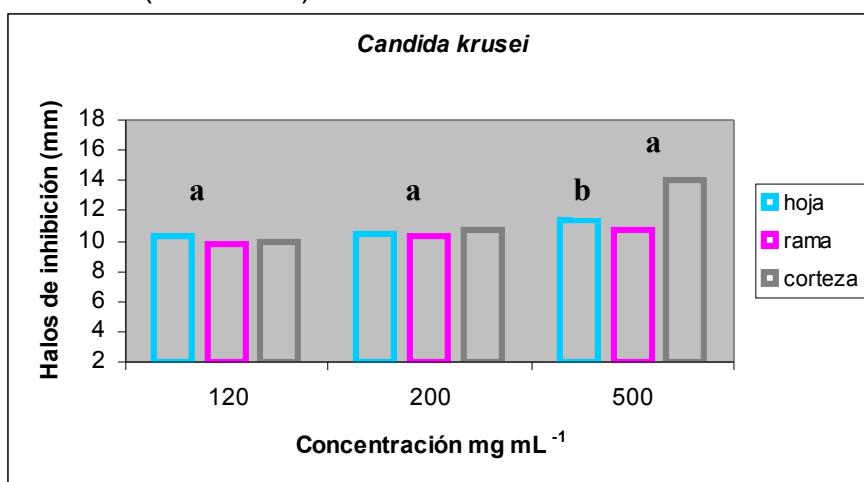
Gráfica 21. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Candida tropicales*; a y b denotan diferencia estadística significativa.

***Candida krusei*.**

Los resultados mostraron que los extractos de *Quercus rugosa* tienen actividad antimicrobiana desde la concentración mínima inhibitoria 120 mg mL⁻¹ para *Candida krusei*.

Para los 120 y 200 mg mL⁻¹ según los resultados del análisis estadístico realizado (Apéndice 4.3 *Candida krusei*) las tres estructuras se comportan como grupos homogéneos con halos de inhibición con valores de 10 mm, para la concentración de 500 mg/mL⁻¹ los halos de mayor tamaño fueron obtenidos

por el extracto de corteza con valores promedio de 13 mm seguida de la hoja y por último la rama (Gráfica 22)

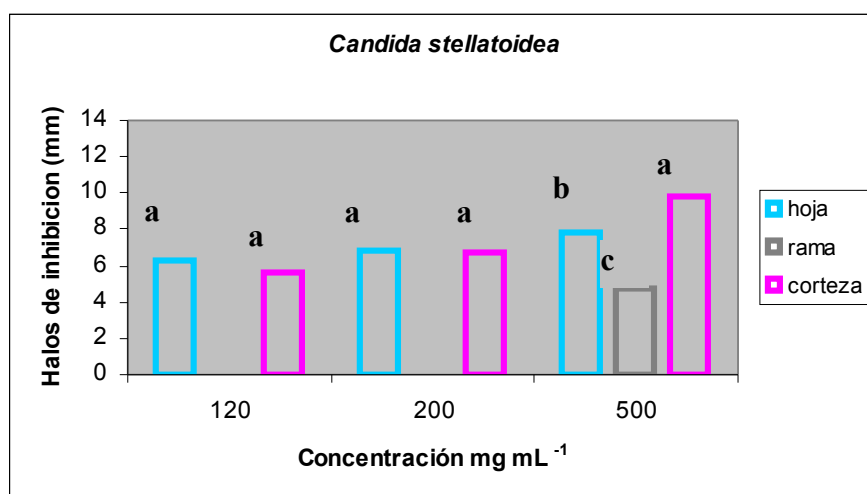


Gráfica 22. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Candida krusei*; a y b denotan diferencia estadística significativa.

Candida stellatoidea.

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de hoja rama y corteza de *Quercus rugosa* aparecen en la gráfica 23. Como se puede apreciar, se evidencia una respuesta de inhibición para *Candida stellatoidea*; aunque no para todos los casos.

Este hongo se mostró resistente ante la estructura de rama para las concentraciones de 120 y 200 mg mL⁻¹ siendo la concentración de 500 mg mL⁻¹ la mínima inhibitoria para dicha estructura. Para la hoja y corteza la concentración mínima inhibitoria corresponde a los 120 mg mL⁻¹.



Gráfica 23. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Candida stellatoidea*; a, b y c denotan diferencia estadística significativa.

De acuerdo con el análisis estadístico realizado, se puede decir que para las concentraciones de 120 y 200 mg mL⁻¹ no existe diferencia estadística entre los efectos causados por los extractos de hoja y corteza, mientras que la concentración de 500 mg/mL⁻¹ es estadísticamente diferente (Apéndice 4.4 *Candida stellatoidea*).

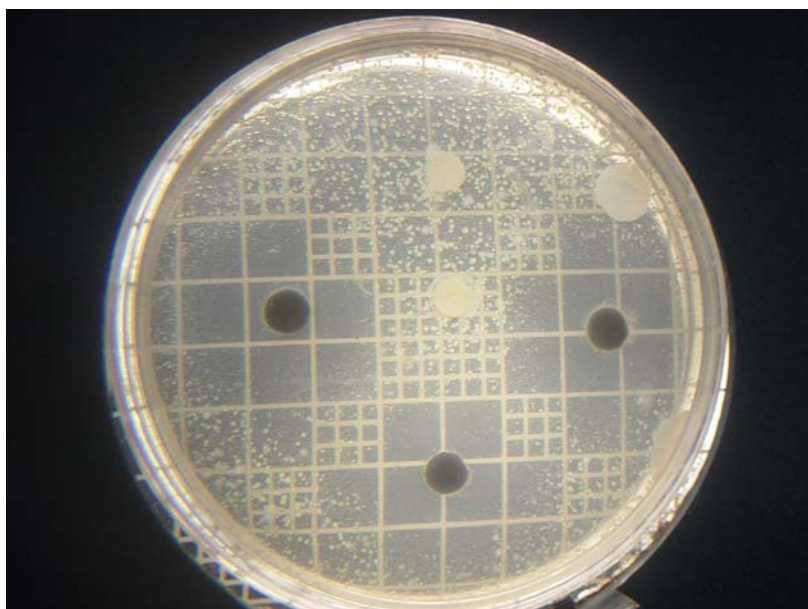
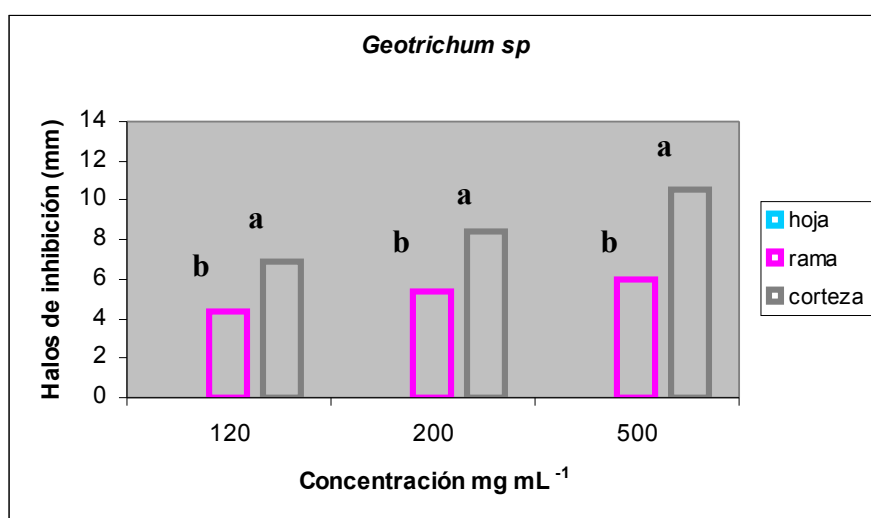


Figura 7. Efecto del extracto de *Q. rugosa* sobre el cultivo de *Candida stellatoidea*.

Geotrichum sp.

Para esta prueba de sensibilidad en la gráfica 24 los resultados evidenciaron que *Geotrichum sp* se muestra resistente ante la estructura de la hoja en sus tres diferentes concentraciones.



Gráfica 24. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Geotrichum sp*; a y b denotan diferencia estadística significativa.

Los mejores halos de inhibición fueron obtenidos por la estructura de la corteza y los mayores halos de dicha prueba se presentaron a la concentración de 500 mg mL⁻¹ con valores promedio de 10.6 mm; lo cual puede relacionarse con lo citado en la literatura en donde se menciona que la composición química de la corteza de los encinos tiene un alto contenido en taninos cuyas propiedades antimicrobianas están relacionadas al control de hongos patógenos como lo es *Geotrichum* (Quer, 1961).

