

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans*,
Magnolia grandiflora Y SU APLICACIÓN EN FORMULACIONES A BASE DE
BIOPOLÍMEROS**

POR

MSP. ADBEL ZAID MARTÍNEZ BÁEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA
DE PRODUCTOS NATURALES**

MARZO, 2018

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans*,
Magnolia grandiflora Y SU APLICACIÓN EN FORMULACIONES A BASE DE
BIOPOLÍMEROS**

Comité de Tesis:

Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza
Presidente

Dra. Azucena Oranday Cardenas
Secretario

Dra. Julia Verde Star
Vocal

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Vocal

Dra. Ma. de Jesús Ibarra Salas
Vocal

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans*,
Magnolia grandiflora Y SU APLICACIÓN EN FORMULACIONES A BASE DE
BIOPOLÍMEROS**

Dirección de Tesis

Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza
Director

Dra. Gloria María González-González
Director externo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente:

Al **Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza**, por su tiempo y espacio, su guía y dirección en este proyecto de vida y académico.

A la **Dra. Gloria María González González** por el conocimiento y dedicación aportada para el término de este proyecto.

A la **Dra. Azucena Oranday Cárdenas**, por su tiempo, su guía y dirección en este proyecto de vida y académico.

A la **Dra. Julia Verde Star** por su tiempo, su motivación y dirección en este proyecto de vida y académico.

A la **Dra. Katiushka Arévalo Niño**, por su tiempo, motivación, dinamismo y dirección oportuna y clara en este proyecto de vida y académico.

A la **Dra. Ma. de Jesús Ibarra Salas**, por su tiempo, su guía y dirección.

A la **Dra. Blanca Edelia González Martínez**, por su tiempo, por sus consejos y el apoyo personal y profesional, pero sobre todo por su sincera amistad.

A la **MSP Hilda Irene Novelo Huerta**, por el apoyo profesional y personal a lo largo de la realización de este proyecto.

A la **MT. Sylvia Osorio De Dios**, por su tiempo, su motivación y dirección en este proyecto de vida y académico.

A la **M.Sc. Alexandra Tijerina Sáenz**, por su tiempo, por sus consejos y el apoyo personal y profesional, pero sobre todo por su sincera amistad.

Al **Dr. Gustavo Israel Martínez González** por su tiempo, su motivación y dirección en este proyecto de vida y académico.

A la **Dra. María Eufemia Morales Rubio y Dra. Ruth Amelia Garza Padron**, por su tiempo, su motivación y dirección en este proyecto de vida y académico.

A todos mis compañeros maestros y amigos de la **Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL**.

A todos mis compañeros maestros y amigos de la **Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL**.

A todos mis compañeros maestros y amigos de la **Facultad de Medicina de la UANL**.

A todos mis **maestros** a lo largo de mi vida.

A todos mis hermanos del **Movimiento de Cursillos de Cristiandad**, lista interminable.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Mi sincero agradecimiento a **CONACYT** por el apoyo con la beca otorgada con el numero de becario N° **514679**.

A las instituciones, departamentos que me facilitaron de su apoyo para la realización teórica y práctica del presente proyecto.

Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL

Laboratorio de Micro propagación y Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética.

Laboratorio de Química Analítica del Departamento de Química.

Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL.

Laboratorio de Alimentos del Centro de Investigación en Nutrición y Salud Publica.

Laboratorio de Análisis Químico de los alimentos

Facultad de Medicina de la UANL

Laboratorio de Micologia del Centro Regional y Control de Enfermedades Infecciosas.

DEDICATORIA

Dedico mi tiempo, trabajo, mortificación y sacrificio invertido en este proyecto a **Dios**, como agradecimiento por permitirme conocerlo cada día mas en cada uno de todos mis hermanos que se involucraron para el logro de esta meta.

A mi madre **Raquel Baez Garcia**, que gracias a la inversion de su vida en la búsqueda de mi felicidad, logró hacer el hombre que ahora soy. Gracias por todo basado en el amor, te amo.

A mi padre **Silvestre Martinez Leal (†)**, ya que gozas de la presencia del Padre, comparto contigo cada uno de mis logros, gracias por enseñarme a ser tu mismo. Te amo.

A mis hermanos **Edgar Maciel, Ramon y Luis Eduardo Martínez Báez** su presencia, su esencia y su apoyo han sido para mi un gran motor de vida. Los amo.

A mi compañera de vida **Irasema Gpe Medina Lozano**, gracias por ser complice perfecta de nuestros proyectos, por ser el apoyo oportuno e incondicional, por llenar mi corazón con tu personalidad y tu amor. Juntos hasta el “tope”, te amo.

A mi “Pocha” **Karol Fernanda Martínez Medina**, a mi “güero” **Raul Adhir Martínez Medina** y a mi “chiquita” **Itzel Regina Martínez Medina**, hijos, esto y toda mi vida es por ustedes, por su felicidad y realización como seres humanos. Los amo.

INDICE

1	RESUMEN	21
1.1	ABSTRACT	22
2	INTRODUCCIÓN	23
3	ANTECEDENTES	25
3.1	Generalidades	25
3.2	Descripción de las especies a estudiar	27
3.2.1	Descripción de la especie <i>Azadirachta indica</i>	27
3.2.2	Descripción de la especie <i>Juglans regia</i>	29
3.2.3	Descripción de la especie <i>Tecoma stans</i>	31
3.2.4	Descripción de la especie <i>Magnolia grandiflora</i>	33
3.3	Actividad Biológica.....	35
3.4	Actividad antifúngica	36
3.5	Actividad antibacteriana.....	39
3.6	Actividad antioxidante	42
3.7	Toxicidad.....	45
3.8	Biopolímeros	46
3.8.1	Quitosan	47
3.8.2	Pululano	48
3.9	Análisis estadístico	49
3.9.1	Análisis Probit.....	49
3.9.2	Análisis univariante.....	50
3.9.3	Tukey	50
4	JUSTIFICACIÓN	51
5	HIPÓTESIS	52
6	OBJETIVOS	53
6.1	Objetivo general	53
6.2	Objetivos particulares	53
7	MATERIAL Y METODOS	54
7.1	Equipo de laboratorio y Reactivos	54
7.1.1	Equipo de Laboratorio	54

7.1.2	Reactivos.....	54
7.1.3	Material Biológico	55
7.2	Recolección de las plantas e identificación del material vegetal.	56
7.3	Secado y molienda del material vegetal.	56
7.4	Extracción del material Vegetal.	57
7.5	Métodos químicos de identificación, pruebas para grupos funcionales.	57
7.5.1	Insaturaciones.....	58
7.5.2	Grupo Carbonilo	58
7.5.3	Oxidrilos fenólicos.....	58
7.5.4	Esteroidesy triterpenos.....	58
7.5.5	Carbohidratos.....	58
7.5.6	Sesquiterpenlactonas.....	59
7.5.7	Flavonoides.....	59
7.5.8	Alcaloides	59
7.5.9	Saponinas	60
7.5.10	Aromaticidad.....	60
7.6	Determinación de la actividad antifúngica.....	60
7.6.1	Cepas.....	60
7.6.2	Estandarización de inóculos.....	61
7.6.3	Preparación de los extractos.....	62
7.6.4	Estandarización de control positivo	62
7.6.5	Método difusión en placa.....	62
7.7	Determinación de la actividad antibacteriana.....	63
7.7.1	Cepas.....	63
7.7.2	Método difusión en placa.....	65
7.8	Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	66
7.8.1	Incubación de <i>A. salina</i>	66
7.8.2	Preparación de las concentraciones.....	66
7.8.3	Determinación de la dosis letal media	66
7.9	Determinación de la actividad anti radical de los extractos.	67
7.9.1	Preparación del estándar y extractos metanólicos.....	67
7.9.2	Reacción de neutralización del radical DPPH cuantificación de la actividad antioxidante.....	68

7.10	Actividad antifúngica de formulado de biopolímeros con extractos activos	69
7.10.1	Preparado del formulado de biopolímeros y extractos activos	69
7.10.2	Determinación de la actividad antifúngica de los formulados – extracto	70
7.10.3	Determinación de la actividad antifúngica de los formulados – extractos a diferentes condiciones de almacenaje	71
	Tabla I. Planeación de ensayos de determinación de la actividad antifúngica de los formulados –extracto activo a diferentes condiciones de conservación	71
7.11	Análisis estadístico	72
7.11.1	Análisis Probit.....	72
8	RESULTADOS.....	73
8.1	Recolección de plantas e identificación del material vegetal.	73
8.2	Obtención y Rendimiento de los extractos a partir de material vegetal	73
8.3	Determinación de grupos funcionales y metabolitos secundarios.....	74
8.4	Actividad antifúngica	75
8.4.1	Actividad antifúngica de los extractos de las plantas en estudio	75
8.4.2	Actividad antifúngica de formulado de biopolímeros con extractos activos	77
8.4.3	Actividad antifúngica de formulado de biopolímeros con extractos activos a diferentes condiciones de almacenamiento	81
8.4.4	Análisis de varianza univariante relación cepa, temperatura y luz.	82
8.4.5	Análisis de varianza univariante relación tiempo de conservación y temperatura y luz.	87
8.5	Actividad antibacteriana de los extractos	91
8.6	Actividad antirradical de los extractos	92
8.7	Bioensayo de toxicidad de los extractos sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	92
9	DISCUSION.	94
10	CONCLUSIONES.....	101
11	PERSPECTIVAS	104
12	REFERENCIAS	105
13	RESUMEN BIOGRAFICO	120

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Planeación de ensayos de determinación de la actividad antifúngica de los formulados-extracto activo a diferentes condiciones de conservación	72
II.	Porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos	74
III.	Identificación de grupos funcionales y metabolitos secundarios en los extractos metanólicos	75
IV.	Actividad antifúngica del extracto metanólico (flor, fruto, hoja y tallo) de <i>Azadirachta indica</i> , <i>Juglans regia</i> , <i>Tecoma stans</i> y <i>Magnolia grandiflora</i> en medio PDA	76
V.	Actividad antifúngica del extracto metanólico (flor, fruto, hoja y tallo) de <i>Magnolia grandiflora</i> en medio PDA	77
VI.	Actividad antifúngica del extracto metanólico (hoja y tallo) de <i>Magnolia grandiflora</i> en medio PDA	77
VII.	Tabla VII. Actividad antifúngica del extracto metanólico (flor y fruto) de <i>Magnolia grandiflora</i> en medio PDA	77
VIII.	Actividad antifúngica del extracto metanólico de las partes de <i>Magnolia grandiflora</i> en medio PDA	78
IX.	Comparativo de actividad antifúngica de metanol destilado contra formulado de biopolímeros	79
X.	Comparativo de actividad antifúngica de terbinafina (1 µg/mL) con formulado de biopolímeros impregnado con terbinafina (1 µg/mL)	80
XI.	Actividad antifúngica del extracto metanólico de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado en formulado de biopolímeros en medio PDA	81
XII.	Comparativo de actividad antifúngica del extracto metanólico de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> con el impregnado en el formulado de biopolímeros en medio PDA	82

XIII.	Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los cero (0) días	83
XIV.	Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los siete (7) días	84
XV.	Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los siete (14) días	85
XVI.	Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los siete (21) días	85
XVII.	Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los siete (28) días	86
XVIII.	Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre <i>M. canis</i>	89
XIX.	Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre <i>T. mentagrophytes</i>	89
XX.	Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre <i>T. tonsurans</i>	90
XXI.	Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre <i>T. rubrum</i>	91
XXII.	Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre <i>E. floccosum</i>	91

XXIII. Actividad antibacteriana de los extractos en estudio	92
XXIV. Actividad de los extractos metanólico sobre la letalidad de <i>Artemia salina</i>	94

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Planta de <i>Azadirachta indica</i>	29
2. Planta de <i>Juglans regia</i>	31
3. Planta de <i>Tecoma stans</i> .	33
4. Planta de <i>Magnolia grandiflora</i>	35
5. Estructura química de quitosan y quitina	48
6. Estructura del pululano	50
7. Diagrama de flujo del secado y molienda del material vegetal	57
8. Pesado, maceración, filtrado y concentrado de material vegetal.	58
9. Técnica de cintilla	62
10. Diagrama de flujo para la determinación de la actividad antifúngica	64
11. Diagrama de flujo de cinética de crecimiento bacteriana	65
12. Diagrama de flujo para la determinación de la actividad antibacteriana	66
13. Diagrama de flujo para el bioensayo de toxicidad sobre nauplios de <i>A. salina</i>	68
14. Diagrama de flujo para la determinación de actividad anti radical	69
15. Preparado del formulado de biopolímeros y extractos activos	70
16. Diagrama de flujo de la determinación de la actividad antifúngica de los formulados de biopolímeros impregnados con extracto	71
17. Obtención de extractos metanólicos	74

18. Actividad antifúngica de los extractos metanólico de flor y fruto a 50 mg/mL, 25 mg/mL, 12.5 mg/mL, 6.25 mg/mL , 3.125 mg/mL de *M. grandiflora* sobre *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* 78
19. Actividad antifúngica en milímetros del formulado de biopolímeros (quitosan y pululano) 5µl, 10µl, 15µl, 20µl, sobre *T. rubrum* y *T. tonsurans* y actividad antifúngica en milímetros de metanol 20µl. 79
20. Actividad antifúngica en milímetros de terbinafina 20µl y sobre *E. floccosum* y *T. mentagrophytes* y Actividad antifúngica en milímetros de formulado de biopolímeros-terbinafina 20µl y sobre *E. floccosum* y *T. mentagrophytes*. 80
21. Actividad antifúngica de 20 µL del extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* impregnado en formulado de biopolímeros en medio PDA sobre *T. tonsurans*, *T. rubrum* y *M. canis*. 81
22. Actividad antifúngica del extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora*, control positivo terbinafina, formulado de biopolímeros impregnado de terbinafina, formulado de biopolímeros impregnado de extracto activo y formulado de biopolímeros en medio PDA sobre *T. rubrum*. 82
23. Actividad antifúngica del formulado de biopolímeros impregnado de extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora*, formulado de biopolímeros, formulado de biopolímeros impregnado de terbinafina, en medio PDA sobre *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsuran* conservado en oscuridad a temperatura de 4°C (OF) durante 28 días. 86
24. Actividad antifúngica del formulado de biopolímeros impregnado de extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora*, formulado de biopolímeros, formulado de biopolímeros impregnado de terbinafina, en medio PDA sobre *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans* conservado en oscuridad a temperatura de 25°C (OA) durante 28 días. 87

25. Actividad antifúngica del formulado de biopolímeros impregnado de extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* (a), formulado de biopolímeros, formulado de biopolímeros impregnado de terbinafina, en medio PDA sobre *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans* conservado en luz a temperatura de 4°C (LF) durante 28 días. 87
26. Actividad antifúngica del formulado de biopolímeros impregnado de extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora*, formulado de biopolímeros, formulado de biopolímeros impregnado de terbinafina, en medio PDA sobre *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans* conservado en luz a temperatura de 25°C (LA) durante 28 días. 88
27. Actividad antioxidante de plantas en estudio 93

LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
%	Porcentaje
(-)	negativo
(+)	positivo
<	Menor que
>	Mayor que
°C	Grados Celsius
Abs	Absorbancia
AI	<i>Azadirachta indica</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BDMTM	Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana
Ca²⁺	Calcio
CCl₄	Tetracloruro de carbono
CI₅₀	Concentración inhibitoria media
cm	Centímetro
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
d	Días
DL₅₀	Dosis letal media
DPPH	1,1-Difenil-2-picrilhidrazil
ERO	Especies reactivas del Oxigeno
<i>et al</i>	Y colaboradores
FB	Formulado de biopolímeros
FBE	Formulado de biopolímeros con extracto

FBT	Formulado de biopolímero con terbinafina
FeCl₃	Cloruro de Hierro (III)
FF	Flor y fruto
Fig.	Figura
h	Hora
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorhídrico
HT	Hoja y tallo
HTFF	Hoja, tallo flor y fruto
ICC	Infusión cerebro corazón
JR	<i>Juglans regia</i>
K₂HPO₄	Fosfato di básico de potasio
KH₂HPO₄	Fosfato monobásico de potasio
KI	Yoduro de potasio
KMnO₄	Permanganato de potasio
KNO₃	Nitrato de potasio
m	Metro
mg	Miligramo
Mg	Magnesio
mg/L	Miligramos por litro
mg/mL	Miligramos por mililitro
MGFF	<i>Magnolia grandiflora</i> flor y fruto
MGHT	<i>Magnolia grandiflora</i> hoja y tallo
MIC	Concentración mínima inhibitoria
min	minutos

mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
mol	moles
N°	Numero
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
nm	Nanómetro
-OH	oxidrilo
OMS	Organización Mundial de Salud
OPS	Organización Panamericana de Salud
PDA	Agar papa dextrosa
ppm	Partes por millón
PUMNM	Programa Universitario México, Nación Multicultural- UNAM
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundos
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca, y Alimentación.
SSA	Secretaria de Salud de México
TS	<i>Tecoma stans</i>
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	ultravioleta
µg	Micro gramo

$\mu\text{g/L}$	Micro gramo por litro
$\mu\text{g/mL}$	Micro gramo por mililitro
μL	Micro litro

1 RESUMEN

La medicina tradicional ha motivado y contribuido al desarrollo de investigaciones relacionadas con el tratamiento de una inmensa gama de enfermedades y considerando que México es el segundo país con más ecosistemas, la diversidad botánica existente en la región demanda la necesidad de aprovechar los recursos naturales, como sustento para el desarrollo de innovaciones médicas a largo plazo en el ámbito de fitoterapia como alternativa natural para dar tratamiento a enfermedades. Los biopolímeros son una herramienta biotecnológica, que presentan características como ser atóxicos, biocompatibles, biodegradables y contienen propiedades de adhesión a las mucosas de tal modo que pueden ser utilizados como vehículos de liberación de principios activos de diversos compuestos como los extractos metanólicos de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*. La incidencia de enfermedades infecciosas a nivel nacional, promueve la búsqueda de diversos tratamientos basados en la actividad biológica de extractos obtenidos de la flora autóctona mexicana, así como la búsqueda de diversas formas de suministrar estos extractos a través de sistemas de liberación elaborados a base de polímeros biodegradables, que conserven dicha actividad como lo son el quitosán y el pululano. Los resultados del presente trabajo demuestran que el extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* presenta actividad antifúngica relevante sobre cepas de dermatofitos de mayor importancia en México y al impregnarlo con un formulado de polímero (quitosán – pululano) su actividad incrementó, conservándose esta actividad hasta por 28 días, almacenándolo bajo condiciones de obscuridad y refrigeración.

1.1 ABSTRACT

Traditional medicine has motivated and contributed to ongoing research related to the treatment of several diseases. Considering Mexico as the country in the second place worldwide of greatest ecosystem and larger number of species, the existing botanical diversity in the region demands the need to use the natural resources as livelihood for the development of medical innovations in the phytotherapeutic field as a natural alternative to treat illnesses. The biopolymers are a biotechnological resource, presenting the characteristics of being atoxic, biocompatible, biodegradable, and contain properties of adhesion to the mucus, therefore they can be utilized as vehicles to liberate active substances of certain compounds such as the methanolic extracts of *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*. The incidence of infectious diseases in a nationwide level promotes the investigation of the biological activity of extracts of different plants such as the above mentioned, the preservation and/or increment of this activity when combined, and the development of formulations based on biopolymers such as chitosan and pullulan. The results of the present study show that the methanolic extract of flower and fruit of *Magnolia grandiflora* presents greater antifungal activity on strains of dermatophytes of greater importance in Mexico and when impregnated with a polymer formula (chitosan - pullulano) its activity increases, preserving this activity up to 28 days, storing it in dark and refrigerated conditions.