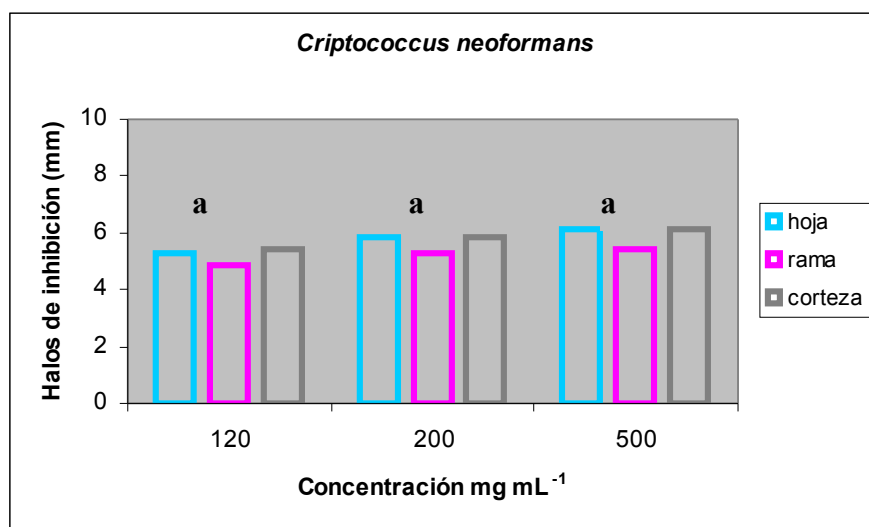
Porter (1989), en el libro Fitoterapia Aplicada reporta varios estudios realizados con *Quercus robur* en donde se evidencian la actividad antimicrobiano de los extractos de corteza de este encino sobre *Geotrichum sp.*

De esta gráfica se puede deducir que para las estructuras de rama y corteza el tamaño del halo de inhibición aumenta conforme aumenta la concentración por lo que la concentración mínima inhibitoria para dichas estructuras es la de 120 mg mL⁻¹. En cuanto a comparaciones múltiples por concentraciones las tres presentan una diferencia estadística marcada. (Apéndice 4.5 *Geotrichum sp*)

Criptococcus neoformans.

La gráfica 25 brinda un panorama general de la interacción entre estructura y la concentración sobre el tamaño de los halos de inhibición para esta cepa.

Se observa claramente que para las tres concentraciones las estructuras de hoja y corteza mostraron un comportamiento similar con halos de inhibición que oscilan entre los 5.3 y 6.1 mm.

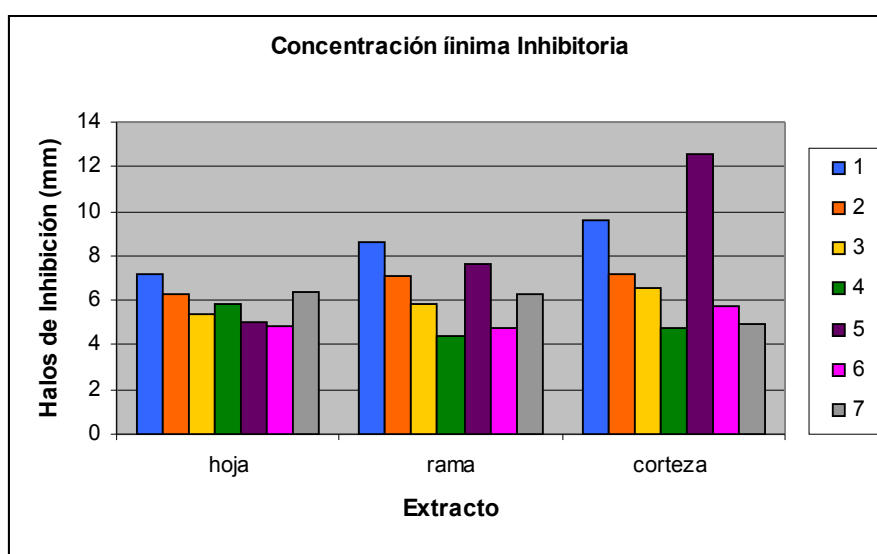


Gráfica 25. Interacción estructura/concentración sobre el tamaño promedio de los halos de inhibición en los cultivos de *Criptococcus neoformans*.

Para las tres estructuras la concentración mínima inhibitoria fue la correspondiente a los 120 mg mL⁻¹ y en cuanto a comparaciones múltiples por concentraciones no se presenta una diferencia estadística marcada. (Apéndice 4.6 *Criptococcus neoformans*)

4.7 Concentración mínima inhibitoria patógena del hombre.

En la gráfica 26 podemos observar que todas las bacterias patógenas del hombre utilizadas en esta investigación tuvieron efecto inhibitorio en la concentración mas baja 120 mg mL⁻¹, siendo esta la concentración mínima inhibitoria.



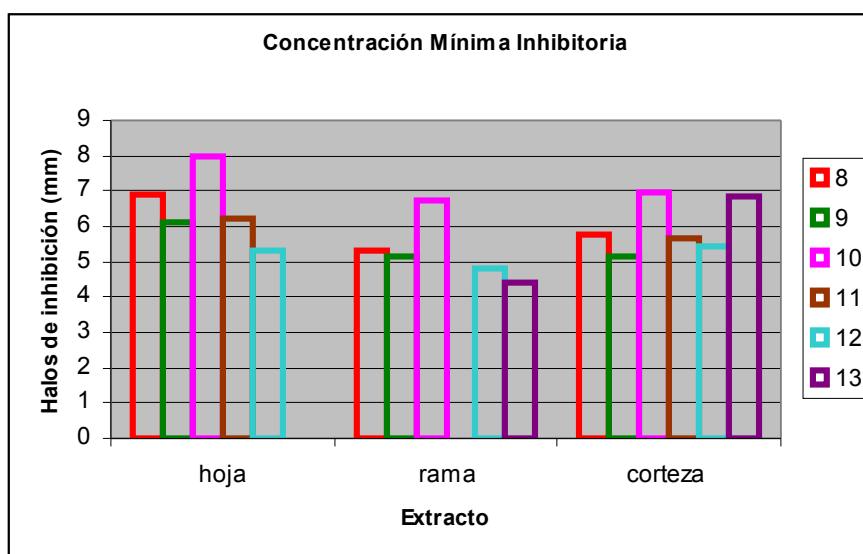
Gráfica 26. Tamaño promedio de halos de inhibición (mm) con las diferentes bacterias patógenas del hombre a la concentración mínima inhibitoria del extracto de hoja rama y corteza de *Quercus rugosa* Nee

1. *Corybacterium xerosis*; 2. *Escherichia coli*; 3. *Enterococcus faecalis*; 4. *Streptococcus beta-hemolítico*; 5. *Staphylococcus aureus*; 6. *Mycobacterium phlei*; 7. *Streptococcus mutans*.

Para el extracto de hoja a dicha concentración *Staphylococcus aureus* (5) demostró ser la bacteria más resistente mientras que para los extractos de rama y corteza a lo fue *Escherichia coli* (2).

Los mayores halos de inhibición a los 120 mg mL⁻¹) fueron obtenidos por *Staphylococcus aureus* (5) para el extracto de corteza mientras que para rama y hoja fue *Streptococcus mutans* (7).

Para el caso de los hongos patógenos la concentración mínima inhibitoria también corresponde a los 120 mg mL⁻¹; el extracto de corteza de *Quercus rugosa* Nee fue quién inhibió el crecimiento de todos los hongos patógenos utilizados, y los extractos de hoja y rama solo inhibieron a 5 de ellos (Grafica 27).



Gráfica 27. Tamaño promedio de halos de inhibición (mm) con los diferentes hongos patógenos del hombre a la concentración mínima inhibitoria del extracto de hoja rama y corteza de *Quercus rugosa* Nee

8. *Candida albicans*; 9 *Candida tropicales*; 10. *Candida krusei*; 11. *Candida stellatoidea*; 12. *Cryptococcus neoformans*; 13. *Geotrichum sp.*

Para el extracto de rama *Candida stellatoidea* se mostró resistente pues solo presentó efecto inhibitorio a la concentración de 500 mg mL⁻¹ siendo esta la concentración mínima inhibitoria para dicho organismo.

Para el caso del extracto de hoja *Geotrichum sp* se mostró como el hongo patógeno más resistente al no presentar inhibición ante ninguna de las concentraciones utilizadas.