2 INTRODUCCIÓN

A través del tiempo las terapias con plantas endémicas de las regiones en cuestión pasaron a conformar la llamada medicina tradicional y al ser preservadas por los pueblos originarios fue llamada medicina aborígen o autóctona, existiendo estos términos hasta nuestros días (Avello y Cisternas 2010). La medicina tradicional ha motivado y contribuido al desarrollo de investigaciones relacionadas con el tratamiento de una inmensa gama de enfermedades, ya que el querer articularla con la medicina alopática en el ámbito de la salud pública es un área vulnerable por que se asocia con enfrentamientos dogmáticos, intereses largamente establecidos y territorios disputados; la migración hace que las costumbres, ideas, tradiciones y visiones atraviesen fronteras (Mabit J 2004, PUMNM, 2008). A consecuencia de que México es el segundo país con más ecosistemas, la diversidad botánica existente en la región demanda la necesidad de aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de los componentes químicos, que serán sustento para el desarrollo de innovaciones médicas a largo plazo en el ámbito de fitoterapia como alternativa natural para dar tratamiento a enfermedades (CONABIO 2008; UNAM 2005). Sin embargo, es de suma importancia aprovechar la evidencia científica actual para promover la búsqueda de diversos tratamientos basados en la actividad biológica de extractos obtenidos de la flora mexicana, así como la búsqueda de diversas formas de suministrar estos extractos a través de sistemas de liberación elaborados a base de polímeros biodegradables

En nuestro país, en el siglo XX dentro de las principales causas de muerte se encontraba las infecciones comunes, existiendo en la actualidad una transición en donde las principales causas de muerte y discapacidad, son los daños a la salud en enfermedades no trasmisibles y lesiones, todos padecimientos en los que se usan fármacos como antibióticos y antimicóticos para evitar el crecimiento de microorganismos como, bacterias y hongos que ocasionan las complicaciones de las enfermedades. De la misma forma los dermatofitos son un grupo de hongos relacionados entre sí que presentan la capacidad de invadir los tejidos queratinizados (piel, pelo, uñas) del hombre y de los animales produciendo una enfermedad llamada dermatofitosis o más comúnmente

llamada tiña (Bonifaz 2012). Es una de las enfermedades con alta prevalencia más en población adulta en climas tropicales, húmedos y calientes, la dermatofitosis es la primera causa de enfermedad ungueal (SSA 2001). Las bacterias son organismos unicelulares oportunistas e infecciosas que provocan daño local de alguna lesión infectada o a nivel sistémico, que con tratamientos a base de fármacos como los antibióticos se detiene y erradica la infección. A surgido como un problema de consecuencias impredecibles la resistencia a estos por la aparición en las bacterias, hongos, virus y protozoarios de mecanismos defensivos con el fin de evadir la acción destructiva de esas sustancias (PUMNM, 2008).

Los biopolímeros ampliamente distribuidos en la naturaleza presentan características como el ser atóxicos, biocompatibles, biodegradables y poseen propiedades de adhesión a las mucosas, pueden ser utilizados como vehículos de liberación de principios activos de diversos compuestos como los extractos de algunas plantas a fin de aprovecharlos como una herramienta biotecnológica. El área de salud busca día con día mejorar sus tratamientos para la erradicación de enfermedades como es el caso de las infecciones causadas por bacterias y hongos de tal modo que este trabajo busca evaluar la actividad de los extractos metanólicos de especies de uso en nuestro país como lo es *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*, las cuales se encuentran en la relación de especies de uso etnobotánica en México de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (SSA 2001; BDMTM 2009a, 2009b), así como la conservación y/o incremento de dicha actividad al combinarlas y contenerlas en formulaciones hechas a base biopolímeros como lo son el quitosan y pululano.

3 ANTECEDENTES

3.1 Generalidades

Múltiples estudios a nivel mundial, expresan la utilidad de la medicina tradicional para el tratamiento de un importante número de enfermedades y padecimientos, en países latinoamericanos más del 50 % de la población sigue atendiendo y percibiendo sus problemas de salud de acuerdo con los patrones de su medicina tradicional (Shoshana *et al* 2006). Una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos y cuyos principios activos pueden servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos (OMS 2003). Según la OPS la medicina tradicional comprende el conjunto de ideas, conceptos, creencias, mitos y procedimientos, sean explicables o no, relativos a las enfermedades físicas, mentales, o desequilibrios sociales en un pueblo determinado (Shoshana *et al* 2006). En nuestro país existe una gran tradición en el uso de plantas medicinales, son escasos los datos resultantes de ensayos científicos destinados a evaluar la seguridad y eficacia de los productos y las prácticas de la medicina tradicional. Existe información de la eficacia de algunos productos herbarios para tratar determinadas enfermedades (OMS 2008) siendo estos insuficientes, ya que en la mayoría de los casos no existe un sustento científico que valide su uso terapéutico o que demuestre su toxicidad. Se entiende por *eficacia* la capacidad de una determinada sustancia de proveer beneficios saludables relacionados con la prevención de la deficiencia o la reducción del riesgo de enfermedad crónica, y por *seguridad*, la certeza razonable de que no van a darse efectos adversos por incrementar la ingesta de un nutriente, estableciéndose este concepto a la luz de la evidencia científica (Álvarez J 2004).

En México las plantas medicinales forman parte esencial de las estrategias generadas por la población para enfrentar sus enfermedades cotidianas. Esta presencia relevante, que no es nueva, pero si se encuentra actualmente sujeta a condiciones inéditas, se da en nuestro país no solamente en el medio indígena y el rural, sino también entre zonas urbanas y suburbanas, como resultado de la considerable diversidad biológica del país, de la naturaleza pluriétnica de su población y de la necesidad de recursos accesibles frente a muchos padecimientos (SSA 2001; Bermúdez *et al* 2005).

Con el tiempo las terapias con plantas endémicas de las regiones en cuestión pasaron a conformar la llamada medicina tradicional (Avello y Cisternas. 2010), como resultado de las prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias de diferentes culturas y tiempos frecuentemente inexplicables usados en el mantenimiento de la salud, así como en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas. Las plantas constituyen un valioso recurso en los sistemas de salud de los países en desarrollo, la población depende de la medicina tradicional para recibir atención primaria. La investigación sobre el uso de plantas medicinales forma parte de la Etnobotánica que ha sido definida como el estudio de las interrelaciones entre los grupos humanos y las plantas (Ford 1978; Martín 2001; Gómez-Veloz 2002).

Lo anterior enmarca el término *herbolaria* que es la aplicación de la botánica en la medicina, es decir el uso de hierbas contra las enfermedades que aquejan al hombre. Las investigaciones en esta área han permitido el aislamiento de principios activos de las plantas y el desarrollo de fármacos. La Secretaria de Salud en México en el 2001 menciona que la herbolaria no solo se refiere exclusivamente al conjunto de especies medicinales utilizadas empíricamente en el país, sino también al saber que articula la aplicación de esos recursos y que hoy es motivo de creciente interés. La atracción en ascenso por el uso de las plantas medicinales en México, también su creciente promoción mercantil, no son privativas del país, sino comunes en diversas regiones del mundo, en un momento en la cual ciertos núcleos de población de diferentes estratos sociales expresan la necesidad de alternativas naturales de tratamiento médico.

La biodiversidad del reino vegetal en el mundo se estima entre 400,000 y 500,000 especies de plantas superiores a las cuales solamente a un 10% se les han realizado estudios fitoquímicos y un menor porcentaje se han sometido a pruebas farmacológicas (Hostettmann y Wolfender 1997). Las propiedades medicinales de las plantas pueden provenir de cualquiera de sus partes (hojas, tallos, raíces, flores o semillas) que producen sustancias químicas llamadas metabolitos secundarios o principios activos (Balandrin *et al* 1993). Las partes de las plantas más comúnmente utilizadas como drogas vegetales son las flores, hojas, tallos, corteza, raíz, rizomas, frutos, semillas, parte aérea (SSA 2001).

Las plantas producen una diversidad de sustancias, producto del metabolismo secundario, algunas responsables de la coloración y aromas de flores y frutos, otras vinculadas con interacciones ecológicas, se ha demostrado que principalmente la mayoría de ellos participan en el mecanismo de defensa de las plantas, estos integran los principios activos de las plantas medicinales y los alimentos funcionales tal es el caso de los isoprenoides, derivados fenólicos y alcaloides. Los extractos vegetales crudos son mezclas complejas que están constituidas por cientos de compuestos (García *et al* 2012)

3.2 Descripción de las especies a estudiar

3.2.1 Descripción de la especie *Azadirachta indica*.

Clasificación taxonómica (Wren R.C. 1989):

Reino: Plantae

División: Spermatophyla

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Geraniales

Familia: Meliaceae

Género: *Azadirachta*

Especie: *A. indica*

3.2.1.1 Descripción botánica de *Azadirachta indica*.

Conocida comúnmente como margosa y paraíso de la India en español y como neem en inglés e hindi, es un árbol de tamaño de mediano a grande, caracterizado por su fuste corto y recto, una corteza arrugada de color de marrón oscuro a gris y una copa densa y redondeada con hojas pinadas. Nativa al sur de Asia, la margosa se planta y naturaliza extensamente en las áreas semiáridas a través de Asia y África. Ha sido introducida a varias de las islas del Caribe, en donde se le cultiva más que nada para sombra, combustible y numerosos productos no madereros que se obtienen de las hojas, la fruta y la corteza. Las flores de la margosa aparecen enpanículas estrechas y ramificadas de 5 a

15 cm de largo. Las flores individuales están compuestas de 5 lóbulos del cáliz, redondeados y de un color verde pálido; 5 pétalos blancos, oblongos y redondeados de 0.5 cm de largo; 10 estambres unidos en un tubo y un pistilo con un ovario redondeado y un estilo delgado. En su área de distribución natural y en el Caribe, la margosa florece entre marzo y mayo. En la zona Sudán-Sahélica en África, la florecencia ocurre por lo general entre abril y julio. Las frutas en forma de aceitunas (drupas) tienen de 1.0 a 2.0 cm de largo, son lisas y de un color de amarillo verdoso a amarillo cuando maduras. Las frutas de la margosa madurando junio a agosto en la India y entre septiembre y diciembre en la zona Sudán-Sahélica de Africa. Las frutas contienen una sola semilla elíptica, ocasionalmente dos, rodeadas de una pulpa dulce, la cual tiene un fuerte olor que recuerda al del ajo. La producción de la fruta comienza por lo usual cuando los árboles tienen de 3 a 5 años de edad y es profusa cuando los árboles alcanzan su productividad máxima a los 10 años de edad aproximadamente (Parrota JA y Chaturvedi AN 1994; Carnerio *et al* 2012; López y Angulo, 2007).



Figura 1. Planta de *Azadirachta indica*

3.2.1.2 Composición química de *Azadirachta indica*.

El principal compuesto que ha sido identificado es azadiractina así como nimbolinina, nimbina nimbidina, nimbinato de sodio, gedunina, salannina, nimbaneno, 6 desacetilnimbaneno, n-hexacosanol, 7-desacetil-7-benzoiacadiradiona, nimbiol, quercetina, β sitosterol y flavonoides polifenólicos (Alzohairy 2016).

3.2.1.3 Usos en medicina tradicional de *Azadirachta indica*

Se ha demostrado la presencia de metabolitos secundarios con actividad anticancerígena sobre diferentes líneas celulares (Roma et al 2015; Morris *et al* 2016), actividad antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* spp. (Ali *et al* 2016; Kankariya *et al* 2016; Vennila et al 2016; Ghonmode *et al* 2013; Goncalves *et al* 2008) actividad antioxidante de extractos obtenidos con diferentes solventes de las partes de la especie utilizando diferentes concentraciones (Sithisarn *et al* 2005; Priyadarsini *et al* 2009), actividad antiinflamatoria de compuestos que han sido aislados comparándolos con la acción de fármacos antiinflamatorios (Kumar et al 2012; Naik *et al* 2014; Llango *et al* 2013), efecto hepatoprotector evaluado por medio de diferentes bioensayos (Baligar *et al* 2014a, 2014b; Bhanwra *et al* 2000; Kale *et al* 2003), efecto cicatrizante (Ofusori et al 2010; Barua *et al* 2010; Osunwoke *et al* 2013) y actividad antidiabética (Patil *et al* 2013; Dholi *et al* 2011; Joshi *et al* 2011). De la misma forma existen estudios que confirman que a 1500 mg/kg la azaradictina no muestra toxicidad en un modelo animal y otros demuestran toxicidad y efectos adversos a partir de la ingesta de 5mL de aceite de semilla (Sinniah *et al* 1981; Lai *et al* 1990; Kumar *et al* 2014; Jaiswal *et al* 1994; Raizada *et al* 2001).

3.2.2 Descripción de la especie *Juglans regia*.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Subdivisión: Magnoliopsida

Clase: Fagales

Familia: Jugaglandaceae

Género: *Juglans*

Especie: *J. regia*

3.2.2.1 Descripción botánica de *Juglans regia*.

Árbol caducifolio que mide de ocho a quince metros de altura, con hojas pinadas de tres a cuatro centímetros de largo color verde claro y lisas por el anverso y en el reverso con pelos suaves (Martínez 1979; SAGARPA 2005). Árbol de gran porte con copa ancha y hojas caducas de un color verde claro, su corteza es gris planteado, puede alcanzar hasta 30 metros de altura, también puede tener un extraordinario tronco que con la edad se vuelve agrietado. Presenta hojas alternas imparipinadas, con 7-9 folíolos con el borde liso, ásperos al tacto, anverso brillante de color purpura al aparecer y muy oloroso cuando se frota. Presenta amentos solitarios, la inflorescencia surge a finales de verano del año anterior invernando en forma de capullo, las flores masculinas se agrupan en amentos, las femeninas no siempre se agrupan de esta manera por lo general se encuentran solitarias o aproximadas en corto números. Sus frutos son las nueces que maduran en el mes de octubre y adoptan la forma de drupa recubierta por una cascara carnosa que se torna negra y se descompone mostrando la arrugada cascara dentro de la cual se encuentra la nuez de alto valor nutritivo (Méndez 2008; Martínez 1979; SAGARPA 2005). Las 21 especies del género se distribuyen por todas las regiones septentrionales frías del Viejo Mundo, desde la Europa sudoriental al este del Japón y más ampliamente en el Nuevo Mundo, desde el sudeste de Canadá al oeste de California y el sur de Argentina (SAGARPA 2005).



Figura 2 Planta de *Juglans regia*

3.2.2.2 Composición química de *Juglans regia*.

Dentro de los principales compuestos identificados se encuentran fenoles, isoflavonas, flavonoides entre otros (Eidi *et al* 2013; Ahmad *et al* 2012; Chen *et al* 2012; Akbari *et al* 2012)

3.2.2.3 Usos en medicina tradicional de *Juglans regia*.

Se ha demostrado que tiene actividad como antioxidante, hepatoprotectora (Eidi *et al* 2013; Ahmad *et al* 2012; Chen *et al* 2012; Akbari *et al* 2012) y antitumoral (Dzidziguri *et al* 2016). Extractos de hojas de *Juglans regia* tiene efecto protector sobre el daño oxidativo inducido por CCl₄ en el hígado de ratas (Ahmad *et al* 2012). Se ha demostrado también actividad antimicrobiana (Cruz *et al* 2008), los aceites esenciales de *Juglans regia* presentan actividad antioxidante, actividad antibacteriana de amplio espectro sobre Gram-positivas: *Staphylococcus epidermidis* MTCC-435, *Bacillus subtilis* MTCC-441, *Staphylococcus aureus* y Gram-negativas: *Proteus vulgaris* MTCC-321, *Pseudomonas aeruginosa* MTCC-1688, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumonia* y *Escherichia coli* (Farroqui *et al* 2015; Zakavi *et al* 2013). Los extractos en acetato de etilo de *J. regia* presentan una potente actividad antifúngica contra todas las cepas de *Candida spp.* (Noumi *et al* 2010; Sharma *et al* 2008)

3.2.3 Descripción de la especie *Tecoma stans*.

Reino: Plantae (CONABIO 2008)

División: Magnoliophyta

Subdivisión: Magnoliopsida

Clase: Lamiales

Familia: Bignoniaceae

Género: *Tecoma*

Especie: *T. stans*

3.2.3.1 Descripción botánica de *Tecoma stans*.

Árbol pequeño o arbusto bajo, perennifolio o caducifolio, de 1 a 10 m (hasta 20 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 25 cm. Hojas compuestas, opuestas e imparipinnadas, 5 a 13 folioladas; los folíolos aserrados y lanceolados, el folíolo terminal de 2.4 a 15 cm de largo. Corteza dura y acostillada. Flores: inflorescencia en racimo terminal o subterminal, con 20 flores aproximadamente, sólo algunas abriendo al mismo tiempo; cáliz corto-cupular, de 4 a 7 mm de largo; corola color amarillo vivo, con 7 líneas rojizas en la garganta, tubular-campanulada, de 3 a 5 cm de largo. Las flores son muy vistosas, pero débilmente fragantes. Fruto: una cápsula alargada, cilíndrica y dehiscente, café, ahusada hacia los extremos, de 7 a 21 cm de largo por 5 a 7 mm de ancho, la superficie lenticelada; se abre a lo largo para liberar muchas semillas muy finas. Semillas pequeñas, aplanadas y aladas; cuerpo de la semilla de 7 a 9 mm de largo, alas blanco amarillentas, hialino-membranáceas, agudamente demarcadas del cuerpo de la semilla e incrementan el tamaño en 8 a 10 mm de ancho por 2 a 2.5 cm de largo. De sexualidad Hermafrodita (CONABIO 2008).



Figura 3 Planta de *Tecoma stans*.

3.2.3.2 Composición química de *Tecoma stans*.

Hojas y raíces contienen compuestos bioactivos, especialmente monoterpenos, flavonoides, lignanos, entre otros (Al Azzawi AM, 2012; Kameshwaran *et al* 2012; Lovely *et al* 2012)

3.2.3.3 Usos en medicina tradicional de *Tecoma stans*.

Se ha demostrado actividad antiinflamatoria (Kameshwaran *et al* 2012) citotóxica y antimicrobial (Al Azzawi *et al* 2012; Raju *et al* 2011); la tronadora, como es conocida comúnmente presenta actividad antidiabética reportada en un modelo murino y en adipocitos humanos (Alonso *et al* 2010). Existen estudios del efecto no tóxico a 5000mg/kg de extracto de acetato de etilo vía oral a ratas albinas (Raju *et al* 2011), del efecto citotóxico sobre líneas de celular de fibroblastos a 100000mg/mL (Al Azzawi *et al* 2012), de la actividad antimicrobiana y efecto antioxidante de extractos obtenidos de manera continua con metanol y sus fracciones con acetato de etilo, cloroformo, n-butanol y acuosa de hojas y ramas por el método DPPH, siendo la fracción de acetato de etilo de hojas y ramas la que mostró el mayor porcentaje de inhibición con $83,4 \pm 0,31$ y $82,06 \pm 0,54\%$ respectivamente (Mohamed *et al* 2012; Anburaj *et al* 2016)

3.2.4 Descripción de la especie *Magnolia grandiflora*.

Clasificación taxonómica (Wren R.C. 1989):

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Subdivisión: Magnoliopsida

Clase: Magnoliidae

Familia: Magnoliaceae

Género: *Magnolia*

Especie: *M. grandiflora*

3.2.4.1 Descripción botánica de *Magnolia grandiflora*.

Árbol monoico perennifolio de hasta 30 m de alto (Johnson, 1976; González, 1984) con tronco erecto y ramificado desde la base; la copa es cónica y densa; las ramificaciones jóvenes presentan pubescencia rojiza; yemas cónicas color verde oscuro, con el ápice rojizo y pubescente; su crecimiento es lento de joven (menos de 20 cm/año) y moderado en la madurez (25-90 cm/año); la especie vive de 60 a 80 años (Pañella 1972; Castaños,

1992; Martínez y Chacalo, 1994). Presenta corteza grisácea, lisa ligeramente fisurada, presenta cicatrices circulares en cada nudo (Chanes 1979; Hernández 1980; Martínez y Chacalo, 1994). Hojas, perennes, ovales oblongas, lanceoladas, color verde brillante, grandes (7-12 cm de largo y 3-9 cm de ancho), coriáceas, lustrosa y glabras en el haz, densamente tomentosas y ferrugíneas en el envés, fragantes cuando son estrujadas; margen entero, ápice y base agudos o acuminados, nervación reticulada; pecíolo de 1-3 cm de largo, tomentoso, ferrugíneo sólo en el ápice; estípulas libres de 1-3 cm de largo (Mendoza y Rodríguez, 1959; Pañella, 1972; Hernández 1980, Martínez y Chacalo, 1994). Presenta flores hermafroditas, solitarias, terminales y grandes en forma de copa, cuando están totalmente abiertas miden de 20-25 cm de ancho, sujetas en cortos pedicelos de 3.5-4.5 cm de largo, tomentosas y ferrugíneas, presentan de 6-12 pétalos carnosos de color blanco y púrpura en la base; numerosos estambres cortos y abundantes pistilos contenidos en un receptáculo. Floración de mediados de primavera a mediados de otoño (abril a noviembre) y presentan el característico olor a limón (Mendoza y Rodríguez 1959; Pañella 1972; Chanes 1979; Hernández 1980; Phillips, 1985; Castaños 1992; Martínez y Chacalo, 1994). Presenta fruto polifolículo verdoso al principio y rojizo al madurar, de 10-12 cm de largo, de forma ovoide u oblonga, tomentoso y ferrugíneo; el folículo leñoso con dehiscencia dorsal, contiene de 1-2 semillas rojas ovoides suspendidas sobre filamentos; semillas de 40-60 por fruto. Fructificación a mediados de otoño (Chanes, 1979; Hernández. C., 1980 Catalán, 1993; Martínez y Chacalo, 1994).



Figura 4 Planta de *Magnolia grandiflora*

3.2.4.2 Composición química de *Magnolia grandiflora*.

Los principales compuestos que han sido aislados son los que contienen grupos aromáticos, aceites esenciales, terpenoides, flavonoides, lignanos y neolignanos (*Wen et al 2013; Hu et al 2011; Hiroshi et al 1999*)

3.2.4.3 Usos en medicina tradicional de *Magnolia grandiflora*.

Presentan actividad antiinflamatoria (*Luo et al 2013*). Actividad anti fúngica contra diferentes dermatofitos, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante (*Guerra et al 2013; Bajpai et al 2009; Dong et al 2013;*), antitumoral (*Hou et al 2013; Youn et al 2012; Han HK et al 2012*), antiinflamatorio (*Chuang et al 2013; Fu Y et al 2013; Kuo et al 2013*). En diferentes regiones se usa para problemas relacionados con el “corazón” y los “nervios” (*SSA 2001*). En Michoacán, Puebla, Tlaxcala y Veracruz, se utiliza particularmente a esta especie para atender padecimientos del corazón; se bebe como té la decocción de las flores. En ocasiones se hierven las flores junto con la corteza, para calmar los nervios, aliviar cólicos, dolor de pies y tratar la bilis. (*BDMTM 2009*)

3.3 Actividad Biológica

Los metabolitos secundarios son sustancias orgánicas de bajo peso molecular, que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas y demás organismos como respuesta a múltiples factores ambientales a los que se encuentran expuestas (*Herbone J.B 1973, 1990*). Estos compuestos orgánicos le atribuyen a la especie en estudio, una acción farmacológica, los cuales se ejercen una vez que han sido ingeridos o aplicados de diferentes formas como infusiones, tés y otras preparaciones (*Estrada 1995*).

Partiendo entonces de que las plantas son fuente de múltiples sustancias bioactivas y de que al paso del tiempo el ser humano ha utilizado las plantas para el alivio de sus males y dolores, se evidencia la necesidad de continuar con la investigación con enfoques eficientes en la utilización de diferentes plantas para determinar su actividad biológica o aprovechar la evidencia reportada, comprobar dicha información en especies de la región y buscar posibles formas de aprovechar dichos efectos benéficos.

Los principales compuestos presentes en las plantas son los compuestos fenólicos (taninos, fitoestrógenos y cumarinas); compuestos nitrogenados: (alcaloides, glucósidos

cianogénicos, glucosinolatos, aminoácidos tóxicos, lectinas, inhibidores de proteasas); terpenos: (lactonas, sesquiterpenlactonas, glucósidos cardíacos, saponinas); hidrocarburos poliacetilénicos y oxalatos (Ikan 1991; Domínguez 1979). Una gran gama de estudios se ha dedicado al estudio de nuevos compuestos y aplicaciones a partir de fuentes naturales y muchos relacionados con actividades antimicrobianas de plantas de uso común en la medicina alternativa.

3.4 Actividad antifúngica

El conocimiento de los hongos microscópicos trajo consigo el desarrollo de la micología médica; se descubrieron nuevas entidades clínicas. Se sabe que los hongos no poseen cloroplastos, por tanto no son fotosintéticos; son organismos heterótrofos, debido a que no pueden manufacturar sus propios nutrientes como las bacterias; su nutrición es por absorción de sustancias orgánicas simples o elaboradas; se realiza de dos maneras: como saprofitos, cuando toman sus nutrientes de materia orgánicas muertas o en descomposición y como parásitos, cuando se nutren de materia viva tal es el caso de los hongos patógenos primarios y oportunistas (Bonifaz A. 2012).

Las condiciones de crecimiento de estos microorganismos son óptimas para cada especie; la mayoría de los hongos crecen entre 0 y 55°C, teniendo por lo general un rango de temperatura ideal entre 20 y 30°C. Los hongos patógenos primarios y oportunistas que afectan al ser humano por lo general crecen entre 35 y 40 °C, por lo que están dentro de los grupos mesófilos y termófilos. La primera clasificación que surgió fue la empírica que, de acuerdo con el aspecto macroscópico que presentan, divide a los hongos en: Hongos macroscópicos, hongos filamentosos, levaduras u hongos de crecimiento limitado cremoso y los actinomicetos (Bonifaz A. 2012).

La dermatofitosis es una micosis cutánea que se refiere a un complejo de entidades causadas por algunos hongos filamentosos relacionados desde el punto de vista taxonómico que pertenecen a los géneros *Trichophyton*, *Epidermophyton*, y *Microsporum*. En conjunto estos hongos se conocen como dermatofitos y causan enfermedad en el ser humano, comparten la característica de presentar la capacidad de invadir la piel, el cabello o las uñas. En cada caso los hongos son queratinofílicos, por lo que son capaces de degradar las capas de queratina más externas de dichas estructuras,

son conocidas también como tiñas y se clasifican según su localización anatómica o la estructura afectada: 1) tiña del cuero cabelludo, las cejas y las pestañas; 2) tiña de la barba; 3) tiña corporal de la piel lisa o grabla; 4) tiña inguinal de la ingle; 5) tiña de los pies, y 6) tiña ungueal de las uñas también llamada onicomycosis. Los dermatofitos se clasifican en tres categorías diferentes en función de cual sea su hábitat natural: 1) geofílicos, 2) zoofílicos, y 3) antropofílicos. Los dermatofitos geofílicos viven en el suelo y son patógenos ocasionales de los animales y el ser humano, los más frecuentes en México es *M. gypseum*; Los dermatofitos zoofílicos suelen parasitar el pelo y la piel de los animales, aunque pueden transmitirse al ser humano, el más común en México es *M. canis* y los dermatofitos antropofílicos infectan generalmente al ser humano y se transmiten directa o indirectamente de una persona a otra, los más comunes en México son *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* (Murray P.R. et al 2009, Bonifaz A., 2012).

Los dermatofitos tienen distribución universal y la infección se adquiere por transferencia de arthroconidias o hifas, o bien de material queratinoso que contenga cualquiera de estos elementos, a partir de un organismo infectado a otro sujeto susceptible no infectado. Los dermatofitos son capaces de persistir en escamas de la piel por tiempos prolongados y puede infectar a pacientes de todas las edades y en ambos sexos. Aunque la dermatofitosis se registra en todo el planeta en especial en las regiones tropicales y subtropicales, con climas cálidos y húmedos, la distribución geográfica y la virulencia en el ser humano difieren en cada especie de dermatofitos. En lo que respecta a Latinoamérica y México, los cinco dermatofitos más frecuentes son: *T. rubrum* (70%), *T. mentagrophytes* (10%) *t. tonsurans* (3%), *M. canis* (13%) y *E. floccosum* (1%) (Murray P.R. et al 2009, Bonifaz A., 2012).

El tratamiento de la dermatofitosis depende de una serie de circunstancias como son: topografía clínica, extensión y profundidad del padecimiento. Los agentes causales son casi en su totalidad sensibles a los mismos tratamientos. Existen dos tipos de tratamientos, sistémico y tópico, con indicaciones precisas cada uno. La terapia sistémica se debe utilizar en tiñas de la cabeza, barba, uñas, crónicas, muy extensas, profundas, corticoesteroideas, pacientes inmunosuprimidos (Bonifaz A., 2012).

Diversos estudios demuestran evidencia científica de la actividad biológica sobre diferentes especies fúngicas como:

La actividad antifúngica de extractos metanólicos, acetónicos y con acetato de etilo de hojas de *J. regia* sobre diferentes cepas de *Candida spp*, mostrando valores de MIC que oscilan entre 0.006 mg/mL hasta 0.195 mg/mL en los extractos con acetato de etilo (Noumi E *et al* 2010).

La actividad antifungica de extracto corteza de *J. regia* sobre *Candida albicans* una levadura patógena (Alkhawajag 1997).

La actividad antifúngica de extractos acuosos de madera de nogal y cáscaras verdes (*Juglans regia* L.) de cinco variedades diferentes (Franquette, Mayette, Marbot, Mellanaise y Parisienne), todos inhibieron el crecimiento de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* (Ivo *et al* 2008).

La actividad antifungica de extractos acuosos de *J. regia* sobre nueve aislados de *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton violaceum*. El extracto reduce el crecimiento los tres dermatofitos en un 36 a 100% en comparación con el tratamiento control. *Juglans regia* impide totalmente el crecimiento de *M. canis* y *T. violaceum*. Las MICs de estas plantas más activos varió de 0,6 a 40 mg/mL (Ali y Abu en 1999).

La actividad antifúngica de extractos etanólicos de corteza de *Junglas regia* sobre *Trichophyton rubrum*, *T. violaceum*, *T. gourvila*, *T. schoenleini*, *Microsporum gypseum*, *M. audouini* *M. vanbreuseghemii*, *Sporotrichum schenckii*, *Candida albicans*, *C. tropicalis* (Ahmad *et al* 1973).

La actividad antifúngica a partir de extractos orgánicos de *Tecoma stans* sobre dos especies de hongos subcutáneos: *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi* por el método de dilución agar con una concentración de 100 µg/mL, mostrando mejor actividad sobre *F. pedrosoi* mostrando un MIC de 12.5 µg/mL (Indra *et al* 2010).

La actividad antifúngica de *T. stans* por medio del ensayo de difusión en gota sobre especies de *Aspergillus* y *Alternaria* (Robles *et al* 2011).

La actividad antifúngica sobre la levadura *Candida albicans* 077 de nanopartículas de plata impregnadas de extractos de hojas de *Azadirachta indica* (Qasim *et al* 2015).

La actividad antifúngica de extractos de acetato de etilo, acuoso y etanólicos de hojas de neem (*Azadirachta indica*) sobre el crecimiento de algunos patógenos humanos (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Candida albicans* y *Microsporium gypseum*) in vitro. El extracto de acetato de etilo al 20% dio la inhibición más fuerte en comparación con la actividad obtenida por la misma concentración de los otros extractos (Mhmoud *et al* 2011).

La actividad antifúngica eficaz de los aceites esenciales de *Magnolia grandiflora* frente a cinco cepas de dermatofitos: *Microsporium canis*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Tricophyton tonsurans*, *Tricophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* (Guerra *et al* 2013).

La actividad antidermatofítica de aceites esenciales y extractos de *Magnolia liliflora* Desr. el aceite (1,000 g / disco) y extractos (1500 mg / disco) revelaron 42,36 a 63,12% y 19,07 a 54,14%, respectivamente, junto con sus respectivos valores de CMI que varían entre el 62,5 a 500 y 250 a 2.000 g / mL en contra de las especies de *Trichophyton* y *Microsporium spp.* (Bajpai *et al* 2009).

3.5 Actividad antibacteriana

El incremento de enfermedades infecciosas se produce en respuesta a los cambios ecológicos globales incluyendo aquellos debidos al desarrollo de las comunidades y uso de la tierra, al comportamiento humano irracional, a los viajes y comercio internacional, al desarrollo tecnológico industrial, a las crisis en medidas de salud pública y sobre todo a los cambios y adaptaciones microbianas. Estos últimos han generado el fenómeno de la resistencia bacteriana en múltiples cepas bacterianas de importancia médica, ya es considerado como un fenómeno de crisis mundial con consecuencias graves, ya que en el área clínica los pacientes presentan una o varias cepas multidrogoresistentes.

Algunas de las principales condiciones que favorecen la resistencia bacteriana son el movimiento de pacientes dentro y entre instituciones médicas y la automedicación (Levy 2002). A nivel celular, los principales mecanismos de la resistencia incluyen sistemas de flujo activo de la droga, mutaciones por alteraciones de la permeabilidad celular,

degradación celular de los antibióticos y alteraciones de sus blancos celulares por mutaciones o por metilación (Brehm *et al* 2003).

La presencia de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana en productos naturales le atribuye a estos, características terapéuticas desde años remotos y en la búsqueda constante de agentes antimicrobianos la implementación de modelos farmacodinámicos es una herramienta útil para el análisis de los compuestos naturales potencialmente activos desarrollados *in vivo* o *in vitro* (Campion *et al* 2005).

Estudios reportan diferentes especies de plantas con actividad antimicrobiana como:

La actividad antibacteriana de extractos metanólicos de hojas y cascara de fruto de *J. regia* sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7544 (MIC de 2500 y 5000 µg/mL) respectivamente, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (MIC de 2500 y 5000 µg/mL respectivamente), *Escherichia coli* ATCC 25922 (MIC de 5000 µg/mL) para ambos extractos, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (MIC de 5000 µg/mL) para ambos extractos (Nostro *et al* 2016).

La actividad antibacteriana de extracto corteza de *J. regia* sobre, bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus mutans*, bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Alkhawajag 1997).

La actividad antibacteriana a partir de extractos con disolvente (metanol, n-hexano, acetato de etilo, n-butanol y agua) obtenidos a partir de madera de nogal (*Juglans regia* L.) de cáscara verde, el extracto de acetato de etilo, mostró la mayor actividad en 3,2 mg / mL sobre *Staphylococcus aureus* SG511 (Kook *et al* 2015).

La actividad antibacteriana de extractos etanólicos de corteza de *J. regia* sobre cepas de bacterias patógenas de *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus* el MIC varió desde 32 hasta 128 µg/mL (Kamel *et al* 2013).

La actividad antibacteriana de extractos acuosos de corteza de *J. regia* sobre cepas de aislados clínicos multidrogoresistentes de *Salmonella thypi*, y *Escherichia coli* (Junaid *et al* 2013).

A partir de extractos acetónicos y acuosos de *J. regia* se probaron mediante ensayos con saliva de pacientes que tienen caries dentales, por medio de difusión en placa, que el extracto con acetona es el más eficaz, como medicamento anticariógeno usando 100 -400 µg por disco (Zakavi *et al* 2013).

Las actividades antibacterianas a partir de la extracción por microondas con diferentes solventes se probaron sobre 16 cepas bacterianas todos los extractos mostraron actividad siendo la mejor la extracción con acetato de etilo (Nandini *et al* 2009).

La actividad antibacteriana de extractos acuosos de madera de nogal cáscaras verdes (*Juglans regia* L.) de cinco variedades diferentes (Franquette, Mayette, Marbot, Mellanaise y Parisienne). Todos los extractos inhibieron el crecimiento de las bacterias Gram positivas, siendo *Staphylococcus aureus* el más susceptible con el MIC de 0,1 mg / mL para todos los extractos. Se probaron cepas contra bacterias gram positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*) y bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) (Ivo *et al* 2008).

La actividad antibacteriana de extractos acuosos y metanólicos de *J. regia* sobre cepas de aislados clínicos de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus sp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Shigella sp.*, *Enterobacter cloacae*, *Pasteurella multocida*, *Helicobacter pylori*, *Campilobacteri jejuni* de un total de 350 cepas probadas (Farooqui *et al* 2015).

La actividad antibacteriana de extractos obtenidos de manera continua con metanol y sus fracciones con acetato de etilo, cloroformo, n-butanol y acuosa de hojas y ramas de *T. stans* sobre *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa*, siendo el extracto metanólico el de mayor actividad (Mohamed *et al* 2012).

Las actividades biológicas de *Tecoma stans*, como la actividad antioxidante, antimicrobiana, actividad antifúngica, actividad contra el cáncer, la actividad antihiperlipememiente (Anburaj *et al* 2016).

La actividad antibacteriana eficaz de tres extractos de diferentes solventes etanol, metanol y el agua de la hoja de *Tecoma stans* sobre *Pseudomonas fluorescens*, *Clavibacter michiganensis sub sp. michiganensis*, *Xanthomonas axanopodis pv. malvacearum*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella neumonia* (Govindappa *et al* 2011)

La actividad antibacteriana de *Tecoma stans* sobre *Helicobacter pylori*. El anti- *H pylori* de extractos metanólicos de las plantas se determinó utilizando el método de microdilución (Marzouk *et al* 2006).

La actividad antibacteriana de *Azadirachta indica* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella spp* (Ali *et al* 2016; Kankariya *et al* 2016; Vennila *et al* 2016; Ghonmode *et al* 2013; Goncalves *et al* 2008)

La actividad antibacteriana de *Magnolia officinalis* a partir de extractos metanólicos sobre *Staphylococcus auerus* evaluando por microscopía el daño celular, resultando daños en la pared celular provocando lisis a la célula (Hu Y *et al* 2011).

La actividad antibacteriana a partir de los aceites esenciales de *Magnolia grandiflora* sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* (Guerra *et al* 2013).

3.6 Actividad antioxidante

El proceso de oxidación y los agentes promotores son de suma importancia para la salud en la actualidad, ya que influyen considerablemente en la homeostasis celular en el organismo, asociado a la función antioxidante se considera el proceso de óxido–reducción, cuando se pierde electrones de hidrógeno y ganancia de oxígeno en una molécula, mientras que otra molécula gana electrones de hidrógeno con la pérdida de oxígeno. Este proceso es cotidiano en el organismo y representa balance redox o potencial redox. Un radical libre es aquella estructura química que presenta electrones no apareados, es altamente reactiva, a su vez forma otros radicales libres en cadena. Los compuestos en cuestión forman parte de las llamadas especies reactivas del oxígeno (ERO) o ROS (Reactive Oxygen Species), mismos que afectan a las células provocando estrés oxidativo. Múltiples estudios han relacionado este desbalance del sistema oxidativo, como también

conocido como estrés oxidativo, con el que se relacionan alrededor de 100 enfermedades, entre las que se encuentran los cardiovasculares cánceres gástricos, infecciosos, neurológicos y del sistema endocrino (Coronado *et al* 2015). La investigación basada en aprovechar el recurso natural con el que se cuenta, manifiesta la necesidad de buscar la presencia de metabolitos secundarios que presenten esa capacidad de estabilizar moléculas altamente reactivas. Estudios han reportado la presencia de moléculas con actividad antioxidante derivados de plantas utilizadas en la medicina tradicional o de algunos alimentos (Treviño *et al* 2012; Kakuta *et al* 2012).

Se ha encontrado evidencia que el hidrolizado enzimático de semillas de *Juglans regia* L. preparado por incubación por proteasas, posee excelente capacidad antioxidante, determinado por el método ABTS (Jahanbani *et al* 2016).

El aceite esencial de hojas de *J. regia* es un potencial antioxidante utilizando el método de DPPH. Los resultados mostraron valores de concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) de 34,5 y 56,4 mg / mL (Pereira JA *et al* 2007).

El incremento de enzimas antioxidantes: superoxido dismutasa y catalasa con el uso de extracto de nuez (Eidi A *et al* 2013).

La actividad antioxidante de hojas de *Juglans regia* por métodos *in vitro*: químicos e intracelulares mostrando notable actividad (Zhao MH *et al* 2014).

El efecto de consumir nueces en pacientes voluntarios con estrés oxidativos, mostrando un incremento en la captación de radicales libres comparado con consumo de dietas refinadas. Haddad *et al* 2015

Las hojas de nogal obtenidas a partir de 14 fuentes diferentes contienen fenoles totales que oscilaron entre 17.7-39.6 mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) / g. los extractos metanólicos poseían la actividad más potente (DPPH) (Cosmulescu S, *et al* 2012)

El beneficio de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), a partir de extracto de nogal para reducir el daño de células del hipocampo, mediada por inflamación y estrés oxidativo, demostrándose un considerable beneficio contra la muerte celular y desregulación del calcio (Carey *et al* 2013).

Los extractos con disolvente (metanol, n-hexano, acetato de etilo, n-butanol y agua) obtenidos a partir de madera de nogal (*Juglans regia* L.) de cáscara verde, se demostró su capacidad antioxidante por medio del método DPPH resultando una IC₅₀ de 13,43 µg / mL (Kook *et al* 2015).

La actividad antioxidante de extractos etanólicos de corteza de *J. regia* determinado por el método DPPH mostró una IC₅₀ de 3,5 µg/mL (Kamel *et al* 2013).

La actividad antioxidante de extractos acuosos de madera de nogal cáscaras verdes (*Juglans regia* L.) de cinco variedades diferentes (Franquette, Mayette, Marbot, Mellanaise y Parisienne) resultando, por el método DPPH una IC₅₀ inferiores a 1 mg / ml para todos los extractos ensayados (Ivo *et al* 2008; Pereira *et al* 2007).

La alta capacidad antioxidante determinada por medio de diferentes métodos a partir de extractos de *Juglans regia* gracias a metabolitos secundarios del fruto siendo *los principales compuestos responsables: taninos, fenoles, isoflavonas, flavonoides* (Yin *et al* en el 2015; Ahmad *et al* en el 2012; Chen *et al* 2012; Akbari *et al* 2012)

Efecto antioxidante de extractos obtenidos de manera continua con metanol y sus fracciones con acetato de etilo, cloroformo, n-butanol y acuosa de hojas y ramas por el método DPPH, siendo la fracción de acetato de etilo de hojas y ramas la que mostró el mayor porcentaje de inhibición con 83,4 ± 0,31 y 82,06 ± 0,54% respectivamente. (Mohamed *et al* 2012).

Tecoma stans tiene diversas actividades farmacológicas tales como la actividad antioxidante, antimicrobiana (Anburaj *et al* 2016).

La actividad antioxidante de extractos obtenidos con diferentes solventes de las partes de la especie *Azadirachta indica* utilizando diferentes concentraciones por el método DPPH (Sithisarn *et al* 2005; Priyadarsini *et al* 2009).