El organismo que presentó los mayores halos de inhibición a la concentración mínima inhibitoria fue *Candida krusei* esto para los tres extractos utilizados

Los resultados obtenidos en las distintas condiciones experimentales demostraron la existencia de una actividad antimicrobiana significativa en los extractos de rama hoja y corteza de *Quercus rugosa*, resultados similares se han obtenido con otros extractos de plantas por lo que sería importante seguir realizando estudios de esta índole con el objeto de poner en evidencia el efecto de estos extractos como controles biológicos ante diferentes enfermedades de las plantas y el hombre así como estudios que permitan conocer si a cierta concentración estos extractos y sus metabolitos secundarios al penetrar a un organismo provocan o no reacciones nocivas (toxicidad de la planta).

4.8 Análisis del estudio de espectroscopia infrarroja.

4.8.1 Extracto de Corteza

En el estudio de espectroscopia para el extracto de corteza de *Quercus rugosa* Nee, se presentan los siguientes grupos funcionales (Ver figura 8)

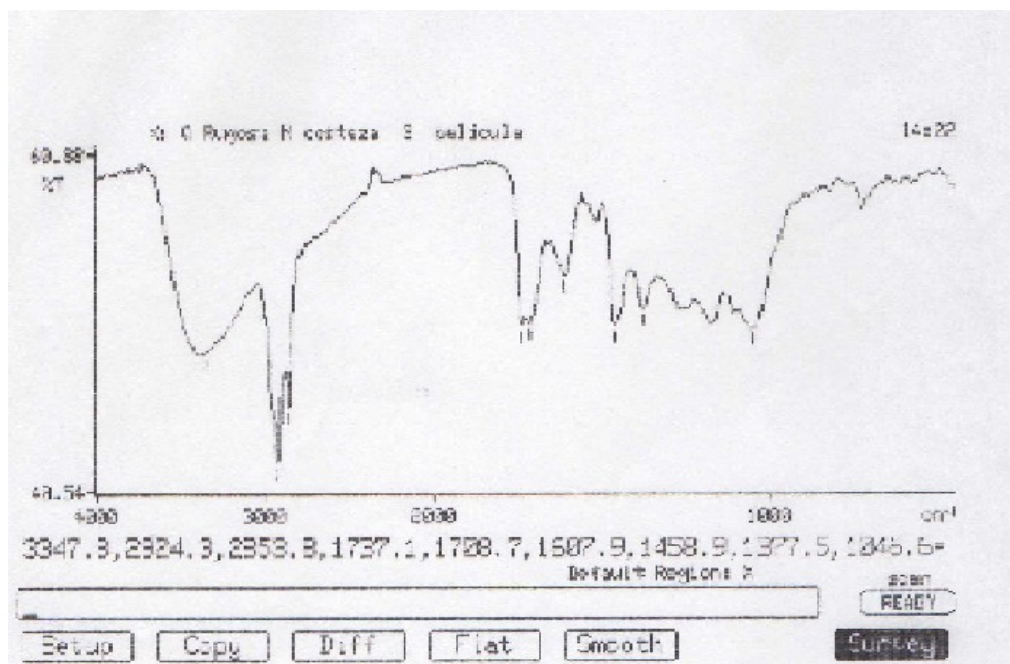


Fig. 8.-Análisis de espectroscopia de infrarrojo para el extracto de Corteza de *Quercus rugosa* Nee.

En el rango de longitud:

3347.8: Presenta OH asociado intermolecularmente a un polímero de banda ancha del tipo de enlace alcohol.

2853.8 -2924.3: Presentan OH asociado intermolecularmente a quelatos (cetonas) formando cetonas β - dicarbonílicas. Los cuales pueden formar polihidroaldehydos también llamados azúcares.

1708.7: Presenta cetonas cíclicas de 7 o más miembros. Presenta huella de benceno (compuesto aromático).

1737.1: Presencia de aldehídos alifáticos (β -cetoester)

1607.9: Presencia de amidas primarias libres.

1458.9: Corresponde a la absorción de la amida. Presenta huella de benceno (compuesto aromático) (Castells y Camps, 1970).

4.8.2 Extracto de Rama

En el estudio de espectroscopia para el principio activo de rama de *Quercus rugosa* Nee, se presentan los siguientes grupos funcionales (Ver figura 9).

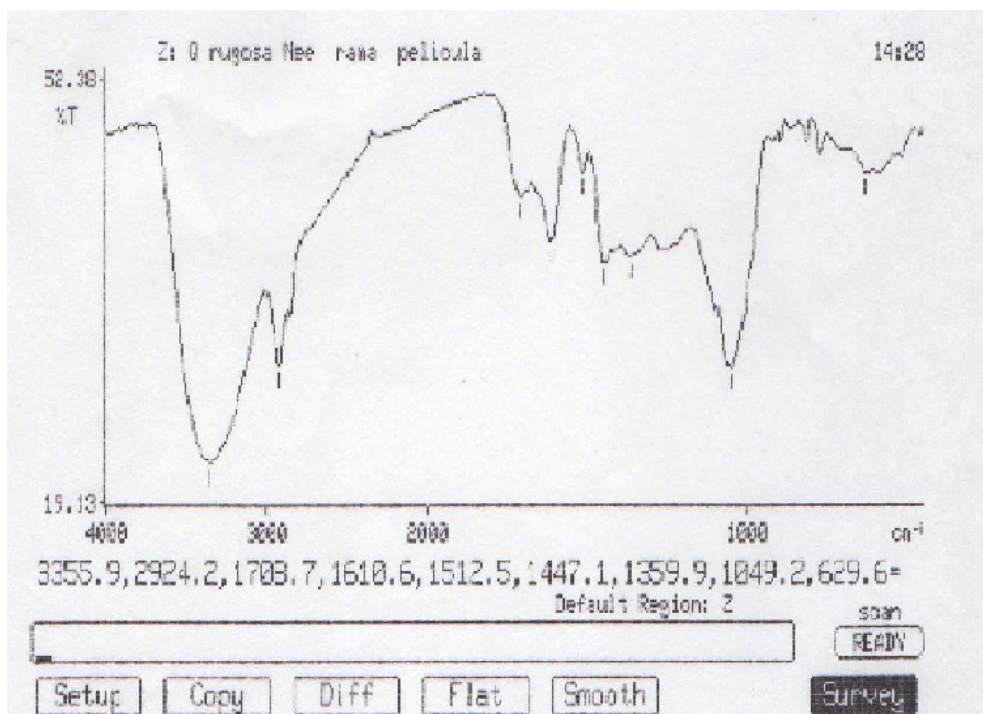


Fig. 9.-Análisis de espectroscopia de infrarrojo para el extracto de Rama de *Quercus rugosa* Nee.

En el rango de longitud:

3355.9: Presenta OH asociado intermolecularmente a un polímero de banda ancha del tipo de enlace alcohol.

2924.2: Presenta OH asociado intermolecularmente a quelatos O-H, O=C (cetonas) formando cetonas β - dicarbonílicas.

1708.7: Presenta cetona cíclica de 7 o mas miembros. Huella de benceno – Aromático.

1610.6: Presenta amida secundaria (β -dicetona quelada C=C)

1512.5: Presencia de grupos aromáticos.

1447.1: Presencia de OH asociado intermolecularmente a un polímero del tipo de enlace, alcohol que podrían ser glucósidos o hidratos de carbono (Castells y Camps, 1970).

4.8.3 Extracto de Hoja

En el estudio de espectroscopia para el principio activo de hoja de *Quercus rugosa* Nee, se presentan los siguientes grupos funcionales (Ver figura 10).

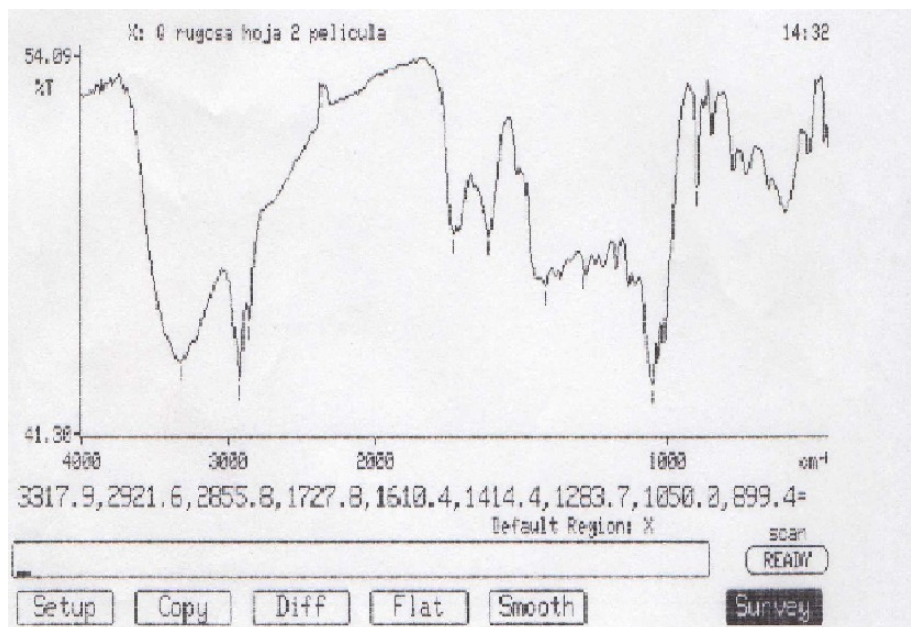


Fig. 10.-Análisis de espectroscopia de infrarrojo para el extracto de Hoja de *Quercus rugosa* Nee.