Los aceites esenciales de *Magnolia grandiflora* presentan actividades antioxidantes con valores efectivos de concentración media máximas > 250 µg / mL (Guerra *et al* en el 2013).

La capacidad antioxidante del aceite esencial y extractos de solventes de diferente polaridad de *Magnolia liliflora* determinada por el método DPPH resultaron valores de IC₅₀ entre 10.11 y 178.10 µg/mL, mostrando el extracto metanólico una IC₅₀ alrededor de 45 µg/mL (Bajpai *et al* en el 2009).

3.7 Toxicidad

Es indispensable considerar que los metabolitos secundarios presentan actividades biológicas útiles para la salud, pero de la misma forma pueden manifestar eventos de toxicidad, asociado a su concentración, por tanto, es necesario determinar y conocer la CL₅₀ de un extracto, ya que se busca siempre el efecto biológico benéfico aunado al no tóxico (Lagarto *et al* 2001; Gonzalez y Aportela 2001). Las larvas de *Artemia salina* han sido utilizadas en bioensayos en numerosas investigaciones, publicando la CL₅₀ de metabolitos secundarios aislados o de extractos crudos, ya que desde el punto de vista ecotoxicológico los invertebrados acuáticos juegan un papel importante en la transferencia de alimentos o flujo de energía dentro de la cadena alimentaria de estos ecosistemas, por lo que las alteraciones originadas por la presencia de un agente tóxico en uno de estos grupos pueden en algún grado, interferir con otros componentes interdependientes de la cadena trófica. La evaluación de la toxicidad en larvas de *Artemia salina* además de ser un bioensayo, práctico y económico nos permite realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones de concentración-respuesta bajo condiciones controladas (Sanchez 2005; GuTu *et al* 2015)

Existe evidencia científica de plantas que presentan cierto grado o nula toxicidad por diferentes ensayos o bioensayos:

Se demostró el efecto no tóxico a 5000mg/kg de extracto de acetato de etilo *Tecoma stans* vía oral a ratas albinas (Raju *et al* en el 2012) y el efecto citotóxico sobre líneas celulares de fibroblastos a 100000 µg/mL (Al-Azzawi en el 2012).

De la misma existen estudios que confirman que a 1500 mg/K azaradictina no se muestra toxicidad en un modelo animal y otros demuestran toxicidad y efectos adversos a partir de la ingesta de 5mL de aceite de semilla (Lai *et al* 1990; Kumar *et al* 2014; Jaiswal *et al* 1994; Raizada *et al* 2001)

La toxicidad nula de compuestos de especies del genero *Magnolia spp* como el honikol y magnoliol (Prasad *et al* 2016; Pan *et al* 2016; Sakaue *et al* 2016).

Estudios previos han reportado datos de hipersensibilización asociada con el uso tópico de nogal; sin embargo, el extracto acuoso de nogal modula la toxicidad de la ciclofosfamida y la metabolización protegida y enzimas antioxidantes durante la quimioterapia. En ratones, la dosis letal media-máxima (DL₅₀) de inyección intraperitoneal de hoja acuosa *J. regia* y extracto etanólico fue de 5,5 y 3,3 g. Del mismo modo, a una dosis de 5 mol / L, juglone redujo significativamente la concentración de ATP en los eritrocitos. En contraste, la actividad de 10 mmol / L juglone en la unión de anexina fue inhibida considerablemente mediante la eliminación de Ca²⁺ extracelular (Nisha *et al* 2016).

3.8 Biopolímeros

El aprovechamiento de biomoléculas con características químicas, físicas y estructurales que permitan apoyar a la dispersión de sustancias para el tratamiento de diferentes enfermedades es lo que ha motivado a la ciencia apoyarse en lo biopolímeros los cuales a lo largo del tiempo han logrado convertirse en una herramienta biotecnológica de gran importancia dentro de los más utilizados están los hidratos de carbono ya que cuentan con estructuras únicas que han sido explotadas por los químicos sintéticos para el diseño de biomateriales. Las características estructurales, tales como la presencia de un carbono anomérico, múltiples grupos hidroxilo, estructuras cíclicas, y quiralidad son de gran importancia para el diseño de biomacromoléculas; características físicas y químicas como el ser atóxicos, biocompatibles, biodegradables, con propiedades de adhesión a las mucosas, además de ser abundantes en la naturaleza, renovables y considerados materiales de bajo costo para la introducción de la hidrofiliidad y biocompatibilidad en los sistemas poliméricos estas características han conducido a su uso en el desarrollo de nuevos materiales sostenibles para aplicaciones biomédicas (Sizovs *et al* 2010)

Existen múltiples biopolímeros de origen natural y de los más utilizados se encuentra el almidón, la celulosa, el ácido poliláctico, el quitosán y el pululano. Los biopolímeros se pueden clasificar según su fuente, en tres subgrupos: polímeros basados en recursos renovables (almidón y celulosa), polímeros biodegradables basados en monómeros

bioderivados (aceites vegetales y ácido láctico) y biopolímeros sintetizados por microorganismos (polihidroxicanoatos) (valero *et al* 2013).

3.8.1 Quitosan

El quitosan es producido comercialmente por la desacetilación de la quitina, obtenido por los desechos de crustáceos y algunos insectos (figura 5). Chitosan α (1–4)–unido a 2-amino-2-desoxy-s-D-glucan segundo polisacárido más abundante en la naturaleza después de la celulosa, el cual presenta características como biodegradabilidad y no toxicidad, se ha usado en diferentes aplicaciones solo o combinado con otros polímeros naturales como el almidón o gelatina, en algunos alimentos, productos comercializados, textiles, agua y cosmética (Dutta *et al* 2013; Younes *et al* 2015).

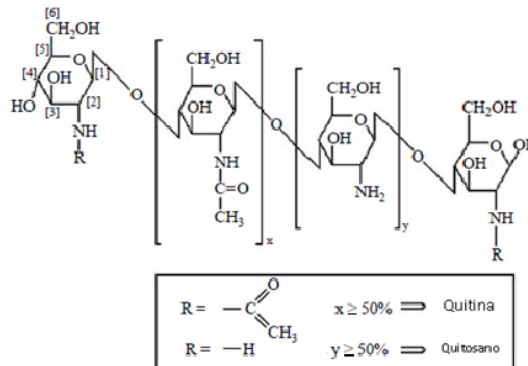


Figura 5 Estructura química de quitosan y quitina

Se ha demostrado actividad antimicrobiana sobre una amplia gama de microorganismos tales como bacterias Gram negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter aerogenes* y Gram positivas: *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*. Levaduras y hongos: *Alternaria brassicicola*, *A. solani*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *Botrytis cinerea*, *Byssoclamys spp.*, *Fusarium concentricum*, *F. oxysporum*, *Mucor piriformis*, *M. racemosus*, *Pythium debaryanum*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *Microsporium canis*, *M. gypseum*,

Tricophyton mentagrop hytes, *T. rubrum* y *T. tonsurans* (Hironori *et al* 2015; Kong *et al* 2010; Rahman *et al* 2014).

Los biopolímeros a base de quitosan resultaron efectivos en la reducción de la hidrofobicidad y la adhesión de *C. albicans* a células, (Azcurra *et al.*, 2006). Sus propiedades bioadhesivas y antimicrobianas brindan efecto paliativo como recubrimiento de lesiones en boca como candidiasis y aftas orales (Aksungur *et al.*, 2004). Como vehículo en la liberación prolongada de antibióticos (San *et al.*, 2009; Ramdas *et al.*, 1999; Bhattarai *et al.*, 2006).

El quitosan es insoluble en agua, alcohol, y acetona y soluble en soluciones de ácidos orgánicos con pH < 6, es un excelente floculante por la presencia de grupos amino en su estructura e interactúan con coloides cargados negativamente, tiene capacidad de unión con iones metálicos; gracias a todas estas características principalmente se ha usado el quitosan para la purificación de agua, procesamiento de alimentos y quelación de iones metálicos (Hoon *et al* 2001).

Son diversos los usos del quitosan como vehículo de liberación de sustancias farmacológicas: como ketoralaco, gatifloxacino (Chelladurai *et al.*, 2008 y Gorle and Gattani, 2009)

3.8.2 Pululano

El pululano es un homopolisacárido lineal sintetizado a partir del almidón, de origen microbiano (*Aureobasidium pullulans*), compuesto por unidades repetitivas de maltotriosa, cada tres unidades de glucosa unidos covalentemente por enlaces glucosídicos α -(1-4), se encuentran unidos por enlaces glucosídicos α -(1-6), (figura 6) tiene propiedades adhesivas, ampliamente utilizado en industria farmacéutica y biomédicas, en alimentos y cosméticos, considerado como un biomaterial por ser no tóxico, no mutagénico, no inmunogénico y no cancerígeno (Zisovs *et al* 2010; Zhang *et al* 2016; Wang *et al* 2016). Las formulaciones a partir de soluciones acuosas, son claras, incoloras, insaboras, buenas barreras al oxígeno, resistentes al aceite y sellables por calor. Las coberturas de pululano se han usado para prolongar la vida de anaquel de algunos

alimentos, por lo que es utilizado en diferentes industrias como la de alimentos, farmacéutica y manufactura (Kawahara *et al.*, 2003).

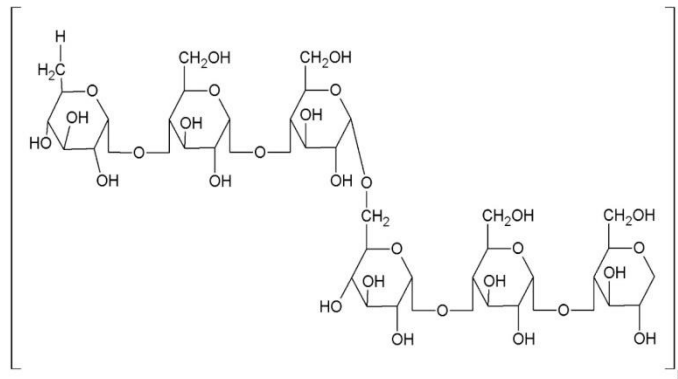


Figura 6 Estructura del pululano

El tener características de ser biodegradables, biocompatibles, no tóxicos hacen que el quitosán y el pululano se utilicen en diferentes biomateriales en el área médica y farmacéutica. Múltiples fármacos o principios activos con actividad microbiana pueden ser incorporado o disuelto en la formulación de dichos biopolímeros generando sistemas de liberación de drogas; el quitosán y el pululano pueden ser empleados en forma aislada o en combinación con otros compuestos, observando una mejoría en sus características físicas, mecánicas y /o biológicas (Galaev and Mattiason, 2008; Wang *et al.*, 2000).

3.9 Análisis estadístico

3.9.1 Análisis Probit

Este método se basa en la cuantificación de la vulnerabilidad de los individuos ante efectos físicos de una magnitud determinada que se suponen conocidos. El método consiste en la aplicación de correlaciones estadísticas para estimar las consecuencias desfavorables sobre la población u otros elementos vulnerables para los distintos niveles o dosis de los estímulos. La respuesta de una población ante un fenómeno físico se distribuye según una ley log-normal (Ferrán, 2001).

3.9.2 Análisis univariante

El análisis univariante da un análisis de regresión y un análisis de varianza para una variable dependiente mediante uno o más factores o variables. Las variables de factor dividen la población en grupos. Con el procedimiento modelo lineal general se pueden contrastar hipótesis nulas sobre los efectos de otras variables en las medias de varias agrupaciones de una única variable dependiente. Se pueden agregar los efectos de las covariables y las interacciones de covariables con los factores (Ferrán, 2001).

3.9.3 Tukey

La prueba de Tukey es parecida a una prueba t de student ya que se calcula la única diferencia crítica para realizar todas las comparaciones entre las medias, crea intervalos de confianza para todas las diferencias en parejas entre las medias de los niveles de los factores mientras controla la tasa de error por familia en un nivel especificado. (Ferrán, 2001).

4 JUSTIFICACIÓN

En base a la prevalencia de las diferentes enfermedades a nivel nacional, las cuales se pueden presentar de manera asintomática, sintomática aguda y crónica, se ha demostrado la utilidad de diferentes sustancias farmacológicas para su tratamiento en la medicina alopática, presentando en ocasiones eventos como resistencia bacteriana, resistencia fúngica y/o oxidación celular. Las enfermedades infecciosas son causadas por microorganismos los cuales participan en las complicaciones de enfermedades crónico degenerativas, mismas que han estado en aumento nuestro país. Dentro de los tratamientos de las enfermedades infecciosas se encuentran los antibióticos de manera tópica (cremas, geles) y sistémicos (capsulas, tabletas) aplicados por variedades de tiempo de 2 a 4 semanas para el caso de los tópicos y para caso de tratamientos sistémicos más de 2 a 6 meses de duración aproximadamente. Los tratamientos tópicos presentan como desventajas el tiempo de duración de tratamiento, la interacción con diferentes sustancias contenidas en cremas humectantes y/o bloqueadoras, así como penetrabilidad limitada; los sistémicos presentan interacción con el metabolismo de diferentes fármacos ocasionando consecuencias hepáticas, cardíacas entre otras, y las condiciones de pH gástrico e intestinal limitan su absorción.

La investigación basada en el recurso vegetal para el tratamiento de enfermedades ha demostrado que existen plantas con actividad antifúngica sobre las especies de algunos dermatofitos, así como actividad antimicrobiana y antioxidante lo que hace a estas plantas, especies de interés de estudio para su aplicación.

Por tanto la relevancia de este proyecto es evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas ya mencionadas y su aplicación en formulaciones a base de biopolímeros, de esta manera resultará ser una opción futura de tratamiento un sistema de liberación de metabolitos secundarios activos a partir de materias primas de bajo costo, fácil aplicación y con características adecuadas para la función destinada y que sea clínicamente útil.

5 HIPÓTESIS

La aplicación de los extractos metanólicos de las plantas *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*, en formulaciones a base de biopolímeros tendrán actividad biológica sobre microorganismos de importancia médica.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar la aplicación de los extractos metanólicos de las plantas *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora* y su aplicación en formulaciones a base de biopolímeros sobre microorganismos de importancia médica.

6.2 Objetivos particulares

- Colecta, identificación y procesamiento del material vegetal.
- Obtención de los extractos metanólicos de las plantas en estudio.
- Determinar los metabolitos presentes en las especies, mediante el uso de pruebas para la identificación química de grupos funcionales.
- Determinar la actividad antifúngica de los extractos sobre *Microsporum canis*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Tricophyton tonsurans*, *Tricophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*.
- Evaluar la actividad bactericida de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus pyogenes*.
- Obtención de extractos acuosos de las plantas en estudio que presenten actividad biológica.
- Determinar la actividad antioxidante de los extractos activos de las plantas, mediante la técnica de reducción del radical DPPH.
- Evaluar la toxicidad de los extractos activos de las plantas, mediante el bioensayo de *Artemia salina*.
- Evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos activos impregnados en formulaciones a base de biopolímeros sobre los microorganismos en estudio.
- Evaluar la conservación del efecto antimicrobiano de los extractos con mayor actividad, impregnados en formulaciones a base de biopolímeros y ensayados a diferentes condiciones de luz, temperatura y tiempo de exposición sobre los microorganismos de importancia médica.

7 MATERIAL Y METODOS

7.1 Equipo de laboratorio y Reactivos

7.1.1 Equipo de Laboratorio

- Agitador Vortex VWR Mixer
- Autoclave American Mod 25x-1
- Balanza analitica AND
- Balanza granataria digital AND
- Baño de Calentamiento Shel Lab
- Campana de extracción de humos Tecno Lab
- Campana de flujo laminar Lannoco
- Espectrofotometro UV visible
- Horno Shel Lab
- Incubadora con agitación Shel Lab
- Microscopio estereoscópico Leica
- Molino Industrial Thomoas-Wiley Scientific
- Plancha de calentamiento Thomas scientific
- Refrigerador

7.1.2 Reactivos

- 1,1-Difenil-2-picrihidrazil (DPPH) (Sigma- Aldrich)
- 2,4- Dinitrofenilhidracina
- Acetato de etilo (CTR)
- Acetona
- Ácido acético glacial (CTR)
- Ácido ascórbico (Sigma- Aldrich)
- Ácido clorhídrico (CTR)
- Ácido pícrico (CTR)
- Ácido sulfúrico (CTR)
- Agar Infusión cerebro-corazón (Oxoid microbiology products)
- Agar Papa Dextrosa (Bioxon)
- Agua bidestilada estéril
- Alfa naftol
- Dicromato de potasio
- Dimetil sulfoxido
- Gentamicina (Sigma- Aldrich)
- Hipoclorito de sodio
- Levadura de cerveza (Pronal Ultra)
- Limaduras de Magnesio
- Metanol (Sigma- Aldrich)
- Pululano (90%, Hayashibara Co., Okayama, Japón)
- Quitosan de concha de cangrejo acetilación al 85% Aldrich St. Louis, MO, EE.UU.)
- Sal de mar (Coralife Scientific Grad Marine Salt).
- Terbinafina (Sigma- Aldrich)

- Anhídrido acético
- Azul de metileno
- Benceno
- Tetracloruro de carbono
- Tween

7.1.3 Material Biológico

7.1.3.1 Material Vegetal

Pantas: *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora* (tallos, hojas, frutos y flor) colectadas en los límites territoriales de Monterrey, Nuevo León, México, los ejemplares fueron depositados en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

7.1.3.2 Cepas de Bacterias

Las cepas utilizadas fueron aislados clínicos conservadas en el cepario del Centro Regional de Control de enfermedades infecciosas del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

- *Serratia marcescens*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Enterobacter agglomerans*
- *Enterobacter cloacae*
- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis*
- *Streptococcus pyogenes*.

7.1.3.3 Cepas de Hongos

Las cepas utilizadas fueron aislados clínicos de hongos dermatofitos conservados en el cepario del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

- *Microsporum canis*
- *Tricophyton mentagrophytes*
- *Tricophyton tonsurans*
- *Tricophyton rubrum*
- *Epidermophyton floccosum*

7.1.3.4 *Artemia Salina*

Nauplios de *Artemia salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC), adquiridos en Pet Mart Co., USA.

7.2 Recolección de las plantas e identificación del material vegetal.

El material vegetal se recolectó en municipios del estado de Nuevo León, México. *Azadirachta indica* en zonas rurales de Monterrey, *Tecoma stans* en el municipio de Rayones, *Juglans regia* y *Magnolia grandiflora* en zonas rurales de Monterrey; durante el periodo de febrero a Julio del 2013.

7.3 Secado y molienda del material vegetal.

El material vegetal se secó a temperatura ambiente, colocándolo en mesas metálicas y con ventilador, posteriormente se trituró en un triturador industrial de nixtamal para fraccionarlo y ponerlo en una estufa a 40°C por 48h, ya seco se molió en un molino Industrial Thomoas-Wiley Scientific, para obtener un polvo de 0.5mm de tamaño de partícula (Navarro G.V.M. *et al.*, 2006).

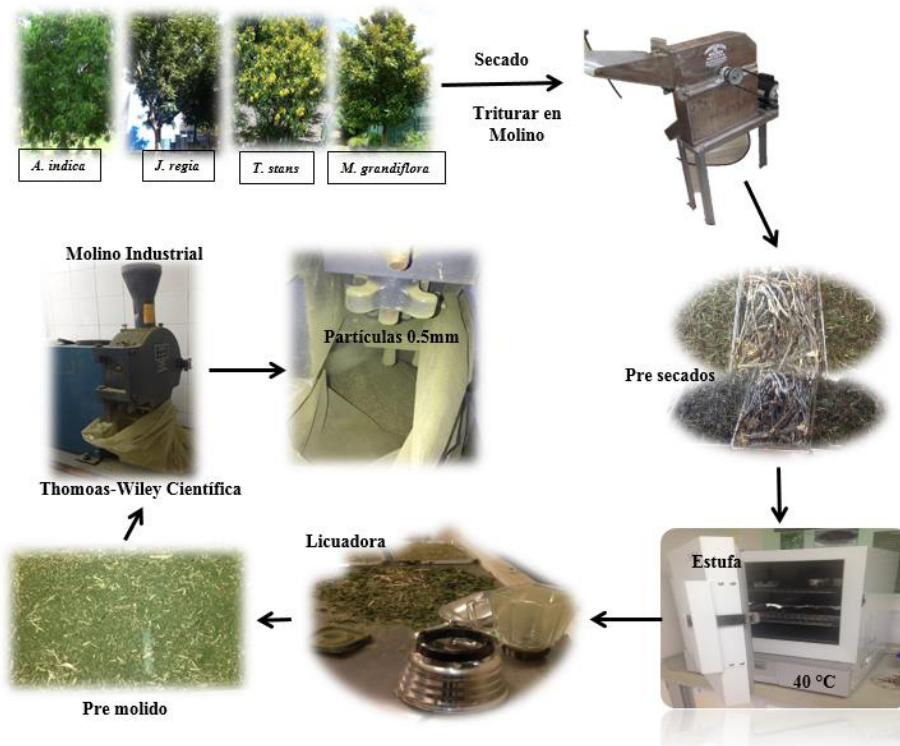


Figura 7. Diagrama de flujo del secado y molienda del material vegetal

7.4 Extracción del material Vegetal.

Las partes utilizadas del material vegetal fueron tallos, hojas, frutos y flor de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora*. Se pesaron 100 gramos de material vegetal seco y se adicionaron 500mL de alcohol metílico grado reactivo destilado, se dejó a temperatura ambiente por 72 horas, el macerado se filtró utilizando papel filtro de poro grueso repitiendo el proceso seis veces utilizando solvente nuevo en cada ocasión. El filtrado del macerado se concentró en un Rotovapor Buchii modelo 215 para separar el solvente, el extracto crudo se llevó a sequedad completa en estufa de aire caliente a temperatura menor a 50 C. El extracto seco se almacenó en refrigerador a 4°C en frasco ámbar hasta su utilización (Nostro A. *et al.*, 2000; Navarro G.V.M. *et al.*, 2006).



Figura 8. Pesado, maceración, filtrado y concentrado de material vegetal.

7.5 Métodos químicos de identificación, pruebas para grupos funcionales.

Para la determinación inicial de los compuestos presentes en los extractos se realizaron las pruebas químicas de identificación. Los extractos crudos se prepararon a 50 mg/mL disueltos en metanol. Se utilizaron placas de cerámica de 12 pozos (Rodríguez G. 2010, 2011, Kuklinski, 2000).

7.5.1 Insaturaciones

7.5.1.1 Prueba de KMnO_4

Se disolvieron de 1-2 mg de los extractos en 1 mL de agua, acetona o metanol y se le agregó gota a gota una solución de KMnO_4 al 2% en agua. La prueba es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café, resultado de la formación de dióxido de manganeso (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.5.2 Grupo Carbonilo

7.5.2.1 Prueba de la 2-4 Dinitrofenilhidracina

Una muestra de 1 a 10 mg del extracto se disolvió en etanol, se le añadió una solución saturada de 2-4 dinitrofenilhidracina en HCl 6N, la formación de un precipitado amarillo o naranja indica la presencia del grupo carbonilo (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.5.3 Oxidrilos fenólicos

7.5.3.1 Prueba de FeCl_3

Se disolvieron 1-2 mg del extracto en 1 mL de agua o etanol y después se le agregaron unas gotas de cloruro de hierro al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerado positivo (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.5.4 Esteroides y triterpenos

7.5.4.1 Prueba de Salkowski

Se disolvió el extracto (1-2 mg) en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico, se desarrollan colores amarillo o rojo para esteroides y metil esteroides (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.5.5 Carbohidratos

7.5.5.1 Prueba de Molish

A 1-2 mg del extracto, se le agregó gota a gota el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1 % en etanol), luego 1 mL de ácido sulfúrico por las paredes. La prueba es positiva cuando se forma un anillo coloreado en la interfase de color púrpura (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.5.5.2 Prueba de las Cumarinas

Se disolvió 1-2 mg del extracto se le agregó gota a gota el reactivo NaOH al 10 %, si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular la prueba es positiva (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.5.5.3 Prueba de Lactonas

Se disolvió de 1-2 mg del extracto se le agregó una solución alcohólica de NaOH al 10 %. Un color amarillo o anaranjado que se pierde o desaparece al agregar unas gotas de HCl indica la presencia de un anillo lactónico (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.5.6 Sesquiterpenlactonas

7.5.6.1 Prueba de Baljet

A 2-3 mg del extracto se le agregaron 3-4 gotas de la solución mezcla, siendo positiva si se torna de color naranja a roja oscura. La solución mezcla 1:1 consiste de una solución A que contiene: ácido pícrico al 1% en etanol y una B NaOH al 10 % (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.5.7 Flavonoides

7.5.7.1 Prueba de H₂SO₄

Una pequeña cantidad del extracto se disolvió en H₂SO₄ y se observa coloración amarilla para flavonoides, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.5.8 Alcaloides

7.5.8.1 Prueba de Dragendorff

Se usó la modificación de Munier y Machelobuf para la determinación de alcaloides. Para ello se prepararon dos soluciones, la solución “A” con 0.85 g de nitrato de bismuto, los cuales se mezclaron con 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua y Solución B con 8 g de yoduro de potasio disuelto en 20 mL de agua. El reactivo se preparó mezclando 5 mL de “A”, 4 mL de “B” y 100 mL de agua, la prueba es positiva si se presentan coloraciones rojo o naranja, persistentes por 24 h (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.5.9 Saponinas

7.5.9.1 Prueba de Bicarbonato de Sodio

La sal se preparó al 10 % en agua. Se disolvió de 1-2 mg del extracto disuelto en agua o etanol y se le agregaron de 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agitó ligeramente, luego se agregaron 2-3 gotas de la solución de bicarbonato de sodio. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 min indican la presencia de saponinas (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.5.9.2 Prueba de Salkowski para saponinas

Se disolvieron de 1-2 mg del extracto en 1 mL de cloroformo y se les añadió 1 mL de H₂SO₄. La prueba es positiva si hay aparición de color rojo (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.5.10 Aromaticidad

7.5.10.1 Prueba del ácido sulfúrico-formaldehído

Se preparó una mezcla de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado con una gota de formaldehído. Se agregó de 1-5 mg del extracto disuelto en un disolvente no aromático, se añadieron unas gotas de la mezcla anterior y si aparece un color rojo-violeta, la prueba es positiva (Rodríguez G. 2010, 2011).

7.6 Determinación de la actividad antifúngica

7.6.1 Cepas

Se utilizaron cepas de aislados clínicos de hongos dermatofitos *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Epidermophyton floccosum*. Proporcionados por el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina de la UANL.

7.6.1.1 Cultivo y activación de cepas

A partir de las cepas proporcionadas, se impregna un hisopo esteril y se hace un estriado en una placa con medio papa dextrosa (PDA), dejando reposar cerca de 20 min para la impregnación adecuada, sellándolo después con papel parafilm. Se incubaron a 30°C durante 7-12 días. Repitiendo la activación hasta que se obtuvo colonia característica de cada especie (Bastidas O, 2013; Nweze E.I *et al* 2010).

7.6.1.2 Identificación y/o confirmación de especies

Para la confirmación de la especie, se realizó una comparación observando las colonias, con las características macroscópicas de las colonias establecidas en la referencia (Bonifaz A., 2012). Se realizó la técnica de cintilla para confirmar las estructuras microscópicas establecidas por la referencia antes dicha. Con cinta scotch por el lado del pegamento se presiona contra el micelio de la placa y se coloca en un portaobjetos con una gota con azul de lactofenol, se observa en un microscopio a 10X y 40X. Este mismo procedimiento se utilizó para descartar contaminación con otras especies como se muestra en la figura 9.



Figura 9. Técnica de cintilla

7.6.2 Estandarización de inóculos

A partir de las cepas aisladas e identificadas, se procedió a crear una masa de conidias, resemebrando en medio PDA por triplicado, incubando a las condiciones ya descritas. Se realizó la cosecha de conidias colocando en cada placa, con una pipeta Pasteur, cerca de 10 mL de agua estéril raspando el micelio posteriormente, formándose una solución que contiene estructuras de la especie en estudio, la cual se colocó en un tubo cónico falcón. Se realizó el conteo de conidias por la técnica de Conteo Celular con la Cámara de Neubauer, llevando la solución a una concentración de 1×10^6 conidias, la cual se utilizó como inóculo para el ensayo (Bastidas O, 2013; Nweze E.I *et al* 2010).

7.6.3 Preparación de los extractos

Se pesó el equivalente a 50, 25, 12.5, 6.25 mg de cada uno de los extractos metanólicos y se disolvieron en 1 mL de metanol. Cada disco de papel Whatman N° 1 (Whatman International Ltd., England) estéril, de 7 mm de diámetro, se cargaron con 20µL de solución correspondiente (carga final por disco 1 mg, 0.50mg, 0.25mg, 0.125mg respectivamente).

7.6.4 Estandarización de control positivo

A partir de una solución stock de Terbinafina de 1 mg/mL, proporcionada por el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina de la UANL realizada a partir de Terbinafine hydrochloride de Sigma. T8826-250mg Lot #040M 1448 v, se realizó una solución de 1µg/mL la cual se usó como concentración para el control positivo. Para la estandarización del volumen que se utilizó en la impregnación de los discos del ensayo, se corrió el método de difusión en placa, por triplicado, utilizando las siguientes variantes: discos de papel Whatman N° 1 (Whatman International Ltd., England) de 7mm, estériles, cargados con 5µL, 10µL, 15µL, 20µL con el control positivo, se utilizó como inóculo una solución de conidias a una concentración de 1×10^6 conidias / mL de cada especie de los dermatofitos trabajados en la investigación, incubándolos a 30°C durante 7-12 días (Nweze E.I *et al* 2010)

7.6.5 Método difusión en placa

Se difundió homogéneamente en cada caja Petri con medio PDA, 100 µL del inóculo correspondiente a una solución de concentración de 1×10^6 conidias/mL de cada especie de hongo dermatofito en estudio, dejando reposar 15 min., posteriormente se colocaron discos de papel filtro impregnados con 20 µL de los extractos a concentraciones de 50, 25, 12.5, 6.25 mg/mL. Como control negativo se utilizaron 20 µL del solvente empleado para disolver el extracto y 20 µL de Terbinafina a una concentración de 1µg/mL como control positivo (figura 10). Se incubaron durante 7-12 días a 30 °C, después de este período se midió el diámetro en milímetros del halo de inhibición formado. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes (Nweze E.I *et al* 2010).

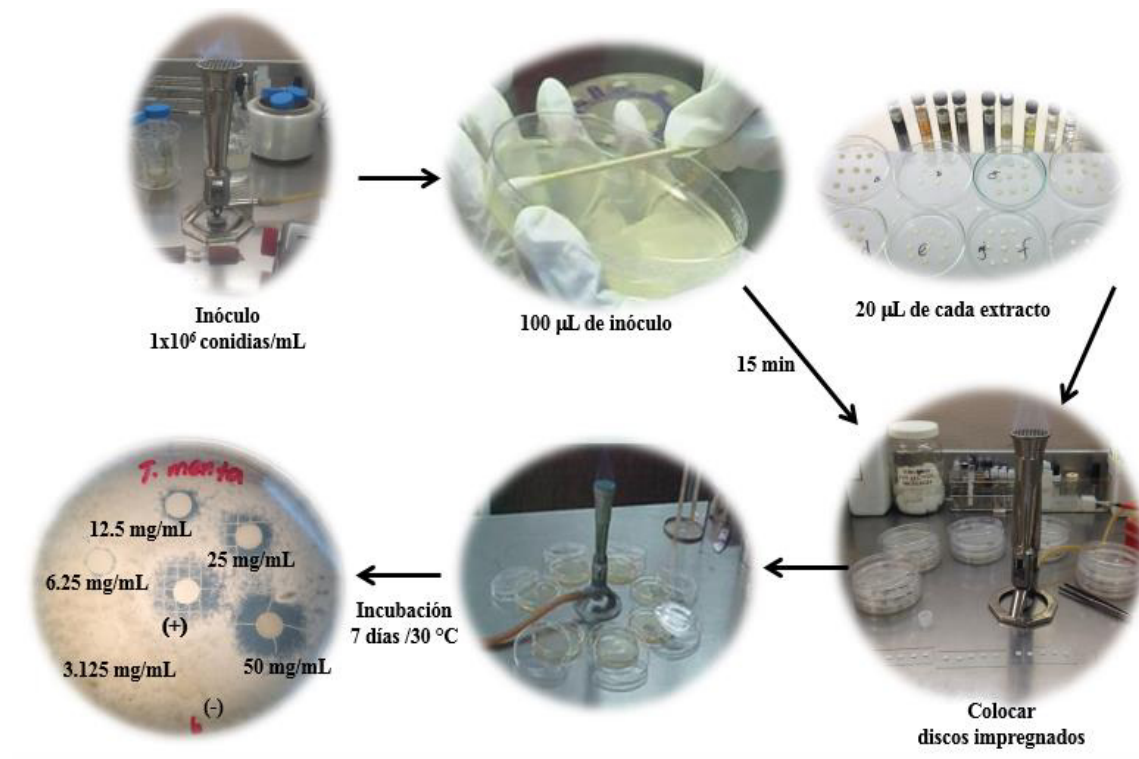


Figura 10. Diagrama de flujo para la determinación para la actividad antifúngica

7.7 Determinación de la actividad antibacteriana

7.7.1 Cepas

Serratia marcescens, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus pyogenes* cepas de aislados clínicos conservadas en el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas del departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

7.7.1.1 Activación de bacterias

A partir de las cepas bacterianas previamente identificadas, se adicionó una asada a cada tubo de ensayo con 10 mL medio de cultivo ICC (infusión cerebro corazón) el cual se preparó disolviendo 37 g de polvo de medio en un litro de agua destilada poniéndolo a

ebullición hasta disolución total y colocándolo en autoclave para esterilización a 121°C por 15 minutos; posteriormente los tubos inoculados de incubaron durante 24 h a 37 °C, este proceso se repitió 3 ocasiones (Ramírez y Castaño 2009).

7.7.1.2 Cinética de crecimiento bacteriana

Se realizó para determinar el tiempo de incubación necesario para lograr que la suspensión bacteriana tuviera una concentración de 0.5% en la escala de Mcfarland, lo que representa 0.1 de absorbancia a 625 nm (1×10^6 UFC) según lo indica el McFarland Standard (Mcfarland 1907). Colocando 50 mL en matraces Erlen Meyer de 250 mL del medio utilizado y 100 μ L de cada cepa bacteriana activa en estudio, se colocaron en una incubadora con agitación y se tomó una alícuota de 2 mL cada hora para ir leyendo su absorbancia para construir la gráfica de crecimiento bacteriano como se muestra en la figura 11 (Ramírez y Castaño 2009).

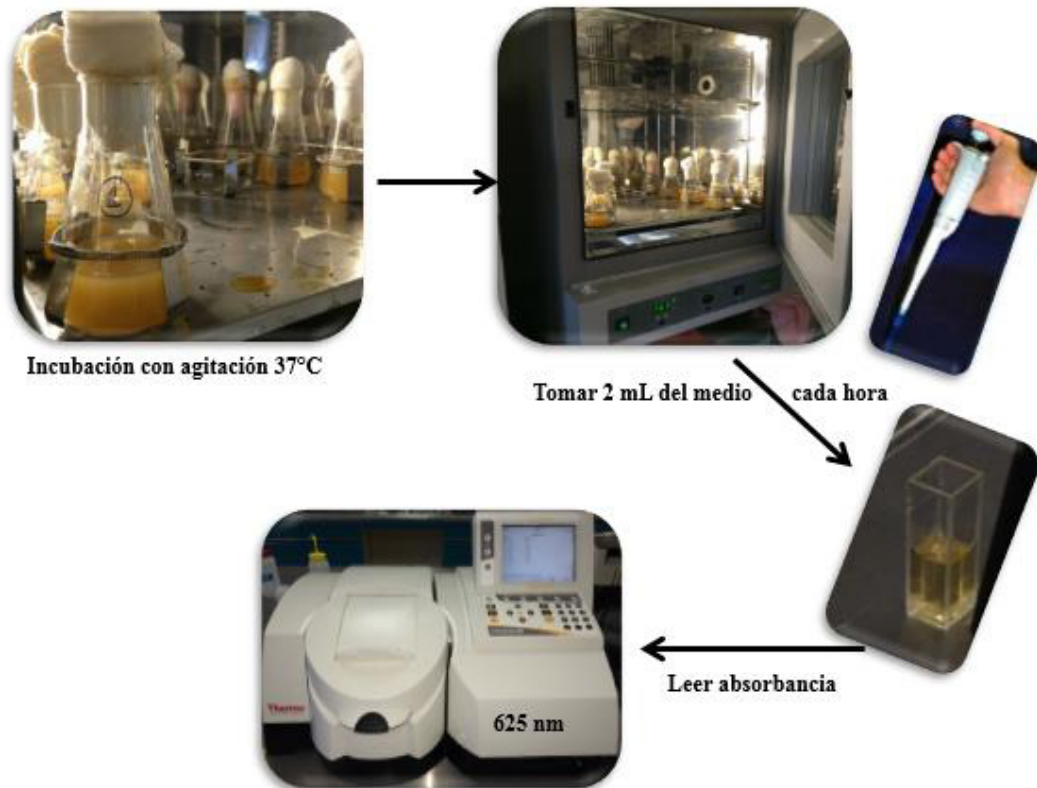


Figura 11. Diagrama de flujo de cinética de crecimiento bacteriana

7.7.2 Método difusión en placa

Las pruebas microbiológicas se realizaron mediante el método de difusión en placa colocando 100 μL de cada uno de los extractos obtenidos, los cuales se prepararon a una concentración de 100 mg/mL en metanol absoluto en discos de 7 mm de diámetro de papel filtro Whatman No. 1 sobre una placa sólida de medio ICC, previamente inoculada con 100 μL de una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC. Como control negativo se utilizó 100 μL del solvente empleado para disolver el extracto y 100 μL de gentamicina a una concentración de 80 mg/mL como control positivo. Las placas se incubaron a 37°C por 24 h; después de este período se midieron los halos de inhibición en milímetros como se muestra en la figura 12 (Rodríguez G. 2010).

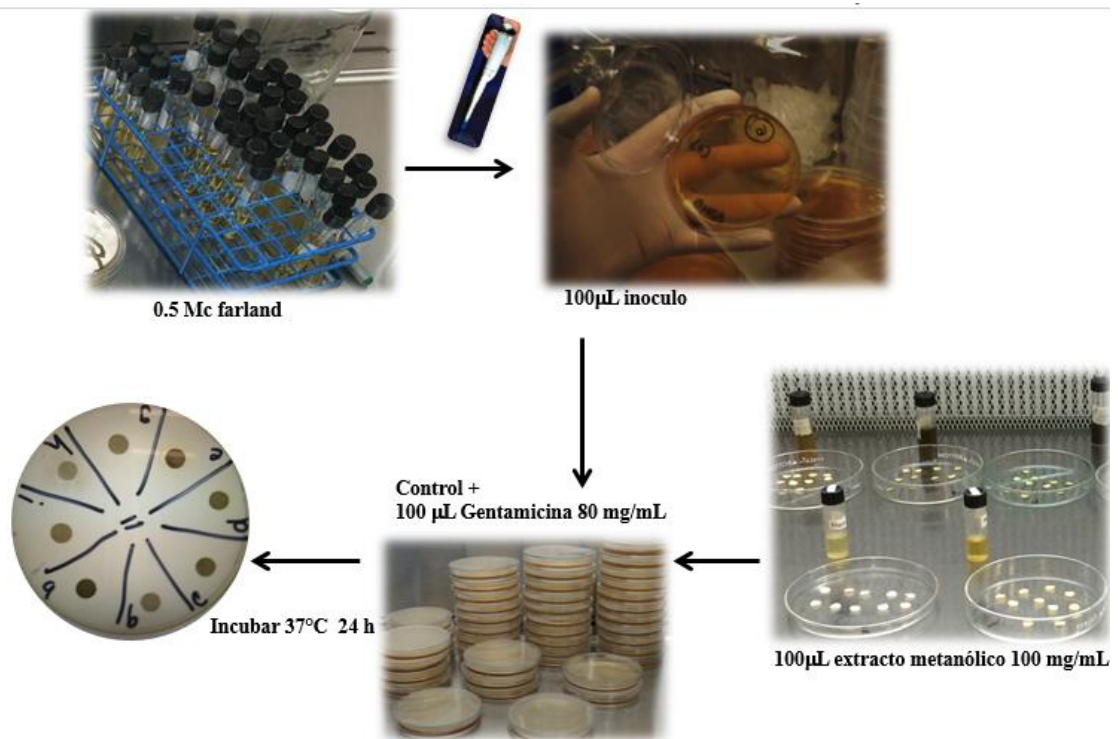


Figura 12. Diagrama de flujo para la determinación de actividad antibacteriana

7.8 Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*.

Con los extractos obtenidos se realizó en bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*.

7.8.1 Incubación de *A. salina*

Se incubaron huevecillos de *A. salina* en agua de mar artificial, preparada con 40 g de sal de mar (Coralife Scientific Grad Marine Salt) y 0.0006g de levadura de cerveza (Pronal Ultra) en un litro de agua destilada. El agua de mar se vertió en un depósito de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm; en un compartimento se colocaron los huevecillos y se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación y en el otro compartimento se expuso a luz con una lámpara de 20 watts y al eclosionar los nauplios son atraídos al compartimento expuesto a la luz. A las 24 horas los nauplios fueron pasados a otro recipiente y mantenidos a condiciones de oxigenación y temperatura de 22 a 29 °C durante 24 horas más (Sánchez 2005; Gutu 2015; Rodríguez G. 2010).