En el rango de longitud:

3317.9: Presenta OH asociado intermolecularmente a un polímero de banda ancha del tipo de enlace: alcohol, fenol y ácido carboxílico.

2921.6: Presencia de OH asociado intermolecularmente a quelatos formando cetonas β - dicarbonílicas.

2855.8: Presencia de alcanos.

1727.8: β -dicetona. Huella de benceno-Aromático.

1610.4: β -dicetona quelada C=C. Huella de benceno-Aromático.

1414.4: Presenta huella de benceno-Aromático (Castells y Camps, 1970).

La concentración de los metabolitos secundarios no es uniforme dentro de los árboles; generalmente, las mayores cantidades se presentan en la corteza, duramen, raíces, base de las ramas y en los tejidos con heridas. (Obst, 1998).

En lo que se refiere a los principales metabolitos secundarios presentes en los encinos están: los taninos, el ácido salicílico, los ácidos grasos y esteroides así como otros flavonoides. (Zavala, 1996).

Los taninos y el ácido salicílico se encuentran en grandes cantidades en la madera, corteza, hojas y frutos, desempeñan un papel importante ya que se ha propuesto que su función es disuadir a los herbívoros y causar el efecto alelopático sobre otras plantas (respectivamente); el contenido de estos depende de la especie y del tipo de tejido así como del estado de madurez en que se encuentre (Zavala, 1996).

Laks y McKaig (1988) mencionan que los taninos condensables actúan como preservadores naturales y agentes antifúngicos y antibacteriano y que esta es la razón de su presencia en los tejidos externos de las plantas.

Algunas maderas presentan propiedades de resistencia al ataque de insectos y otros organismos degradadores. Esta resistencia natural principalmente es resultado de las adaptaciones que las plantas han desarrollado para disminuir o eliminar dichos ataques; como lo es la biosíntesis de metabolitos secundarios que contienen uno o varios compuestos con una actividad significativa sobre el crecimiento y desarrollo patógenos que permite usarlos como antimicrobianos (Kreckova *et al.* 1988; Reyes, *et al.* 1995).

Con lo anterior se puede inferir que los grupos funcionales que componen a los metabolitos secundarios para las tres estructuras (hoja, rama y corteza) del encino utilizado en esta investigación posiblemente constituyen: lípidos, glucósidos, flavonoides, fenoles, taninos y aceites esenciales.

Se han reportado en diversos trabajos la utilización de diversas especies de encinos, así como de microorganismos patógenos empleados en esta investigación en donde se demuestra la acción antimicrobiana de las plantas medicinales; sin embargo, en cuanto al uso de los extractos como controles biológicos de plagas y parásitos se tiene muy poca información:

Müller-Riebau y colaboradores (1995), en su artículo "Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey" menciona que la fracción fenólica de aceites esenciales de varias plantas aromáticas han mostrado ser tóxicas contra *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Phytophthora capsici*.

Rao y colaboradores (1992), en el artículo "Fungitoxic evaluation of essential oils extracted from higher plants against some sugarcane pathogens *in Vitro*" determinaron la fungitoxicidad de los aceites esenciales de la semilla de *Cuminum cyminum* y de los botones florales de *Syzgium aromaticum*, así como que la fracción aldehídica y fenólica de éstos, mostrando que estos eran los responsables del efecto contra los hongos.

Luna en el 2000, en su libro "Enciclopedia Medica Naturista" menciona que el contenido de flavonoides en aloe, frágula, cáscara sagrada y caña brindan propiedades antifúngicas frente a cepas de *Candida albicans* y *Candida stellatoidea*.

Macías en el 2003 en su tesis “La herbolaria Medicinal del Parque Nacional Izta-Popo Como Antimicrobiano de Patógenos de la Cavidad Oral” menciona que se trabajaron tres tipos de encino entre ellos *Quercus rugosa*; en las pruebas de sensibilidad microbiana se obtuvo que el principio activo de la rama inhibió a *Streptococcus β -hemolítico*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* encontrándose en él los siguientes grupos funcionales: aminas secundarias, alcanos, cetonas, nitratos, sulfoxidos, quelatos, carboxilos y fenoles.

Kukinskli (2003), en su libro “Farmacognosia; Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentos de Origen Natural” menciona que las agallas resultantes de las protuberancias de los brotes de las ramas jóvenes de *Quercus infectoria* producidas por *Cynpis gallae tinctoriae*, contienen taninos; el principal es el tanino gálico o ácido galatánico los cuales tienen propiedades astringentes, antisépticas, antidiarreicos, hemostáticas y vasoconstrictoras.

Céspedes y colaboradores (2006), probaron los extractos metanólico y clorofórmico de *Tagetes lucida*, así como los flavonoides y cumarinas aislados a partir de estos extractos, y reportaron su efecto sobre bacterias patógenas del hombre como *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus* así como en los hongos *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Finalmente puede decirse que la actividad presentada por los diferentes extractos probados sobre cada uno de los patógenos estudiados (patógenos del hombre y fitopatógenos) se debe a la presencia de compuestos con efecto antimicrobiano y a la concentración de estos en las diferentes estructuras de la planta así como múltiples factores como la edad y el tipo de suelo, altitud, latitud, el clima (temperatura, humedad, radiación solar), los métodos de cultivo entre otros.

4.9 Resultados de las propiedades físicas y químicas del suelo

En el cuadro 9 se muestran los valores obtenidos de las propiedades físicas y químicas del suelo presente en la zona de muestreo donde crece *Quercus rugosa* Nee.

Cuadro 9. Resultado de las propiedades físicas y químicas del suelo donde crece *Quercus rugosa* Nee.

PRUEBA	RESULTADO
pH real (acuoso).	5.8
pH potencial (KCl).	5.4
% de materia orgánica.	6.5
Densidad aparente (g/cc).	1
Densidad real (g7cc).	2.2
% espacio poroso	59
% de humedad.	35
Textura.	Franco arenoso
% arena.	58
% limo.	25.3
% de arcilla.	16.7
Tipo de suelo	Andisol.

Este cuadro muestra los valores de pH que son de 5.8 el real y el potencial de 5.4 lo que indica que son suelos moderadamente ácidos, según la norma oficial mexicana para suelos (NOM-021-RECNAT-2000), similar a los pH donde crecen los encinos, los cuales son suelos de reacción ácido moderada (pH 5.5 a 6.5), ello nos indica un alto contenido de materia orgánica, no hay deficiencia de hierro y aluminio (Rzedowski, 1994).

La Materia Orgánica fue de 6.5% lo cual le corresponde un nivel medio alto por lo tanto es un suelo de origen volcánico. Se sabe además que la presencia de Materia Orgánica favorece así mismo las relaciones convenientes entre el aire y el agua (mejora la infiltración de agua y reduce su pérdida por evaporación), (Siebe *et al.*, 1996), el porcentaje de humedad para este suelo fue de 35% y en correlación con la porosidad presente (59% de espacio poroso) que en este tipo de suelos es muy alta y junto a la densidad aparente de 1 g/cm³ y la densidad real obtenida de 2.2 g/cm³ , se puede decir que el suelo presenta textura media (Franco arenosa) compuesta por un 58% de arena, 25.3% de limo y 16.7% de arcilla lo que hace que este tipo de suelos se caractericen por ser ligeros, con buena aireación y presenten un drenaje eficiente; debido a la formación de ciertos agregados para evitar que el agua filtrada se pierda a través del perfil; lo que constituye una propiedad útil para especies vegetales ya que el crecimiento radicular no tendrá resistencia y podrán penetrar a gran profundidad y tomar los nutrimentos necesarios para su desarrollo (Robert G., y Frederick R,1980). La determinación de los parámetros físicos y químicos de una muestra de suelo representativa del sitio donde crece *Quercus rugosa* Nee permitió evaluar y corroborar que este corresponde a suelos de tipo Andisol según lo correspondiente a lo dicho en la carta edafológica INEGI, 2001.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- El mejor rendimiento en cuanto al peso del extracto seco en porcentaje lo obtuvo la estructura de la corteza seguida de hoja y por último la rama.
- Los extractos de las estructuras (hoja rama y corteza) de *Quercus rugosa* Nee, en las condiciones de los ensayos realizados presentaron actividad antimicrobiana frente a las especies de fitopatógenas y patógenas del hombre utilizados.
- La parte de la planta que presentó mayor actividad antimicrobiana fue la corteza, seguida por la rama y por la hoja.
- La concentración mínima inhibitoria para los tres diferentes extractos probados en esta investigación fue la correspondiente a los 120 mg mL⁻¹.
- Para los extractos de hoja, rama y corteza utilizados en esta investigación se presentan grupos funcionales como son: OH asociados a un alcohol, OH asociado intermolecularmente a una cetona β- dicarbonilica y compuestos aromáticos.
- El suelo donde crece *Quercus rugosa* Nee, tiene las siguientes características; es ácido, con alto contenido en materia orgánica, arenoso lo que le confiere buena aireación y drenaje, características de un Andisol.
- Se concluye de manera general, que la especie *Quercus rugosa* Nee es un árbol cuyos extractos actúan como antibacterianos y antimicóticos frente a fitopatógenos y patógenos del hombre, cumpliéndose la hipótesis establecida.

CAPITULO VI

RECOMENDACIONES

- Realizar pruebas de toxicidad para evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico contenido en los extractos puede ocasionar sobre la salud humana así como también si el extracto afecta a la microbiota edáfica benéfica con la cual interacciona la planta.
- La continuación del estudio al realizar la prueba *in vivo* y determinar así el comportamiento de los extractos así como la interacción de estos con los patógenos del hombre.
- Fomentar el estudio de las plantas medicinales no solo hacia la salud humana sino también como una alternativa en la protección de cultivos contra la acción de organismos fitopatógenos y malezas cuya actividad, selectividad y seguridad ambiental sea adecuada.

APENDICE

APENDICE 1. BACTERIAS FITOPATOGENAS.

1.1 *Pseudomona marginalis* (1H)

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Estructura)

Método: 95.0 por ciento LSD

Estructura	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
------------	--------	-------	-------------------

Rama	30	0.0	X
Hoja	30	0.625	X
Corteza	30	8.86667	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
-----------	------------	-------------

Corteza - Hoja	*8.24167	0.549903
Corteza - Rama	*8.86667	0.549903
Hoja - Rama	*0.625	0.549903

* Muestran una diferencia estadística significativa.

1.2 *Pseudomona marginalis* (Ls-1)

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Estructura)

Método: 95.0 por ciento LSD

Estructura	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
------------	--------	-------	-------------------

Rama	30	2.675	X
Hoja	30	4.48333	X
Corteza	30	7.64167	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
-----------	------------	-------------

Corteza - Hoja	*3.15833	1.23274
Corteza - Rama	*4.96667	1.23274
Hoja - Rama	*1.80833	1.23274

* Muestran una diferencia estadística significativa.

1.3 *Pseudomona marginalis* (LsMM4)

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Estructura)

Método: 95.0 por ciento LSD

Estructura	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
------------	--------	-------	-------------------

Rama	30	2.24167	X
Hoja	30	4.15	X
Corteza	30	6.66667	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
-----------	------------	-------------

Corteza - Hoja	*2.51667	1.21529
Corteza - Rama	*4.425	1.21529
Hoja - Rama	*1.90833	1.21529

* Muestran una diferencia estadística significativa.

1.4 *Erwinia carotovora* (4p)

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Estructura)

Método: 95.0 por ciento LSD

Estructura Conteo Media Grupos Homogéneos

Rama	30	3.8	X
Hoja	30	4.65	X
Corteza	30	7.41667	X

Contraste Diferencia +/- Limites

Corteza - Hoja	*2.76667	0.785859
Corteza - Rama	*3.61667	0.785859
Hoja - Rama	*0.85	0.785859

* Muestran una diferencia estadística significativa.

1.5 *Erwinia carotovora* (Ls-N6SS5)

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Estructura)

Método: 95.0 por ciento LSD

Estructura Conteo Media Grupos Homogéneos

Hoja	30	2.20833	X
Corteza	30	6.375	X
Rama	30	6.71667	X

Contraste Diferencia +/- Limites

Corteza - Hoja	*4.16667	1.10792
Corteza - Rama	-0.341667	1.10792
Hoja - Rama	*-4.50833	1.10792

* Muestran una diferencia estadística significativa.

APENDICE 2. HONGOS FITOPATOGENOS.

2.1 *Sclerotinia* spp. (SS).

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Estructura)

Método: 95.0 por ciento LSD

Estructura Conteo Media Grupos Homogéneos

Corteza	30	0.0	X
Rama	30	0.0	X
Hoja	30	6.56667	X

Contraste Diferencia +/- Limites

Corteza - Hoja	*-6.56667	0.142704
Corteza - Rama	0.0	0.142704
Hoja - Rama	*6.56667	0.142704

* Muestran una diferencia estadística significativa.

2.2 *Sclerotinia* spp. (SP)

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Estructura)

Método: 95.0 por ciento LSD

Estructura	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
Rama	30	0.0	X
Hoja	30	6.93333	X
Corteza	30	9.30833	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
Corteza - Hoja	*2.375	0.400667
Corteza - Rama	*9.30833	0.400667
Hoja - Rama	*6.93333	0.400667

* Muestran una diferencia estadística significativa.

2.3 *Sclerotium cepivorum* (Sc-As)

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Estructura)

Método: 95.0 por ciento LSD

Estructura	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
Rama	30	0.0	X
Hoja	30	0.0	X
Corteza	30	7.80833	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
Corteza - Hoja	*7.80833	0.211713
Corteza - Rama	*7.80833	0.211713
Hoja - Rama	0.0	0.211713

* Muestran una diferencia estadística significativa.

2.4 *Penicillium* spp (JUGO6-MP14(2))

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Estructura)

Método: 95.0 por ciento LSD

Estructura	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
Corteza	30	0.0	X
Hoja	30	2.39167	X
Rama	30	6.45	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
Corteza - Hoja	*-2.39167	0.362227
Corteza - Rama	*-6.45	0.362227
Hoja - Rama	*-4.05833	0.362227

* Muestran una diferencia estadística significativa.

2.5 *Penicillium* spp. (JUGO6-MP14(3))

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Estructura)

Método: 95.0 por ciento LSD

Estructura	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
Hoja	30	0.0	X
Rama	30	0.0	X
Corteza	30	9.14167	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
Corteza - Hoja	*9.14167	0.462393
Corteza - Rama	*9.14167	0.462393
Hoja - Rama	0.0	0.462393

* Muestran una diferencia estadística significativa.

APENDICE 3. BACTERIAS PATOGNAS DEL HOMBRE.

3.1 *Corynebacterium xerosis*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
120	30	5.70833	X
200	30	6.275	X
500	30	6.95	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
120 - 200	*-0.566667	0.370812
120 - 500	*-1.24167	0.370812
200 - 500	*-0.675	0.370812

* Muestran una diferencia estadística significativa.

3.2 *Escherichia coli*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
120	30	3.89167	X
200	30	4.28333	X
500	30	5.3	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
120 - 200	-0.391667	0.726658
120 - 500	*-1.40833	0.726658
200 - 500	*-1.01667	0.726658

* Muestran una diferencia estadística significativa

3.3 *Enterococcus faecalis*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
120	30	5.73333	X
200	30	6.375	X
500	30	7.425	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
120 - 200	*-0.641667	0.290851
120 - 500	*-1.69167	0.290851
200 - 500	*-1.05	0.290851

* Muestran una diferencia estadística significativa

3.4 *Streptococcus B-hemolítico*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
120	30	4.99167	X
200	30	6.34167	X
500	30	6.95	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
120 - 200	*-1.35	0.391489
120 - 500	*-1.95833	0.391489
200 - 500	*-0.608333	0.391489

* Muestran una diferencia estadística significativa

3.5 *Stapylococcus aureus*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
120	30	5.4	X
200	30	6.04167	X
500	30	7.18333	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
120 - 200	-0.641667	0.730738
120 - 500	*-1.78333	0.730738
200 - 500	*-1.14167	0.730738

* Muestran una diferencia estadística significativa

3.6 *Mycobacterium phlei*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
120	30	5.14167	X
200	30	5.94167	X
500	30	6.95	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
120 - 200	*-0.8	0.467278
120 - 500	*-1.80833	0.467278
200 - 500	*-1.00833	0.467278

* Muestran una diferencia estadística significativa

3.7 *Streptococcus mutans*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
120	30	5.84	X
200	30	7.30833	X
500	30	8.23333	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
120 - 200	*-1.46833	0.395586
120 - 500	*-2.39333	0.395586
200 - 500	*-0.925	0.395586

* Muestran una diferencia estadística significativa

APENDICE 4. HONGOS PATOGENOS DEL HOMBRE.