7.8.2 Preparación de las concentraciones

Los extractos se disolvieron en agua salada, se probaron concentraciones 500, 240, 120, 100, 80, y 60 µg/mL.

7.8.3 Determinación de la dosis letal media

En cada ensayo, se añadieron 10 nauplios para probar soluciones a diferentes concentraciones de los extractos y controles. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio 400 ppm y agua de mar como control negativo. Los ensayos fueron mantenidos bajo iluminación artificial durante 24 horas a 27 ± 2 °C. Transcurrido el tiempo se contaron las larvas vivas y muertas, para cada concentración probada y por el método estadístico probit se determinaron las CL₅₀. Cada concentración se ensayó por triplicado y se realizaron tres experimentos independientes como se muestra en la figura 13 (Sánchez 2005; Gutu 2015; Rodríguez G. 2010).

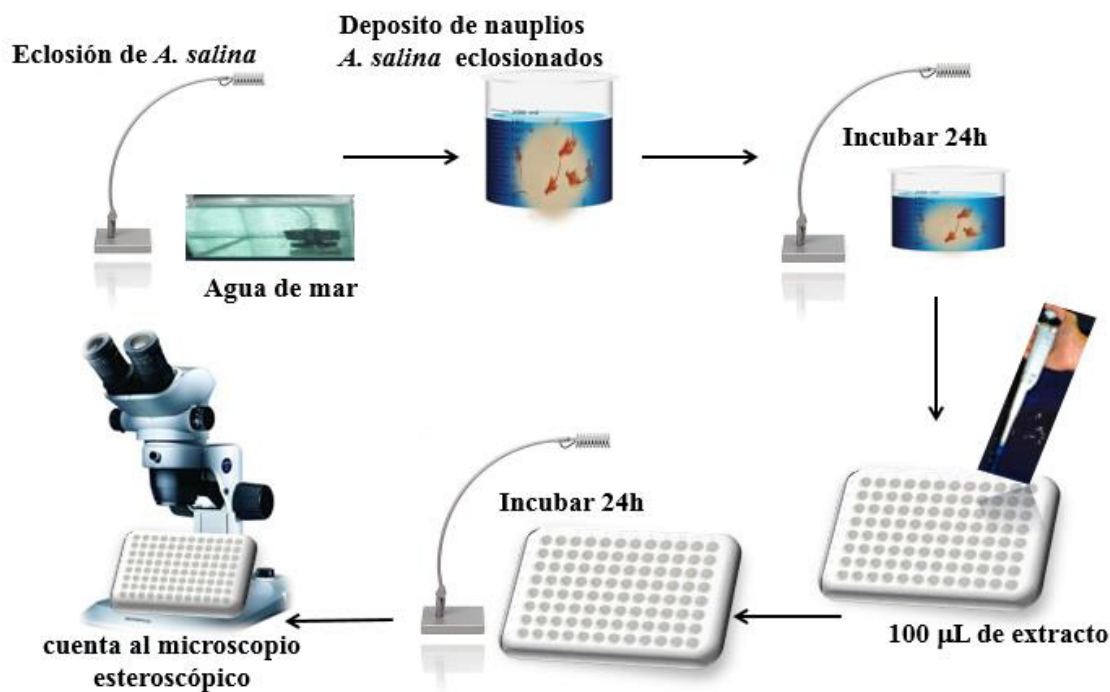


Figura 13. Diagrama de flujo para el bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *A. salina*

7.9 Determinación de la actividad anti radical de los extractos.

Con los extractos obtenidos se realizó la prueba de determinación de la actividad anti radical por el método DPPH (García et al 2012), el cual reduce el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo en la 2,2-difenil-1-picril hidracina por la acción antioxidante de compuestos que contienen grupos $-OH$ decolorando el reactivo DPPH medida por absorbancia a 519 nm transcurridos 30 minutos después de su exposición, en un espectrofotómetro Spectronic Génesis 5. Se utilizó Vitamina C como control positivo. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes como se muestra en la figura 14.

7.9.1 Preparación del estándar y extractos metanólicos

Para desarrollar el método se preparó la concentración inicial de DPPH 4 mg/100 mL de metanol y los extractos a 50 mg/mL de metanol

7.9.2 Reacción de neutralización del radical DPPH cuantificación de la actividad antioxidante.

Se pusieron en contacto diferentes volúmenes de los extractos (2 a 12 μ L) con la solución stock de DPPH en una celda por 30 min y se midió su absorbancia, para posteriormente calcular el porcentaje de inhibición y determinar la concentración inhibitoria media (CI_{50}).

Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de inhibición del radical DPPH causado por los extractos metanólicos.

$$\% \text{ Inhibición} = (\text{Abs. inicial} - \text{Abs. Final} / \text{Abs. Final}) 100$$

Donde: % inhibición: porcentaje de inhibición de la solución de DPPH al estar en contacto con el extracto evaluado después de 30 min. Abs. Inicial: absorbancia a 519 nm de la solución de DPPH antes de estar en contacto con el extracto evaluado. Abs. Final: absorbancia a 519 nm de la solución de DPPH al estar en contacto con el extracto evaluado después de 30 min.

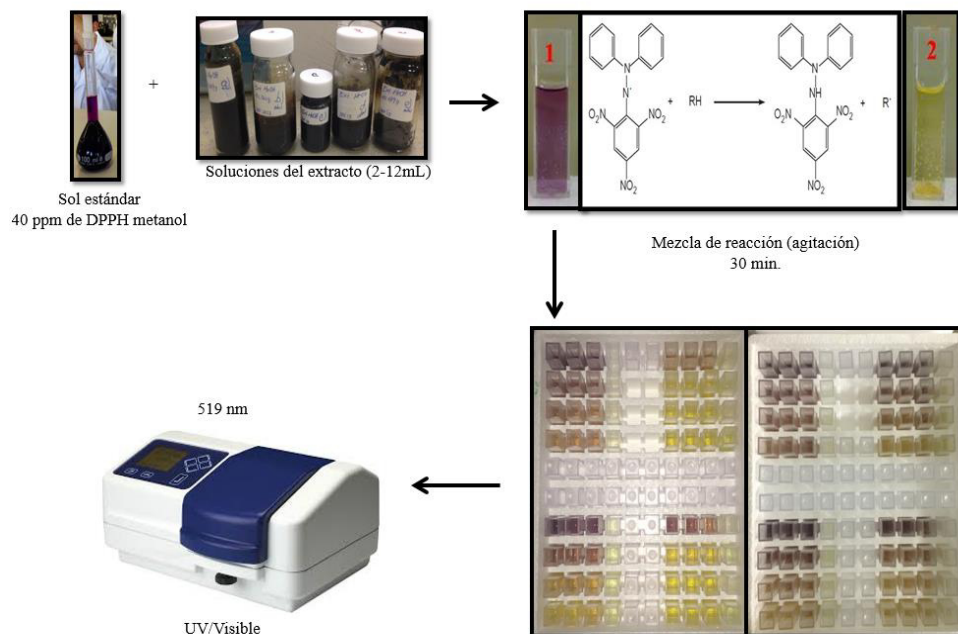


Figura 14. Diagrama de flujo para la determinación de actividad anti radical

7.10 Actividad antifúngica de formulado de biopolímeros con extractos activos

Se seleccionaron los extractos que presentaron mejor actividad antimicrobiana (extracto metanólico de “hoja y tallo” (HT), “flor y fruto” (FF) y “hoja, tallo, flor y fruto” (HTFF) de *Magnolia grandiflora* sobre todas las cepas de dermatofitos del estudio, para realizar un formulado de biopolímeros-extracto y evaluar su actividad sobre las cepas en las que el extracto mostró actividad inhibitoria.

7.10.1 Preparado del formulado de biopolímeros y extractos activos

Se mezcló una concentración de 50 mg/mL del extracto con una formulación de biopolímeros (quitosan-pululano), previamente elaborada de acuerdo a la metodología desarrollada Treviño G.M *et al* 2015 utilizada como vehículo hasta lograr una mezcla homogénea, dicho formulado se encuentra bajo solicitud de patente MX/a/2013/007610: “Formulados a base de biopolímeros y residuos agroindustriales y su uso como recubrimientos comestibles.

Para obtener el control positivo se mezcló por la misma metodología el formulado de biopolímeros y terbinafina a una concentración de 1µg/mL y como control negativo se utilizó solo el formulado de biopolímeros como se muestra en la figura 15.

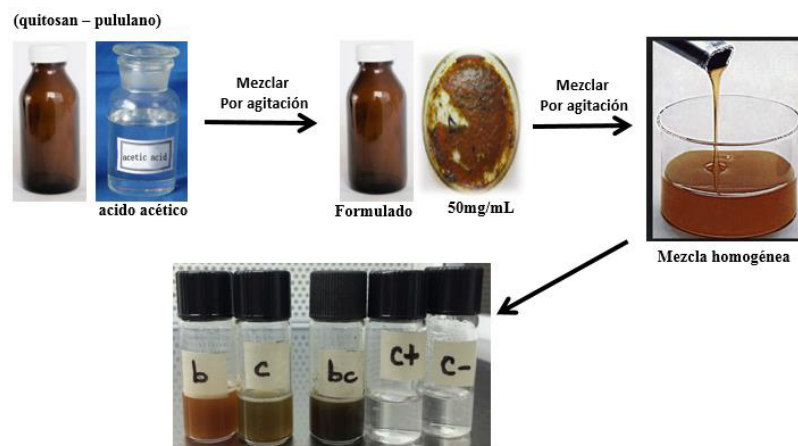


Figura 15. Preparado del formulado de biopolímeros y extractos activos

7.10.2 Determinación de la actividad antifúngica de los formulados – extracto

La determinación se realizó por el método de difusión en placa (Nweze E.I *et al* 2010), difundiendo homogéneamente en cada caja Petri con medio papa dextrosa, 100 μ L del inóculo correspondiente a una concentración de 1×10^6 conidias/mL de cada especie de hongo dermatofito en estudio, dejando reposar 15 minutos, posteriormente se colocaron discos de papel filtro impregnados con 20 μ L de formulado de biopolímeros-extracto de mayor actividad (FF), control positivo (formulado de biopolímero – terbinafina) y control negativo (formulado biopolímeros). Se incubaron durante 7-12 días a 30 °C, después de este período se midió el diámetro en milímetros del halo de inhibición formado. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes como se muestra en la figura 16.

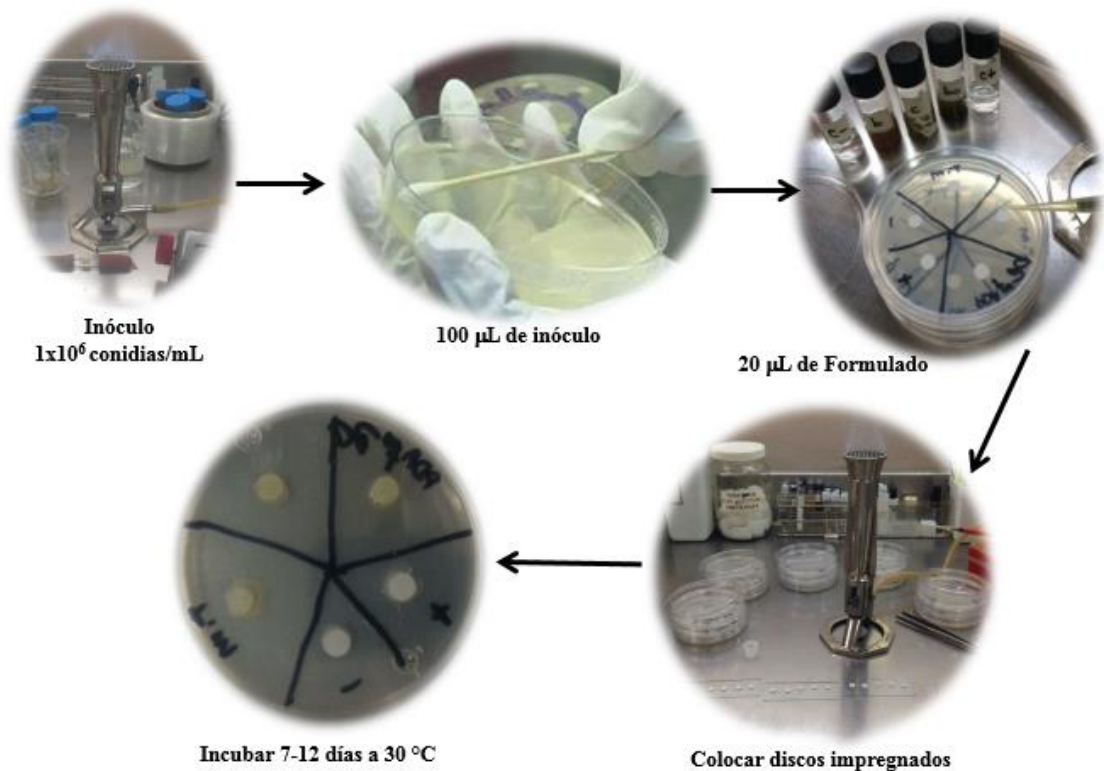


Figura 16. Diagrama de flujo de la determinación de la actividad antifúngica de los formulados de biopolímeros impregnados con extracto

7.10.3 Determinación de la actividad antifúngica de los formulados – extractos a diferentes condiciones de almacenaje

El formulado de biopolímeros - extracto metanólico de “flor y fruto” de *Magnolia grandiflora* se evaluó por el método ya descrito sometiendo el formulado a diferentes condiciones de conservación de tiempo en días (0, 7, 14, 21, 28), temperatura (refrigeración: 4°C y ambiente 25°C), luz y oscuridad. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes para cada combinación de condiciones como lo muestra la tabla .

Tabla I. Planeación de ensayos de determinación de la actividad antifúngica de los formulados –extracto activo a diferentes condiciones de conservación

Hongo	luz						oscuridad					
	4°C			25°C			4°C			25°C		
	F B E	F B T	F B E	F B E	F B T	F B E	F B E	F B T	F B E	F B T	F B E	
<i>M. canis</i>	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	
<i>T. mentagrophytes</i>	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	
<i>T. tonsurans</i>	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	
<i>T. rubrum</i>	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	
<i>E. floccosum</i>	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	0, 7, 14, 21, 28	
tiempo	días											
Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE: Formulado de biopolímeros con extracto, FBT: Formulado de biopolímeros con terbinafina (control positivo), FB: Formulado de biopolímeros (control negativo)												

7.11 Análisis estadístico

7.11.1 Análisis Probit

La media o promedio de las concentraciones a las cuales se observó la actividad biológica (efecto tóxico, actividad antifúngica, y secuestro de radicales DPPH), se sometieron a un análisis de varianza ANOVA (una vía) y test de Tukey (Tukey Honestly Significant Difference, HDS) para el estudio comparativo de sus medias. Se tomó como diferencia significancia un $p < 0.05$.

8 RESULTADOS

8.1 Recolección de plantas e identificación del material vegetal.

Los ejemplares secos y en una prensa botánica, fueron entregados al Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas para su depósito e identificación, Extendiendo el N° de registro correspondiente para las especies: *Azadirachta indica* # 027501 *Juglans regia* # 027502, *Tecoma stans* # 027503 y *Magnolia grandiflora* # 027506.

8.2 Obtención y Rendimiento de los extractos a partir de material vegetal

Se obtuvieron cinco extractos metanólicos en total como se muestra en la figura 17. Los rendimientos de los extractos se presentan en la tabla II, se encontró que el extracto con mayor rendimiento fue el extracto metanólico de parte aérea de *Azadirachta indica* 42.21%, los rendimientos fueron obtenidos a partir del material seco y se obtuvieron por diferencia de pesos del extracto.



Figura 17. Obtención de extractos metanólicos.

Tabla II. Porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos

Espece vegetal	Rendimiento extracto metanólico %
<i>Azadirachta indica</i> (hojas, tallos, flor y fruto)	42.21
<i>Magnolia grandiflora</i> (hojas y tallo)	27.15
<i>Magnolia grandiflora</i> (flor y fruto)	30.20
<i>Tecoma stans</i> (hojas, tallos, flor y fruto)	35.30
<i>Juglans regia</i>	16.36

(hojas, tallos, flor y fruto)

8.3 Determinación de grupos funcionales y metabolitos secundarios

En la tabla III se muestran los resultados de las pruebas químicas para grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de las especies en estudio. Se encontró la presencia de insaturaciones, grupos carbonilo, oxidrilos fenólicos, carbohidratos, esteroides y triterpenos, cumarinas, saponinas, flavonoides y grupos aromáticos en todas las especies en estudio. Las pruebas para alcaloides fueron positivas solo para *Magnolia grandiflora*, *Tecoma stans* y *Juglans regia*.

Tabla III. Identificación de grupos funcionales y metabolitos secundarios en los extractos metanólicos

PRUEBAS QUÍMICAS	Extractos metanólicos				
	<i>Azadirachta indica</i>	<i>Magnolia grandiflora</i>		<i>Tecoma stans</i>	<i>Juglans regia</i>
	AI	MGFF	MGHT	TS	JR
KMnO ₄ (Insaturaciones)	+	+	+	+	+
2,4-Dinitrofenilhidracina (Carbonilo)	+	+	+	+	+
FeCl ₃ (Oxidrilos fenólicos)	+	+	+	+	+
Salkowski (Esteroides y Metilesteroides)	+	+	+	+	+
NaOH al 10% (Cumarinas)	+	+	+	+	+
Sol'n alcohólica NaOH al 10% (Lactonas)	+	+	+	+	+
Baljet (Sesquiterpenlactonas)	-	-	-	-	-
H ₂ SO ₄ (Flavonoides)	-	+	+	+	+
Dragendorff (Alcaloides)	-	+	+	+	+
Bicarbonato de Sodio (Saponinas)	-	-	-	-	-
Salkowski para (Saponinas)	+	+	+	+	+
H ₂ SO ₄ – Formaldehído (Aromaticidad)	+	+	+	+	+

AI= *Azadirachta indica* (hojas, tallos, flor y fruto) extracto metanólico, **MGFF=** *Magnolia grandiflora* (flor y fruto) extracto metanólico, **MGHT=** *Magnolia grandiflora* (hoja y tallo) extracto metanólico, **TS=** *Tecoma stans* (hojas, tallos, flor y fruto) extracto metanólico **JR=** *Juglans regia* (hojas, tallos, flor y fruto) extracto metanólico.

8.4 Actividad antifúngica

8.4.1 Actividad antifúngica de los extractos de las plantas en estudio

En la tabla IV se observan los resultados de la actividad antifúngica de los extractos metanólicos (flor, fruto, hoja y tallo) de las plantas en estudio a una concentración de 100 mg/mL sobre las cepas de aislados clínicos de dermatofitos, el extracto que presentó actividad antifúngica fue el de *M. grandiflora* sobre todas las cepas. Como control negativo se utilizó metanol y como control positivo terbinafina.

Tabla IV. Actividad antifúngica del extracto metanólico (flor, fruto, hoja y tallo) de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora* en medio PDA

Hongo	20 µL Extracto metanólico (100 mg/mL)				Controles	
	<i>A. indica</i>	<i>J. regia</i>	<i>T. stans</i>	<i>M. grandiflora</i>	Terbinafina (+) 1 µg/mL	Metanol (-)
<i>M. canis</i>	-	-	-	18.23	37.12	-
<i>T. mentagrophytes</i>	-	-	-	15.42	42.31	-
<i>T. tonsurans</i>	-	-	-	15.33	38.02	-
<i>T. rubrum</i>	-	-	-	17.11	40.23	-
<i>E. floccosum</i>	-	-	-	19.09	39.19	-

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. $p < 0.5$

A partir de los resultados se decide probar las diferentes partes: flor y fruto (FF), hoja y tallo (HT) y flor, fruto hoja y tallo (FFHT) de *M. grandiflora* a diferentes concentraciones de los extractos sobre las mismas cepas, resultados que se muestran en la tabla V, VI y VII, mostrando mayor actividad el extracto de flor y fruto, como control negativo se utilizó metanol y como control positivo terbinafina. Los halos fueron medidos en milímetros figura 18.