4.1 *Candida albicans*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
120	30	5.98333	X
200	30	6.61667	X
500	30	7.45	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
120 - 200	-0.633333	1.61915
120 - 500	-1.46667	1.61915
200 - 500	-0.833333	1.61915

* Muestran una diferencia estadística significativa

4.2 *Candida tropicales*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
---------------	--------	-------	-------------------

120	30	5.48333	X
200	30	5.8025	X
500	30	8.35	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
-----------	------------	-------------

120 - 200	*-1.54167	0.950512
120 - 500	*-2.86667	0.950512
200 - 500	*-1.325	0.950512

* Muestran una diferencia estadística significativa

4.3 *Candida krusei*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
---------------	--------	-------	-------------------

120	30	7.23333	X
200	30	7.675	X
500	30	9.25833	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
-----------	------------	-------------

120 - 200	-0.441667	1.54994
120 - 500	*-2.025	1.54994
200 - 500	*-1.58333	1.54994

* Muestran una diferencia estadística significativa

4.4 *Candida stellatoidea*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
---------------	--------	-------	-------------------

120	30	3.96667	X
200	30	4.54167	X
500	30	7.46667	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
-----------	------------	-------------

120 - 200	-0.575	1.48817
120 - 500	*-3.5	1.48817
200 - 500	*-2.925	1.48817

* Muestran una diferencia estadística significativa

4.5 *Geotrichum sp*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
---------------	--------	-------	-------------------

120	30	3.75833	X
200	30	4.6	X
500	30	5.53333	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
-----------	------------	-------------

120 - 200	*-0.841667	0.329737
120 - 500	*-1.775	0.329737
200 - 500	*-0.933333	0.329737

* Muestran una diferencia estadística significativa

4.6 *Cryptococcus neoformans*

Prueba de comparaciones múltiples de Tukey (Inhibición por Concentración)

Método: 95.0 por ciento LSD

Concentración	Conteo	Media	Grupos Homogéneos
---------------	--------	-------	-------------------

120	30	5.19167	X
200	30	5.66667	X
500	30	5.91667	X

Contraste	Diferencia	+/- Limites
-----------	------------	-------------

120 - 200	-0.475	0.246635
120 - 500	-0.725	0.246635
200 - 500	-0.25	0.246635

* Muestran una diferencia estadística significativa

LITERATURA CITADA

- Acosta de la Luz, L. 2003. "Principios agroclimáticos básicos para la producción de las plantas medicinales". Revista Cubana de Plantas Medicinales. Ene-Abr, 8:1 227.
- Acosta de la Luz, L. 2003. "Sobre la desinfección de las drogas vegetales". Revista Cubana de Plantas Medicinales. May- Ago, 8: 2.
- Adandonon, A., Aveling, T., Labuschagne, N. y Tamo, M. 2006. "Biocotrol Agents in Combination with *Moringa oleifera* Extract for Integrated Control of Sclerotium- Caused Cowpea Damping- Off and Stem Rot". European Journal of Plant Pathology 115: 409-418.
- Agrios N. G. 1996. "Fitopatología". UTEHA Noriega Editores. D.F., México.
- Aguilar A. 2001. "Guía de Plantas Medicinales". Revista México Desconocido. Edición Especial. México DF. .
- Alesón A. 2004. "Todo sobre las Plantas Medicinales". 1ª edición. Televisa. México.
- Alfaro, T; M. Chalala; C. Rodríguez; R. Ramos; C, Carballo y C. Cabeza. 2000 "Lavado y desinfección de drogas vegetales. Normas Técnicas. Procesos Tecnológicos (proyecto)". Departamento de Control Microbiológico del Centro de Investigación y desarrollo de Medicamento.
- Anónimo. 1988. "Desarrollo y Control de las enfermedades de las Plantas. Control de Plagas de Plantas y Animales". Vol 1. Limusa. National Academy of Sciences. D.F., México.
- Aranda O S. 2002. "Enfermedades Bacterianas en Ornamentales. In: "Manejo Fitosanitario en Ornamentales". N. Bautista M., J. Álvarez L, J. C. Chavarría P, H. Sánchez A. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, 156 pp.
- Awuah RT. 1994. "In vivo use of extracts from *Ocimum gratissimum* and *Cymbopogon citratus* against *Phytophthora palmivora* causing blackpod disease of cocoa". Annals of Applied Biology. 124:173-178.
- Bailón L., González R., y Cervantes A. 2005. "Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias" 1ª edición. UNAM. México.
- Barquín M. 1995. "Historia de la medicina". Méndez. México.
- Beedson. 2002. "Antibiogramas". (Serial online). (cited 2009 enero 2) <http://www.beedson.com.ar/revista/antibiogramas.htm>.
- Bender Carol L. 1999. "Chlorosis-inducing phytotoxins produced by *Pseudomonas syriengae* .Journal of Plant Pathology. 105: 1-12.
- Bianchi A, Zanbonelli A, Zenechi A, Bellesia F. 1997. "Ultra structural studies of the effect of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi *in vitro*". Plant disease Journal. 81: 1241-1246.
- Blumenthal M., Goldberg A., y Brinkmann J. 2000. "Herbal Medicine Monographic Encinos". ABC. Estados Unidos.
- Bonkole, S.A Adebanjo, A. 1996. "Inhibition of growth of dome plant pathogenic fungi using from some Nigerian plants". International Journal of Tropical Plant Disases. Nigeria. 13 (1): 91-95.
- Bovey F.A, L. Jelinski, P.A. Mirau.1988. "Nuclear Magnetic Resonance". Academic Press, NY.
- Bown D. 1996. "Enciclopedia de las hierbas y sus usos" .1ª edición. Grijalva. Sociedad de Horticultura. Barcelona, España.

- Braude A., y Davis C. 1984. "Microbiología clínica". Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Bruneton, J. 1991. "Elementos de Fotoquímica y de Farmacognosia". Acribia. Zaragoza. España.
- Castells J. y Camps F. 1970. Elucidación estructura de Compuestos Orgánicos por métodos Espectroscópicos. Alhambra. Madrid, Barcelona.
- Cebrian J. 2002. "Diccionario Integral de Plantas Medicinales". 1ª edición. Editor. México.
- Celeste, L. M.; Marcelo G. 2008. "Manual de procedimientos Sensibilidad a los antimicrobianos en *Campylobacter* spp". Dpto. Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbran" Centro Regional de Referencia WHO-Global Slam Surv para América del Sur.
- Cervantes, S.A., Marques, S.M.J. y Rivera, G.P. 2006. "Análisis Estadístico. Un enfoque práctico con Statgraphics". FES-Z. UNAM. México.
- Céspedes, C.; G. Ávila; A. Martínez; B. Serrato; J. Calderón-Mugica; R. Salgado Garciglia. 2006. "Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*)". Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54 (10): 3521-3527.
- Chiereghin P. 2000. "Farmacia Verde Manual Práctico de Herboristería" 1ª edición. Mundi Prensa. Madrid, España.
- CONABIO 2005. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad). http://www.conabio.gob.mx/institucion/conabio_espanol/doctos/huerta.html.
- Conley R. T 1979. "Espectroscopia infrarroja". Alambra. España.
- Cowan MM. 1999 "Plant products as antimicrobial agents". Clinical Microbiology Reviews. 12:564-82..
- Cuttler P, Schmutteres H. 1999. "Natural pesticides from the Neem seed and other plants". Journal of Ethnopharmacology. 333: 11-19.
- Daniel M. 2006. "Medicinal Plants Chemistry and Properties". Science Publisher. USA.
- De la Isla, L. 1994. "Fitopatología". Colegio de Posgraduados. UTEHA Noriega Editores. Edo. de México., México.
- De la Fuente J., Narro J., Tapia R., Tamayo J., e Higuera F. 1998. "Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos". Secretaria de Salud. México.
- De la Peña. 2006. "La importancia de la etnobotánica". Boletín informativo de la Coordinación de la Investigación Científica. Ciudad Universitaria. Año VI. Número 62. México.
- Delgadillo, S.F; E. Z. Mejía; S. O. Kawasoe; A.A. Velenzuela, V. G. Hernández; D. N. Angel e I. T. Pacheco. 2002. "Densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su control mediante tebuconazole en ajo (*Allium sativum*). Revista Fitotecnia Mexicana. 25(4): 349-354.
- Dickinson, C. H.; J. A. Lucas. 1987. "Patología vegetal y patógenos de plantas". Limusa. México.
- Domínguez A. 1979. "Métodos de investigación Fitoquímica" .1ª edición. Limusa: México.
- Dubey N, Kishore N. 1987. "Fungitoxicity of some higher plants and synergistic activity of their essential oils". Tropical Science. 27: 23-27.
- Duerden B. 1993. "Microbiología de enfermedades Infecciosas".1ª edición. Limusa. México.

- Elizabeth M., Williamson E., Okpako D., y Evans F. 1998. "Selection, preparation and pharmacological evaluation of Plant Material". John Wiley & Sons. Lodón England.
- Espinosa, L. 2005. "Evaluación In Vitro del Efecto de Extractos Vegetales sobre *Trichoderma lignorum*". Resumen. Pp 31 en Pineda, B. Ed. XXVI Congreso asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines (ASCOLFI). Bogota, D. C.
- Estrada L. 1989. "El código florentino". México: Colegio de postgraduados Montecillo. México.
- Evans, W.C.1991. "Farmacognosia". Interamericana McGraw-Hill.
- Gallegos M G, Cepeda S M y Olayo, P R P. 2003. "Entomopatógenos". Trillas, México.
- Gams, W. 1987. "CBS course de Mycology". CBS Barn.
- García, R. 2000. "Especies y Sub-especies de *Erwinia*, causantes de pudrición blanda y pierna negra en la papa cultivada, en el estado de Mérida-Venezuela". Revista Forestal Venezolana. 44: 107-114.
- Gisbert M. 1995. "La salud por las Plantas Medicinales y la Medicina Natural". 1ª edición. Sabate. Barcelona, España.
- Gobierno del Estado de México. 2004. "Mapa Estado de México". (en línea) www.mappinginteractivo.com/.../art.9/imag6.jpg. (Consulta 10 de Septiembre de 2008)
- González De Buitrago. 1997."Tecnología y Métodos de Laboratorio Clínico". Salvat. Barcelona, España.
- González F., y Cameros F., 1996. "Microbiología bucal y clínica". Fernández. México.
- Granados P. R y Villaverde P. 1998. "Microbiología Bacteriología, Medios de cultivo y pruebas bioquímicas, Micología general, Parasitología general". Paraninfo. México.
- Granados, M, y A. Wang. 2005. "Aislamiento e identificación de hongos asociados a esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, causante de la pudrición blanda de la cebolla, en la zona alta de Cartago, Costa Rica". Agronomía Costarricense 29 (1): 57-66
- Harold. F. W y Jorge R. 2001. "Análisis Químico e instrumental moderno". Reverte. México.
- Hartmann T. 2007. "From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism". Phytochemistry 68; 2831-2846.
- Harvey, A. 2000. "Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products". Drug Discovery Today. 5 (7): 294-300.
- Hernández, L. A., S. Bautista, G. Velázquez del Valle. 2007. "Prospectiva de Extractos Vegetales para Contralar Enfermedades Postcosecha Hortofrutícolas". Revista Fitotecnia Mexicana. 30 (2): 119-123.
- Hernandez. L. y Rodriguez. M. 2001. "Actividad antimicrobiana de Plantas que crecen en Cuba". Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2: 44-7.
- Hewady, M.A.A., El Sherif, L.S., Omar, A.M. 1994. "Evaluation of four plant oils against new hatched larvae of the cotton bollworm ms; *Pectinophora gossypiella* (Saund) and *Earias insulana* (Bolsd) (*Lepidoptera Noctuidae*)". Annals of Agriculture Science 32(4).
- Hostettman K., Marston A.,y Maillard M. 1995. "Photochemistry of Plants used in Traditional Medicine". Oxford University. USA.
- INEGI. Carta Edafológica Amecameca de Juárez E14B41, 2001

- INEGI. Carta topográfica Amecameca de Juárez E14B41, 2001
- INEGI. Carta de uso del suelo y vegetación. Amecameca de Juárez E14B41, 2001
- INEGI. Carta urbana. Amecameca de Juárez E14B41, 2001.
- Ingraham J. 1998. "Introducción a la Microbiología". Reverte. Barcelona, España.
- Ismail M.H. 1994. "Essential oils as inhibitors of potato virus "Y". Journal on Botany. 32 (2): 167-176.
- Jackson M. L y Beltrán J. 1964. "Análisis químico de suelos". Omega, Barcelona España.
- Jean B. 1991. "Elementos de Fotoquímica y de Farmacognosia". 1ª edición. Lavoiser. Zaragoza, España.
- Jiménez, C. 1999. "Los medios de cultivo en laboratorio". Revista Biomédica. 10: 103-106.
- Jorge A. 2004. "Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos". Corpus. Buenos Aires, Argentina.
- Kimati, H.; Bergamin Filho, A.; Amorim, L. 1995. "Manual de Fitopatología. Principios e conceitos". Sao Paulo. Ceres. 1 (3):919.
- Koneman, L.W. 1999. "Diagnóstico microbiológico" Texto Atlas Color. Médica Panamericana. México.
- Kuklinski, C. 2003. "Farmacognosia". Omega. Barcelona, España.
- Kunstmann, J. P; L. Ciampi; L. Böhm; S. Barrera y L. Collado. 2006 "Determinación de especies de *Erwinia* (grupo carotovora) como agentes causales de Pudrición blanda en cala (*Zantedeschia* spp.)". Agricultura Técnica. 66 (3): 247-255.
- Lee, R. 2002. "Interactive Design of Farm Conversion. Linking Agricultural Research and Farmer Learning for Sustainable Small Scale Horticulture Production in Colombia". Ph. D. Thesis. Wageningen University. Wageningen, The Netherlands. 293pp.
- Lemus T. 1998. "Conserve la salud con ayuda de la Herbolaria". Aguilar. México.
- Lennette E. 1991. "Manual de Microbiología Clínica". Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Levinson W., y Ernest J. 1992. "Microbiología e Inmunología Medica". Manual Moderno. México.
- Linares E. 1999. "Selección de Plantas Medicinales de México". Limusa Noriega, Editores México S.A. México.
- Lira-Saldivar, R H. 2003. "Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (D. C.), Coville". Revista Mexicana de Fitopatología. 21(2): 214-221.
- Lock, O. 1994. "Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales". PUCP. Lima, Perú.
- Lozoya 1999." La herbolaria en México". Consejo Nacional para la cultura y las artes. Dirección General de Publicaciones; México.
- Luna A. 2000. "Enciclopedia Medica Naturista" 1ª edición. Mexicanos Unidos. México.
- Luna, M. F.; A. F. Martinez; P.P. Noyola. 2003. "Caracterización molecular de los aislados de *Sclerotium cepivorum* mediante análisis del polimorfismo de los fragmentos amplificados al azar". Elementos 49: 53-59.

- Luna, J. y Rendón. 2007. "Usos no maderables de los Encinos (*Quercus*) en México". XV Congreso Mexicano de Botánica y Etnobotánica. Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Iztacala. México.
- Macias, T. 2004. "La herbolaria medicinal del parque Nacional Izta-Popo como antimicrobianos de patógenos de la cavidad oral. Tesis de Licenciatura; FES.Zaragoza. UNAM. México.
- Maldonado, A. B.; A. Ortiz; O. Dorado. 2004. "Preparados Galénicos e Imágenes de Plantas Medicinales". Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de educación Ambiental e Investigación Sierra de Huautla, Morelos. CONABIO. México.
- Martín J. 1995. "Ethnobotany". 1ª edición. Chapman & Hall. New York. USA.
- Meier, G. 2005. "Sales de Sodio como Alternativas a los Fungicidas Tradicionales para el Control de Moho Verde y Moho Azul". Actas de II Seminario Internacional de Post-Cosecha de Cítricos. ISBN: 13: 978-987.
- Miranda, R. 2000. "Técnicas Básicas para la Experimentación en Química Orgánica". UNAM. México.
- Mendoza, C. B.; M.N. Moreno; M. Weil; F. Elango. 2007. "Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in Vitro* de *Phytophthora palmivora* Butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc". Revista Tierra Tropical. 3:81-89.
- Moreno, B. y R. Acevedo. 2002. "Caracterización patogénica y estudios de los grupos de compatibilidad micelial en *Sclerotium cepivorum* Berk". Revista Iberoamericana de Micología. 19: 115-119.
- Müller-Riebau F, Berger B, Yegen O. 1995. "Chemical composition and fungitoxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey". Journal of Agriculture and Food Chemistry. 43: 2262-2266.
- Murray R. P, Kobayashi S. G, Pfaller A. M; Rosenthal S. Ken. 1997. "Microbiología médica". HARCOURT BRACE. España.
- Niembro A. 1990. "Árboles y Arbustos útiles de México". Limusa. México.
- Northover J. y Schneider KE. 1993. "Activity of plant oils on diseases caused by *Podosphaera leucotricha*, *Venturia inaequalis* and *Albugo occidentalis*" Plant Disease Journal .77: 152-157.
- Obst, J. R. 1998. "Special (Secondary) Metabolites from Wood". In: "Forest Products Biotechnology". Bruce A. and Palfreyman J. W. (Eds.). Taylor & Francis Ltd. U. K.151-165.
- Ortega J. y Príncipe J. 2005. "Expertos en Fitoterapia: Indicaciones contraindicaciones, precauciones, interacciones ". Formación Alcalá. México.
- Ortiz. 2001. "Las plantas medicinales en el marco de una agricultura sostenible", Universidad "Carlos Rafael Rodríguez" de Cienfuegos, CUBA. <http://www.herbotecnia.com.ar/c-public-001.html> Fecha de consulta: 17 de octubre de 2009.
- Pahlow M. 1985. "El gran libro de las Plantas Medicinales". Everest. Madrid, España.
- Pandey VN, Dubey NK. 1994. "Antifungal potential of leaves and essential oils from higher plants against soil phytopathogens". Soil Biology & Biochemistry 26: 1417-1421.
- Pedrozo J., y Torrenegra R. 2001. "Exploremos la Química". Prentice-Hall. Bogota, Colombia.