Tabla V. Actividad antifúngica del extracto metanólico (flor, fruto, hoja y tallo) de *Magnolia grandiflora* en medio PDA

Hongo	20 µL Extracto metanólico (mg/mL)						Controles 20 µL	
	100	50	25	12.5	6.25	3.13	Terbinafina (+) 1 µg/mL	Metanol (-)
<i>M. canis</i>	18.23	17.22	12.66	9.82	7.71	-	37.12	-
<i>T. mentagrophytes</i>	15.42	12.22	11.55	9.07	7.11	-	42.31	-
<i>T. tonsurans</i>	15.33	12.34	10.68	8.55	7.02	-	38.02	-
<i>T. rubrum</i>	17.11	13.33	10.44	9.56	7.92	-	40.23	-
<i>E. floccosum</i>	19.09	16.35	14.62	11.23	9.48	7.02	39.19	-

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. p < 0.5

Tabla VI. Actividad antifúngica del extracto metanólico (hoja y tallo) de *Magnolia grandiflora* en medio PDA

Hongo	20 µL Extracto metanólico (mg/mL)						Controles 20 µL	
	100	50	25	12.5	6.25	3.13	Terbinafina (+) 1 µg/mL	Metanol (-)
<i>M. canis</i>	14.34	12.67	9.58	7.12	-	-	37.12	-
<i>T. mentagrophytes</i>	11.22	9.29	8.14	7.06	-	-	42.31	-
<i>T. tonsurans</i>	12.40	10.02	9.34	7.00	-	-	38.02	-
<i>T. rubrum</i>	12.43	9.65	8.09	7.11	-	-	40.23	-
<i>E. floccosum</i>	12.34	10.47	8.35	7.07	-	-	39.19	-

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. p < 0.5

Tabla VII. Actividad antifúngica del extracto metanólico (flor y fruto) de *Magnolia grandiflora* en medio PDA

Hongo	20 µL Extracto metanólico (mg/mL)						Controles 20 µL	
	100	50	25	12.5	6.25	3.13	Terbinafina (+) 1 µg/mL	Metanol (-)
<i>M. canis</i>	19.22	17.35	14.89	12.54	10.02	9.02	37.12	-
<i>T. mentagrophytes</i>	20.31	16.65	15.83	10.82	8.54	7.98	42.31	-
<i>T. tonsurans</i>	15.87	13.88	11.98	9.38	8.18	7.99	38.02	-
<i>T. rubrum</i>	20.01	18.62	16.72	11.88	10.39	8.20	40.23	-
<i>E. floccosum</i>	21.54	19.62	16.88	13.24	9.82	8.44	39.19	-

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. p < 0.5

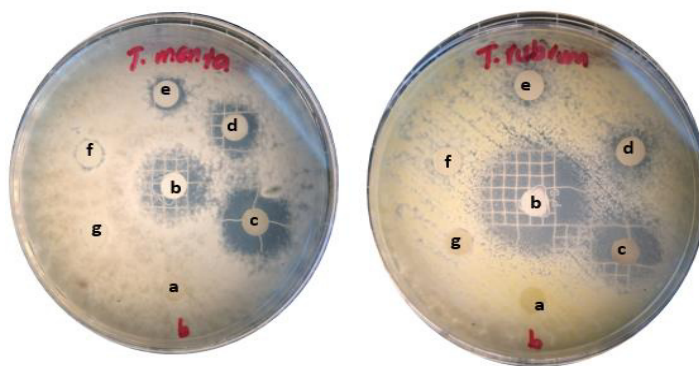


Figura 18. Actividad antifúngica de los extractos metanólico de flor y fruto a 50 mg/mL (c), 25 mg/mL (d), 12.5 mg/mL (e), 6.25 mg/mL (f), 3.125 mg/mL (g) de *M. grandiflora* sobre *T. rubrum* y *T. mentagrophytes*. Como control negativo metanol (a) y control positivo Terbinafina (b).

La tabla VIII presenta la actividad antifúngica de los extractos metanólicos de las tres partes (FFHT, FF, HT) de *M. grandiflora* a 50mg/mL sobre todas las especies de dermatofitos en estudio, siendo la (FF) la parte con mayor actividad, la cual se utilizó para los siguientes estudios.

Tabla VIII. Actividad antifúngica del extracto metanólico de las partes de <i>Magnolia grandiflora</i> en medio PDA					
Hongo	20 μ L Extracto metanólico (50 mg/mL)			Controles 20 μ L	
	FFHT	FF	HT	Terbinafina (+) 1 μ g/mL	Metanol (-)
<i>M. canis</i>	17.22	17.35	12.67	37.12	–
<i>T. mentagrophytes</i>	12.22	16.65	9.29	42.31	–
<i>T. tonsurans</i>	12.34	13.88	10.02	38.02	–
<i>T. rubrum</i>	13.33	18.62	9.65	40.23	–
<i>E. floccosum</i>	16.35	19.62	10.47	39.19	–

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (–) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FFHT= flor y fruto, FF= flor y fruto y HT=hoja y tallo. p < 0.5

8.4.2 Actividad antifúngica de formulado de biopolímeros con extractos activos

En base a los resultados se procedió a utilizar un formulado de biopolímeros (quitosan – pululano). El formulado de biopolímeros (FB) es el control negativo, el formulado de biopolímeros impregnado con terbinafina 1 μ g/mL (FBT) es el control positivo y el formulado de biopolímeros impregnado con 50 mg/mL de extracto metanólico de flor y

fruto de *M. grandiflora* (FBE) que fue el de mejor actividad. Se determinó la actividad antifúngica sobre todas las especies de cepas de aislados clínicos de dermatofitos. La tabla IX muestra los resultados del control negativo (formulado de biopolímeros) en contraste con el metanol. Los halos fueron medidos en milímetros figura 19.

Tabla IX. Comparativo de actividad antifúngica de metanol destilado contra formulado de biopolímeros					
Hongo	Formulado de biopolímeros (µL)				Metanol (-)
	5	10	15	20	
<i>M. canis</i>	7.11	8.2	11.23	12.32	—
<i>T. mentagrophytes</i>	7.01	8.34	11.45	12.45	—
<i>T. tonsurans</i>	7.91	8.54	9.11	11.56	—
<i>T. rubrum</i>	7.8	10.76	11.36	12.1	—
<i>E. floccosum</i>	7.34	11.23	12.98	13.21	—

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. p < 0.5

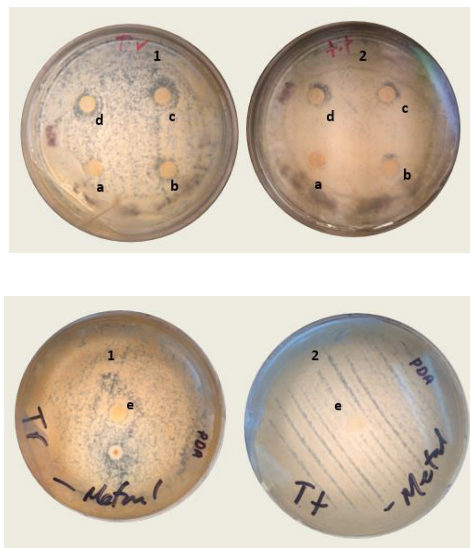


Figura 19. Actividad antifúngica en milímetros del formulado de biopolímeros (quitosan y pululano) 5µl (a), 10µl (a), 15µl (a), 20µl (a), sobre *T. rubrum* (1) y *T. tonsurans* (2) y actividad antifúngica en milímetros de metanol 20µl (e).

La tabla X muestra los resultados del control positivo (formulado de biopolímeros-terbinafina) comparado con los de solo terbinafina. Los halos fueron medidos en milímetros figura 20.

Tabla X. Comparativo de actividad antifúngica de terbinafina (1 $\mu\text{g/mL}$) con formulado de biopolímeros impregnado con terbinafina (1 $\mu\text{g/mL}$)		
Hongo	Terbinafina /formulado	Terbinafina
<i>M. canis</i>	38.23	37.12
<i>T. mentagrophytes</i>	44.87	42.31
<i>T. tonsurans</i>	41.54	38.02
<i>T. rubrum</i>	42.63	40.23
<i>E. floccosum</i>	44.32	39.19

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. $p < 0.5$

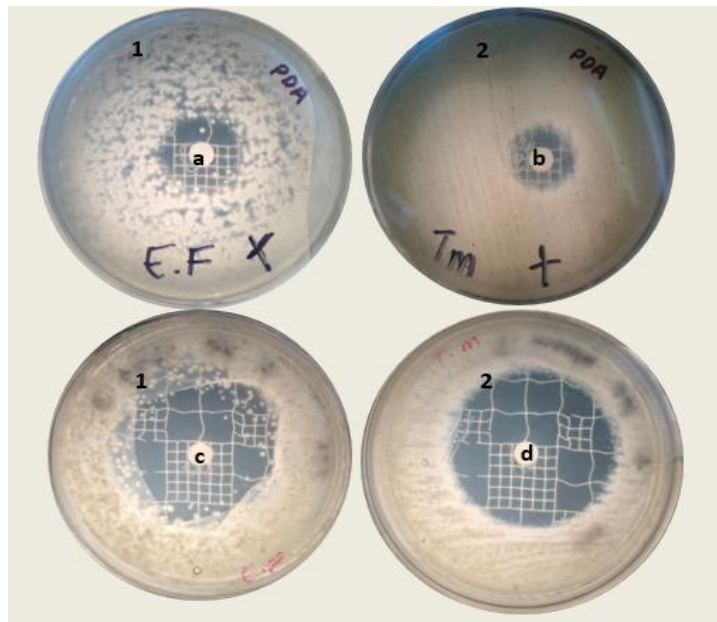


Figura 20. Actividad antifúngica en milímetros de terbinafina 20 μl (a) y (b) sobre *E. floccosum* (1) y *T. mentagrophytes* (2) y Actividad antifúngica en milímetros de formulado de biopolímeros-terbinafina 20 μl (c) y (d) sobre *E. floccosum* (1) y *T. mentagrophytes* (2).

La tabla XI muestra la actividad antifúngica de FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina y FB= formulado de biopolímeros. Los halos fueron medidos en milímetros figura 21.

Tabla XI. Actividad antifúngica del extracto metanólico de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado en formulado de biopolímeros en medio PDA			
Hongo	20 μ L	Controles 20 μ L	
	FBE	FBT (+)	FB (-)
<i>M. canis</i>	21.2	38.23	12.32
<i>T. mentagrophytes</i>	17.4	44.87	12.45
<i>T. tonsurans</i>	16.78	41.54	11.56
<i>T. rubrum</i>	19.34	42.63	12.1
<i>E. floccosum</i>	20.45	44.32	13.21

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina y FB= formulado de biopolímeros. p < 0.5



Figura 21. Actividad antifúngica de 20 μ L del extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* impregnado en formulado de biopolímeros en medio PDA sobre *T. tonsurans* (1) , *T. rubrum* (2) y *M. canis* (3).

La tabla XII muestra la actividad antifúngica del EM= extracto metanólico activo, FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina y FB= formulado de biopolímeros, siendo mayor el FBE. Los halos fueron medidos en milímetros figura 22.

Hongo	20 μ L		Controles 20 μ L	
	EM	FBE	FBT (+)	FB (-)
<i>M. canis</i>	17.35	21.2	38.23	12.32
<i>T. mentagrophytes</i>	16.65	17.40	44.87	12.45
<i>T. tonsurans</i>	13.88	16.78	41.54	11.56
<i>T. rubrum</i>	18.62	19.34	42.63	12.1
<i>E. floccosum</i>	19.62	20.45	44.32	13.21

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina, FB= formulado de biopolímeros y EM= extracto metanólico de flor y fruto de *M. grandiflora*. p < 0.5

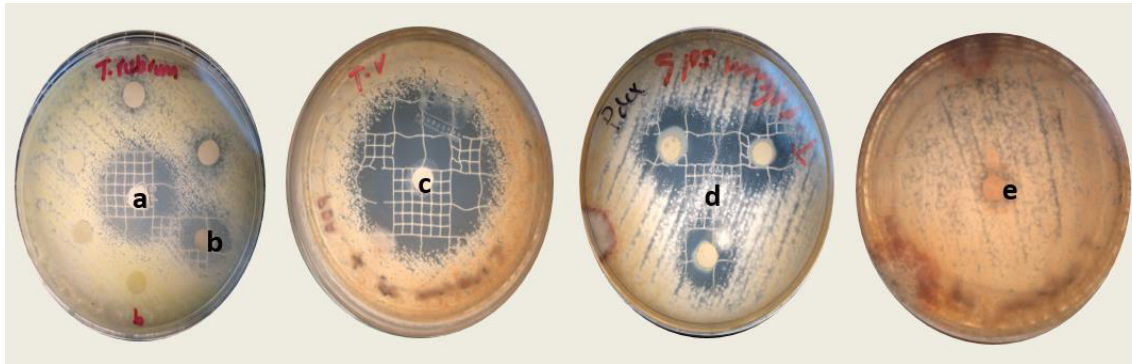


Figura 22. Actividad antifúngica del extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* (b), control positivo terbinafina (a), formulado de biopolímeros impregnado de terbinafina (c), formulado de biopolímeros impregnado de extracto activo (d) y formulado de biopolímeros (e) en medio PDA sobre *T. rubrum*.

8.4.3 Actividad antifúngica de formulado de biopolímeros con extractos activos a diferentes condiciones de almacenamiento

A partir de los resultados obtenidos se sometió el formulado de biopolímeros impregnado de extracto metanólico activo de flor y fruto de *M. grandiflora* a diferentes condiciones de conservación temperatura (refrigeración: 4°C y ambiente 25°C), luz y oscuridad de tiempo en días (0, 7, 14, 21, 28) Tablas XIII, XIV, XV, XVI y XVII. La actividad se midió en milímetros figura 23, 24, 25 y 26.

8.4.4 Análisis de varianza univariante relación cepa, temperatura y luz.

Para poder determinar la diferencia de los halos de inhibición (entre tratamientos) se realizó un análisis de varianzas de dos vías (temperatura y luz), para cada tiempo de conservación: 0, 7, 14, 21 y 28 días, y posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para encontrar entre que pares hay diferencia significativa, resultando lo siguiente:

La tabla XIII muestra la actividad antifúngica de actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los cero (0) días. No mostrando diferencia significativa entre las diferentes condiciones de conservación.

Hongo	luz						obscuridad					
	4°C			25°C			4°C			25°C		
	FBE	FBT	FB	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP
<i>M. canis</i>	21.20	38.23	12.32	20.99	37.91	12.82	21.73	37.98	12.66	21.65	38.12	12.39
<i>T. mentagrophytes</i>	17.40	44.87	12.45	17.11	44.64	12.73	17.56	43.98	11.62	17.34	44.65	12.86
<i>T. tonsurans</i>	16.78	41.54	11.56	16.69	41.13	11.63	16.87	41.34	11.53	16.98	41.32	11.64
<i>T. rubrum</i>	18.50	42.63	12.10	18.62	42.33	12.34	18.53	42.56	12.45	18.34	42.71	12.23
<i>E. floccosum</i>	20.45	44.32	13.21	20.43	43.98	13.89	20.35	44.43	13.42	20.65	43.97	13.87

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina, FB= formulado de biopolímeros. p < 0.5

La tabla XIV muestra la actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los siete (7) días.

Para *M. canis* los halos de inhibición fueron mayores conservado el FBE en frio, sin perjudicarle la luz. Para *T. mentagrophytes* fue mayor el halo de inhibición conservando el FBE en frio y obscuridad. Para *T. tonsurans* fueron mayor los halos de inhibición conservando el FBE en frio y obscuridad. Para *T. rubrum* fueron mayor los halos de inhibición conservando el FBE en obscuridad, sin perjudicarle la temperatura. Para *E.*

floccosum los halos no presentaron diferencia significativa entre las diferentes condiciones de conservación.

Tabla XIV. Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los siete (7) días												
Hongo	luz						obscuridad					
	4°C			25°C			4°C			25°C		
	FBE	FBT	FB	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP
<i>M. canis</i>	21.32	38.17	12.11	21.28	38.32	12.72	21.49	38.54	12.42	21.35	38.54	12.98
<i>T. mentagrophytes</i>	17.34	44.76	12.34	17.54	44.54	12.82	17.72	44.72	12.47	17.65	44.64	12.76
<i>T. tonsurans</i>	16.54	41.49	11.45	16.67	41.62	11.72	16.92	41.66	11.58	16.92	41.56	11.12
<i>T. rubrum</i>	18.43	42.88	12.42	18.72	42.59	12.39	18.63	42.63	12.63	18.65	42.61	12.98
<i>E. floccosum</i>	20.43	44.96	13.33	20.56	44.87	12.3	20.54	44.34	13.65	20.55	44.58	13.65

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina, FB= formulado de biopolímeros p < 0.5

La tabla XV muestra la actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los catorce (14) días.

Para *M. canis* los halos no presentaron diferencia significativa entre las diferentes condiciones de conservación. Para *T. mentagrophytes* fueron mayor los halos de inhibición conservando el FBE en frío y obscuridad. Para *T. tonsurans* fueron mayor los halos de inhibición conservando el FBE en frío y obscuridad. Para *T. rubrum* fueron mayor los halos de inhibición conservando el FBE en frío y obscuridad. Para *E. floccosum* fueron mayor los halos de inhibición conservando el FBE en frío y obscuridad.

Tabla XV. Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los catorce (14) días												
Hongo	luz						obscuridad					
	4°C			25°C			4°C			25°C		
	FBE	FBT	FB	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP
<i>M. canis</i>	21.29	38.24	12.34	21.52	38.65	12.49	21.39	38.29	12.83	21.72	38.43	12.66
<i>T. mentagrophytes</i>	17.54	44.78	12.34	17.34	44.79	12.63	17.82	44.77	12.52	17.43	44.76	12.11
<i>T. tonsurans</i>	16.75	41.67	11.98	16.76	41.59	11.52	16.65	41.61	11.56	16.73	41.62	11.97
<i>T. rubrum</i>	18.54	42.65	12.17	18.53	42.69	12.29	18.65	42.73	12.63	18.62	42.87	12.21
<i>E. floccosum</i>	20.43	44.34	13.22	20.72	44.38	13.71	20.63	44.62	12.99	20.11	44.5	13.64

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina, FB= formulado de biopolímeros p < 0.5

La tabla XVI muestra la actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los cero (21) días. Para Todas las cepas en estudio fueron mayor los halos de inhibición conservando el FBE en frio y obscuridad.

Tabla XVI. Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los veintiuno (21) días												
Hongo	luz						obscuridad					
	4°C			25°C			4°C			25°C		
	FBE	FBT	FB	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP
<i>M. canis</i>	21.43	38.31	12.43	21.63	38.32	12.49	21.45	38.53	12.54	21.72	38.63	12.54
<i>T. mentagrophytes</i>	17.32	44.79	12.37	17.72	44.9	12.49	17.63	44.54	12.65	16.99	44.76	12.65
<i>T. tonsurans</i>	16.9	41.41	11.76	16.36	41.44	11.5	16.82	41.6	11.62	17.88	41.49	11.54
<i>T. rubrum</i>	18.67	42.53	12.26	18.48	42.53	12.29	18.99	42.59	12.23	18.24	42.53	12.54
<i>E. floccosum</i>	20.11	44.44	13.56	20.81	43.98	13.76	20.37	44.42	13.52	20.61	44.42	13.21

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina, FB= formulado de biopolímeros p < 0.5

La tabla XVII muestra la actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de

conservación a los veintiocho (28) días. Para Todas las cepas en estudio fueron mayor los halos de inhibición conservando el FBE en frio y oscuridad.

Tabla XVII. Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación a los veintiocho (28) días												
Hongo	luz						oscuridad					
	4°C			25°C			4°C			25°C		
	FBE	FBT	FB	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP
<i>M. canis</i>	21.76	38.54	12.83	21.62	38.42	12.45	21.82	38.33	12.54	21.54	38.23	12.54
<i>T. mentagrophytes</i>	17.43	44.67	12.67	17.39	44.62	12.72	17.33	44.67	12.63	17.65	44.31	12.62
<i>T. tonsurans</i>	16.54	41.65	11.69	16.62	41.45	11.54	16.88	41.65	11.59	16.57	41.65	11.65
<i>T. rubrum</i>	18.78	42.58	12.28	18.61	42.59	12.3	18.92	42.63	12.82	18.63	42.53	12.32
<i>E. floccosum</i>	20.78	44.42	13.62	20.3	44.44	13.21	20.65	44.66	13.33	20.77	43.99	13.62

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina, FB= formulado de biopolímeros. p < 0.5

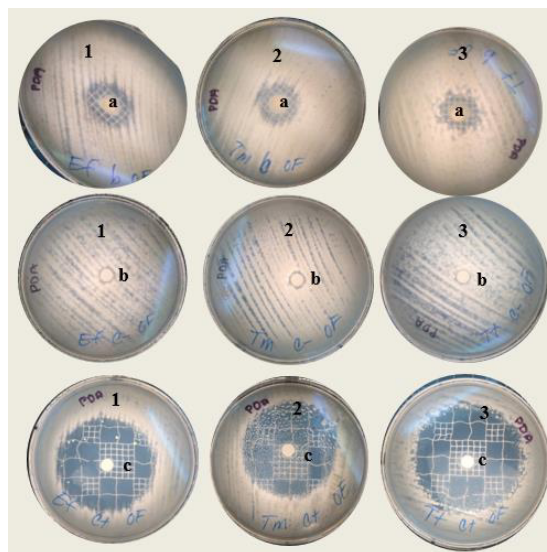


Figura 23. Actividad antifúngica del formulado de biopolímeros impregnado de extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* (a), formulado de biopolímeros (b), formulado de biopolímeros impregnado de terbinafina (c), en medio PDA sobre *E. floccosum* (1), *T. mentagrophytes* (2) y *T. tonsurans* (3) conservado en oscuridad a temperatura de 4°C (OF) durante 28 días.