- Pretorius J C, Magama S y Zietsman, P C. 2003. "Growth inhibition of plant pathogenic bacteria and fungi by extracts from selected South African plant species". South Africa Journal of botany. 69(2):186-192.
- Purdy, L. H. 1979. "*Sclerotinia sclerotium*, la historia, las enfermedades y sintomatología, gama de huéspedes, distribución geográfica, y el impacto". Phytopathology 69: 875-880.
- Quer F. 1961. "Plantas Medicinales" El Discorides Renovado. Labor. Barcelona España.
- Ramírez, L. 2001. "Efectos agudos crónicos de los plaguicidas en la salud humana". En *Memorias del Simposio "Impacto de los Agroquímicos en el Occidente del País"*. Barquisimeto. Lara. Venezuela.
- Ramírez-Gama; Luna M.B; Mejía Ch. A; Velázquez M.O; Tsuzuki R.G; Vierna G. L; Hernández G. L. 2003."Manual de Practicas de Microbiología General". Laboratorio de microbiología experimental, Facultad de Química UNAM, México D.F.
- Rao G, Singh M, Singh H 1992. "Fungitoxic evaluation of essential oils extracted from higher plants against some sugarcane pathogens *in vitro*"- *Tropical Science*. 32: 377-382.
- Ratera E., y Ratera M. 1980. "Plantas de la flora Argentina empleadas en Medicina Popular". 1ª edición. Hemisferio sur. Buenos Aires, Argentina.
- Reyes- Chilpa, R.; N. Viveros R.; F Gomez y D. Alavezsolano 1995. "Antitermitic Activity of *Lonchocarpus castilloi* Flavonoids and Heartwood Extracts". *Journal of Chemical Ecology* 21(4):455-463.
- Reyes I. 1996. "Fundamentos Teóricos Prácticos de Temas Selectos de la Ciencia del Suelo" UAM. México.
- Rodríguez D, Montilla J. 2002. "Disminución de la marchites causada por *Fusarium* en tomate con extracto de *Citrus paradisi*". *Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica*. 63: 46-50.
- Robert G., y Frederick R. 1980. "Introducción a la Ciencia del Suelo". Editor. Colegio de Postgraduados. Chapingo. México.
- Roberts, A., C. Boothroyd. 1978. "Fundamentos de patología Vegetal. Acribia. Zaragoza, España.
- Romero CD, Chopin SF, Buck G, Martínez E, García M, Bixby L. 2005. "Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest". *Journal Ethnopharmacol*. 2005; 99:253-7.
- Ronald M. y Richard B. 2002. "Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental". Addison Wesley. España.
- Rubio J. y Segade J. 1985. "Espectroscopia". Alambra. Madrid, España.
- Rzedowski. J.1994. "Vegetación de México". Limusa. México.
- Rzedowski, J. y G. Calderón R. 2001. "Flora fanerogámica del Valle de México" Vol. 2; *CECSA*, México.
- Sabatés R. 1995. "La Salud por las Plantas Medicinales y la Medicina Natural"; Editorial Centro E.N CEDEL; S.A. Barcelona. España.
- Sacsquispe C., y Velásquez P. 2002. "Manual de procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco de Difusión". Sector Salud. Perú.
- Sagrera. 1989. "Plantas medicinales; tratamientos de las enfermedades para medio de plantas". *Enciclopedia de Medicina Natural*. Valle de México. México.

- Schauberg P. y Paris F. 1980. "Guía de la Plantas medicinales". Omega. Barcelona, España.
- Samano L. 1998. "Plantas y Yervas Curativas de México". Gómez Hnos. México.
- Smith, I. M. 1992. "Manual de las enfermedades de las plantas". Mundi-Prensa Libros.
- Skoog, D.A y Leary, J.J. 1994. "Análisis Instrumental". Mc Graw-Hill. Madrid. España.
- Stuart W. 2000. "Microbiología". 1ª edición. McGraw-Hill Interamericana. Mexico.
- Tagliaferro A .2002. "Niveles de organoclorados en leche materna en población de caseríos expuesto y parcialmente expuestos a plaguicidas del Valle de Quibor, estado Lara". Tesis. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado. Venezuela.
- Taiz, L. Eduardo Z. 2006. "Plant Physiology". Sinauer Associates, Inc.
- Talbot, Ph.B. 1971. "Principles of fungal taxonomy". MacNiffan Press London. Cap 11, pp150-192.
- Tanaka Y T y Andomuro, S. 1993. "Agroactive compound of Microbial Origin". Annual. Reviews Microbial. 47: 57-87.
- Tayler, V. E. 1979. "Farmacognosia". 2da ed. El Ateneo Editorial. Buenos Aires Argentina.
- Tewari, N. 1995. "*Ocimum sanctus* the botanical fungicide for rice blast control" Tropical Science. 35: 263-273.
- Ticli B. 2005. "El herbolario de la salud". De Venci. Barcelona, España.
- Tola, José. 2001. "Los principales árboles y arbustos medicinales de Europa y América". Robin Book. España.
- Trapero Casas, A. 1996. "Los Hongos como agentes fitopatógenos. En Patología Vegetal. Sociedad Española de Fitopatología. Phytology. España, Valencia.
- Trease G., y Evans W. 1987. "Tratado de Farmacognosia" 1ª edición. Interamericana: México.
- Tu, J. C. 1997. "An integrated control of White mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of beans , with emphasis on recent advances in biological control". Botanical Bolletin of Academia Sinica. 38: 73-76.
- Umland J. 2000. "Química general". Thomson Learning. México.
- UNAM. 2009. "Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana" <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>.
- Usall, J., Plaza, P., Paul, L., Torres, R., Teixidó, N., Abadías, M., Smilanick, J. y Viñas, I. 2005. "Control de las principales enfermedades de postcosecha de cítricos mediante métodos físicos, químicos y biológicos". Actas del II Seminario Internacional de post-Cosecha de Cítricos. ISBN. 13: 978-987.
- Valencia S. 1995. "Contribución al Conocimiento del Genero *Quercus* (Fagáceas) en el Estado de Guerrero, México". 1ª edición. UNAM. México DF.
- Vasinausliene, M., Radusiene, J., Zitikaite, I. y Surviliene, E. 2006. "Antibacterial activities of Essentials oils from aromatic and medicinal plants againts growth of phytopathogenic bacteriana". Agronomy Research 4: 437-440.

- Vázquez V. 1992. "El Genero *Quercus* (Fagáceas) en el Estado de Puebla México". Tesis UNAM. México.
- Villar A. 1999. "Farmacognosia General". Síntesis. Madrid, España.
- Mapas de México www.mapasmexico.net
- Youngken W. 1951. "Tratado de Farmacognosia". Atlante. México.
- Zavala F. 1990. "Los encinos Mexicano: Un recurso desaprovechado". Revista Ciencia y Desarrollo. Vol., XVI. N° 95. Universidad Autónoma Chapingo. México D.F. 43-51.
- Zaccheo, A. 1990. "Growth of *Penicillium* on extracts of susceptible Rosaceae". Acta Horticulturae 273: 339-341.
- Zavala F. 2003. "Identificación de los encinos de México". UACH. México.
- Zinsser 1998. "Microbiología". Panamericana. Buenos Aires, Argentina.