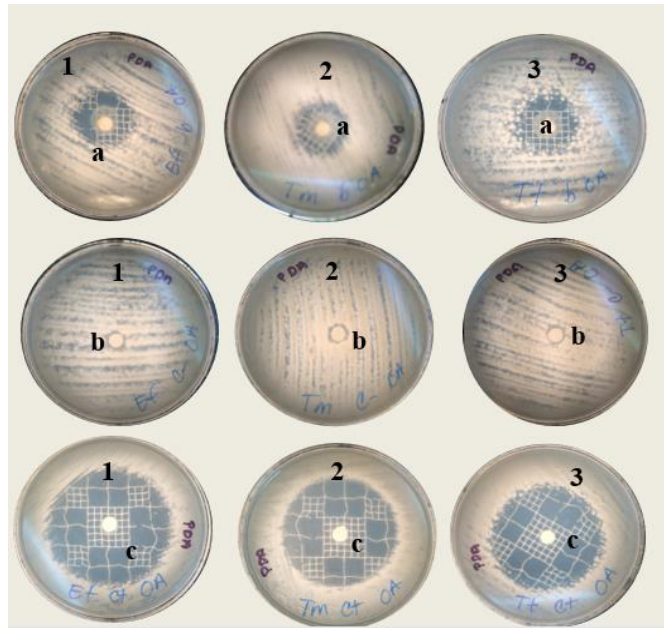


Figura 24. Actividad antifúngica del formulado de biopolímeros impregnado de extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* (a), formulado de biopolímeros (b), formulado de biopolímeros impregnado de terbinafina (c), en medio PDA sobre *E. floccosum* (1), *T. mentagrophytes* (2) y *T. tonsurans* (3) conservado en oscuridad a temperatura de 25°C (OA) durante 28 días.

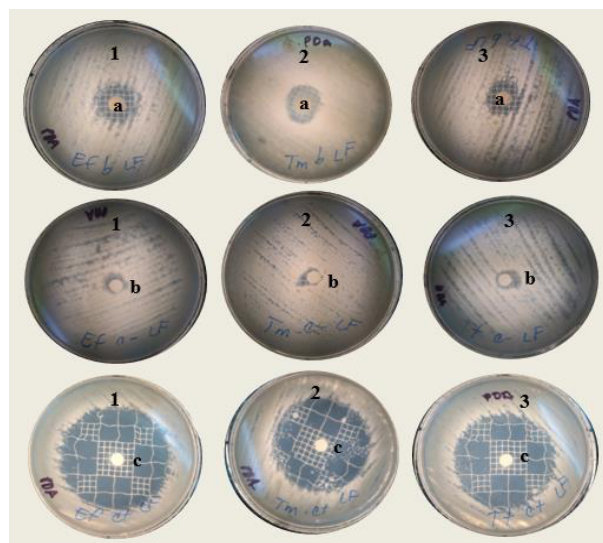


Figura 25. Actividad antifúngica del formulado de biopolímeros impregnado de extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* (a), formulado de biopolímeros (b),

formulado de biopolímeros impregnado de terbinafina (c), en medio PDA sobre *E. floccosum* (1), *T. mentagrophytes* (2) y *T. tonsurans* (3) conservado en luz a temperatura de 4°C (LF) durante 28 días.

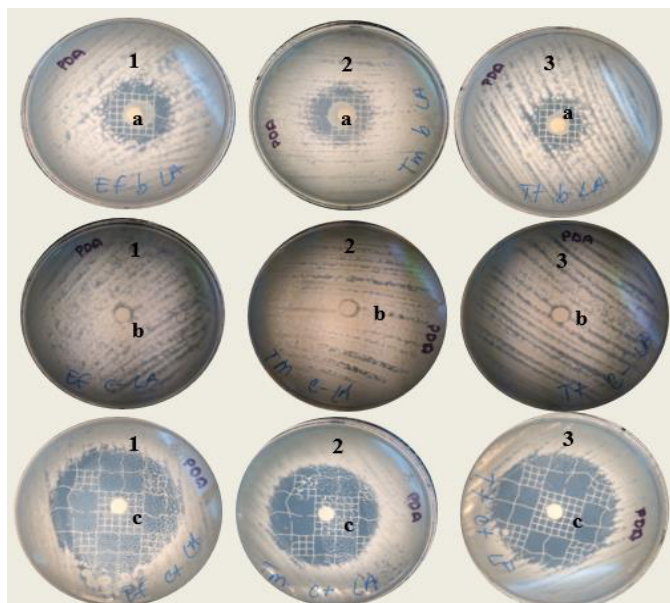


Figura 26. Actividad antifúngica del formulado de biopolímeros impregnado de extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* (a), formulado de biopolímeros (b), formulado de biopolímeros impregnado de terbinafina (c), en medio PDA sobre *E. floccosum* (1), *T. mentagrophytes* (2) y *T. tonsurans* (3) conservado en luz a temperatura de 25°C (LA) durante 28 días.

8.4.5 Análisis de varianza univariante relación tiempo de conservación y temperatura y luz.

Para poder determinar la diferencia de los halos de inhibición (entre tiempo de conservación) se realizó un análisis de varianzas de dos vías (temperatura y luz), para cada cepa en estudio y posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para encontrar entre que pares hay diferencia significativa, resultando lo siguiente:

La tabla XVIII muestra la actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre *M. canis*.

Para las cuatro formas de conservación de FBE evaluados, fueron mayor los halos de inhibición con 28 días de conservación.

Tabla XVIII. Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre <i>M. canis</i>												
día	luz						obscuridad					
	4°C			25°C			4°C			25°C		
	FBE	FBT	FB	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP
0	21.20	38.23	12.32	20.99	37.91	12.82	21.73	37.98	12.66	21.65	38.12	12.39
7	21.32	38.17	12.11	21.28	38.32	12.72	21.49	38.54	12.42	21.35	38.54	12.98
14	21.29	38.24	12.34	21.52	38.65	12.49	21.39	38.29	12.83	21.72	38.43	12.66
21	21.43	38.31	12.43	21.63	38.32	12.49	21.45	38.53	12.54	21.72	38.63	12.54
28	21.76	38.54	12.83	21.62	38.42	12.45	21.82	38.33	12.54	21.54	38.23	12.54

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina, FB= formulado de biopolímeros. p < 0.5

La tabla XIX muestra la actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre *T. mentagrophytes*.

Tabla XIX. Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre <i>T. mentagrophytes</i>												
día	luz						obscuridad					
	4°C			25°C			4°C			25°C		
	FBE	FBT	FB	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP
0	17.4	44.87	12.45	17.11	44.64	12.73	17.56	43.98	11.62	17.34	44.65	12.86
7	17.34	44.76	12.34	17.54	44.54	12.82	17.72	44.72	12.47	17.65	44.64	12.76
14	17.54	44.78	12.34	17.34	44.79	12.63	17.82	44.77	12.52	17.43	44.76	12.11
21	17.32	44.79	12.37	17.72	44.9	12.49	17.63	44.54	12.65	16.99	44.76	12.65
28	17.43	44.67	12.67	17.39	44.62	12.72	17.33	44.67	12.63	17.65	44.31	12.62

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina, FB= formulado de biopolímeros. p < 0.5

La tabla XX muestra la actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre *T. tonsurans*.

Para las cuatro formas de conservación de FBE evaluados, fueron mayor los halos de inhibición con 21 y 28 días de conservación.

Tabla XX. Actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de <i>Magnolia grandiflora</i> impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre <i>T. tonsurans</i>												
día	luz						obscuridad					
	4°C			25°C			4°C			25°C		
	FBE	FBT	FB	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP
0	16.78	41.54	11.56	16.69	41.13	11.63	16.87	41.34	11.53	16.98	41.32	11.64
7	16.54	41.49	11.45	16.67	41.62	11.72	16.92	41.66	11.58	16.92	41.56	11.12
14	16.75	41.67	11.98	16.76	41.59	11.52	16.65	41.61	11.56	16.73	41.62	11.97
21	16.90	41.41	11.76	16.36	41.44	11.5	16.82	41.6	11.62	17.88	41.49	11.54
28	16.54	41.65	11.69	16.62	41.45	11.54	16.88	41.65	11.59	16.57	41.65	11.65

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina, FB= formulado de biopolímeros. p < 0.5

La tabla XXI muestra la actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre *T. rubrum*.

Para las cuatro formas de conservación de FBE evaluados, fueron mayor los halos de inhibición con 21 y 28 días de conservación.

día	luz						obscuridad					
	4°C			25°C			4°C			25°C		
	FBE	FBT	FB	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP
0	18.5	42.63	12.1	18.62	42.33	12.34	18.53	42.56	12.45	18.34	42.71	12.23
7	18.43	42.88	12.42	18.72	42.59	12.39	18.63	42.63	12.63	18.65	42.61	12.98
14	18.54	42.65	12.17	18.53	42.69	12.29	18.65	42.73	12.63	18.62	42.87	12.21
21	18.67	42.53	12.26	18.48	42.53	12.29	18.99	42.59	12.23	18.24	42.53	12.54
28	18.78	42.58	12.28	18.61	42.59	12.3	18.92	42.63	12.82	18.63	42.53	12.32

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina, FB= formulado de biopolímeros. p < 0.5

La tabla XXII muestra la actividad antifúngica del extracto de flor y fruto de *Magnolia grandiflora* impregnado con formulado de polímero a diferentes condiciones de conservación sobre *E. floccosum*.

Para las cuatro formas de conservación de FBE evaluados, fueron mayor los halos de inhibición con 28 días de conservación.

día	luz						obscuridad					
	4°C			25°C			4°C			25°C		
	FBE	FBT	FB	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP	FBE	FBT	FP
0	20.45	44.32	13.21	20.43	43.98	13.89	20.35	44.43	13.42	20.65	43.97	13.87
7	20.43	44.96	13.33	20.56	44.87	12.3	20.54	44.34	13.65	20.55	44.58	13.65
14	20.43	44.34	13.22	20.72	44.38	13.71	20.63	44.62	12.99	20.11	44.5	13.64
21	20.11	44.44	13.56	20.81	43.98	13.76	20.37	44.42	13.52	20.61	44.42	13.21
28	20.78	44.42	13.62	20.3	44.44	13.21	20.65	44.66	13.33	20.77	43.99	13.62

n = 3 PDA: Agar Papa Dextrosa, (-) No inhibición. Inhibición medida en mm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes. FBE= formulado de biopolímeros con extracto activo, FBT= Formulado de biopolímeros con terbinafina, FB= formulado de biopolímeros. p < 0.5

8.5 Actividad antibacteriana de los extractos

Para el caso de la actividad antibacteriana la Tabla XXIII muestra el porcentaje de inhibición al compararlo con el control positivo, en donde se observa que el extracto metanólico de *M. grandiflora* no muestra actividad sobre ninguna de las cepas en estudio; el extracto metanólico de *A. indica* muestra un porcentaje de inhibición de 12.16 solo sobre *S. epidermidis*, los extractos de *T. stans* y *J. regia* tienen potencial antibacteriano similar mostrando un porcentaje de 21.98 y 22.15 sobre *E. coli* respectivamente y *J. regia* además mostró un porcentaje de 23.10 para *E. cloacae*. Para encontrar la diferencia significativa entre los extractos se realizó una prueba de comparación múltiple de medias con el método *Tukey*.

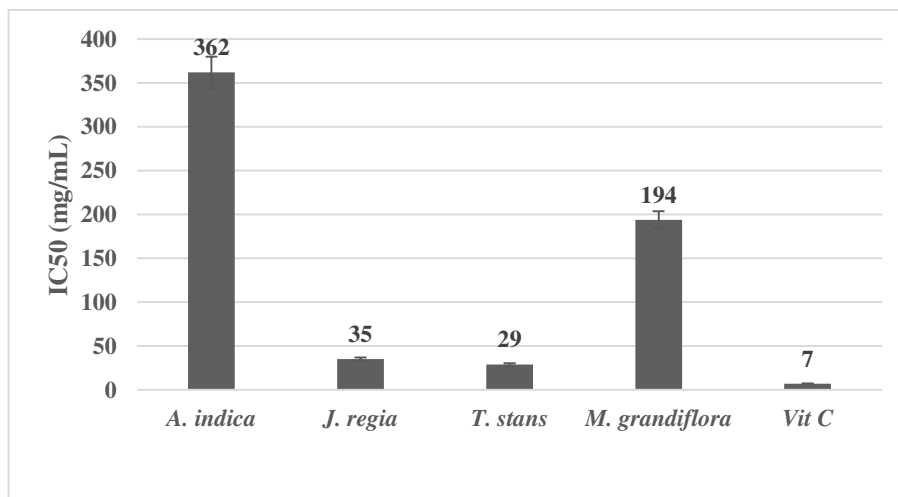
Tabla XXIII. Actividad antibacteriana de los extractos en estudio						
Cepa	<i>A. indica</i>	<i>J. regia</i>	<i>T. stans</i>	<i>M. grandiflora</i>	Control (-) Metanol	Control (+) Gentamicina
<i>S. marcescens</i>	0	0	0	0	0	100
<i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	100
<i>E. agglomerans</i>	0	0	0	0	0	100
<i>E. cloacae</i>	0	23.10	0	0	0	100
<i>E. coli</i>	0	22.15	21.98	0	0	100
<i>S. aureus</i>	0	0	0	0	0	100
<i>S. epidermidis</i>	12.16	20.25	0	0	0	100
<i>S. pyogenes</i>	0	0	0	0	0	100

Los resultados muestran el porcentaje de inhibición con respecto al control positivo. Se inocularon 100 µL de una suspensión bacteriana de 1×10^6 UFC y se difundió homogéneamente con un asa Driblasky en cada caja Petri, posteriormente se colocaron discos de papel filtro impregnados con 50 µL del extracto y un control negativo con metanol, y un control positivo con gentamicina 10 mg/mL. Se incubaron durante 18-24 h a 37 °C, después de este período se midió el halo de inhibición formado. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes.

8.6 Actividad antirradical de los extractos

En la figura 27 se presentan las IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$), de las plantas en estudio, obtenidas por análisis Probit con los datos de los porcentos de inhibición obtenidos para cada especie evaluada, todas presentaron IC_{50} mayor a la Vitamina C la cual presentó una IC_{50} de 7, seguido por *T. stans* con IC_{50} de 29, *J. regia* con una IC_{50} de 35 y existiendo una diferencia mayor con *M. grandiflora* que presentó IC_{50} de 194 y con *A. indica* con una IC_{50} de 362.

Figura 27. Actividad antioxidante de plantas en estudio



La Concentración Inhibitoria (IC_{50}), indica la concentración necesaria para medir la potencia *in vitro* de los compuestos del extracto para reducir el 50% de la concentración del radical DPPH y se determinó mediante el diseño estadístico Probit ($p < 0.05$)

8.7 Bioensayo de toxicidad de los extractos sobre nauplios de *Artemia salina*

La tabla XXIV muestra la DL_{50} de las especies en estudio, *J. regia* y *A. indica* no mostraron toxicidad por presentar una DL_{50} mayor a 1000 ($\mu\text{g/mL}$), a diferencia de *T. stans* y *M. grandiflora* que se consideran moderadamente tóxicas por presentar una DL_{50}

entre 100-500 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), esto en base a la clasificación de toxicidad establecida por CYTED.

Tabla XXIV. Actividad de los extractos metanólico sobre la letalidad de <i>Artemia salina</i>	
Extracto metanólico	DL₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>A. indica</i>	1065
<i>T. stans</i>	362
<i>J. regia</i>	3174
<i>M. grandiflora</i>	400

La DL₅₀ es la concentración de una sustancia para producir la muerte del 50% de un organismo vivo y se determinó mediante el diseño estadístico probit. $p < 0.5$

9 DISCUSION.

La elección de las especies vegetales utilizadas en el presente estudio fue con base a la distribución en el estado de Nuevo León y a lo publicado por *Parrota JA y Chaturvedi AN (1994)*; *Carnerio et al (2012)*; *López y Angulo, (2007)*, SAGARPA (2005); CONABIO, (2008), antecedentes de la presencia de la actividad antibacteriana y antifúngica (*Ali et al 2016; Kankariya et al 2016; Vennila et al 2016; Ghonmode et al 2013; Goncalves et al 2008, Farroqui et al 2015; Zakavi et al 2013, Noumi et al 2010; Sharma et al 2008; Mohamed et al 2012; Anburaj et al 2016; Guerra et al 2013; Bajpai et al 2009; Dong et al 2013*) y el uso etnobotánico en México, ya que se encuentran entre las especies de uso etnobotánico, de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (SSA 2001; BMTM 2009a, 2009b).

En base a la identificación de compuestos químicos presentes en las plantas según *Rodríguez G. (2010), 2011, Kuklinski, (2000), Ikan (1991); Domínguez (1979)*, la determinación cualitativa de grupos funcionales de extractos metanólicos de *Azadirachta indica, Juglans regia, Tecoma stans y Magnolia grandiflora* se determinó la presencia de instauraciones, grupos carbonilo, oxidrilos fenólicos, carbohidratos, esteroides y triterpenos, cumarinas, saponinas, flavonoides y grupos aromáticos en todas las especies en estudio. Las pruebas para alcaloides fueron positivas solo para *Magnolia grandiflora, Tecoma stans y Juglans regia*.

Dichas especies son útiles para el presente trabajo ya que los resultados concuerdan con lo descrito por *Alzohairy (2016)* en un estudio donde menciona la presencia de nimbolinina, nimbina, nimbidina, nimbinato de sodio, gedunina, salannina, nimbaneno, 6-desacetilnimbaneno, n-hexacosanol, 7-desacetil-7-benzoiacadiradiona, nimbiol, quercetina, β sitosterol y flavonoides polifenólicos en *Azadirachta indica*. *Eidi et al 2013; Ahmad et al 2012; Chen et al 2012; Akbari et al 2012* mencionan que los principales compuestos identificados en *Juglans regia* se encuentran fenoles, isoflavonas, flavonoides. Monoterpenos, flavonoides, lignanos, entre otros son los compuestos bioactivos encontrados en *Tecoma stans* según *Al Azzawi AM, (2012); Kameshwaran et*

al 2012; Lovely *et al* 2012. Wen *et al* 2013; Hu *et al* 2011; Hiroshi *et al* 1999 mencionan que los compuestos que han sido aislados en *Magnolia grandiflora* son los que contienen grupos bencenos, aceites esenciales, terpenoides, flavonoides, lignanos y neolignanos.

La selección de los biopolímeros (quitosan y pululano) se realizó en base a la necesidad de encontrar materiales sostenibles de origen natural para aplicaciones biomédicas con características físicas y químicas como el ser atóxicos, biocompatibles, biodegradables datos que respalda Dutta *et al* (2013); Younes *et al* (2015), con propiedades de adhesión a las mucosas (Kawahara *et al.*, 2003), además de ser abundantes en la naturaleza, renovables y de bajo costo para la introducción de la hidrofiliidad y biocompatibilidad en los sistemas poliméricos para impregnarlos con extractos naturales como lo menciona Sizovs *et al* (2010). Así como contener actividad antimicrobiana comprobado en estudios donde Hironori *et al* 2015; Kong *et al* 2010; Rahman *et al* 2014 Galaev and Mattiason, 2008; Wang *et al.*,2000 así lo mencionan.

Ali y Abu en 1999 menciona que el extracto acuoso de *J. regia* presentó actividad antifúngica sobre nueve aislados de *M. canis*, *T. mentagrophytes* y *T. violaceum*; así mismo Ahmad *et al* 1973 mencionan la actividad del extracto etanólico de corteza de *Junglas regia* sobre *T. rubrum*, *T. violaceum*, *T. gourvila*, *T. schoenleini*, *M. gypseum*, *M. audouini* *M. vanbreuseghemii*; Mhmoud *et al* 2011 menciona la actividad antifúngica de extractos acuoso, etanólico y etílico de hojas de neem (*A. indica*) sobre el crecimiento de *M. gypseum*, resultados que no concuerdan con los resultados del presente, ya que las cepas de dermatofitos utilizadas no fueron sensibles a los extractos metanólicos de *J. regia*, *A. indica* y *T. stans* pudiera sugerirse que pudiera deberse en primera instancia a la multi farmacoresistencia propia de los aislados clínicos como lo menciona Levy 2002, así como los factores ambientales del sitio de colecta como lo refiere Herbone J.B 1973, 1990 Guerra *et al* 2013 menciona la actividad antifúngica de aceites esenciales de *Magnolia grandiflora* sobre *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. rubrum* y *E. floccosum*. Bajpai *et al* 2009 menciona la actividad antifúngica de extractos metanólicos, etílicos, clorofórmicos y hexánicos de *Magnolia liliflora* otra especie del genero *Magnolia* sobre las especies de *Trichophyton* y *Microsporum spp.* estos datos son comparables con los resultados del presente trabajo ya que todas cepas de aislados clínicos de los dermatofitos más comunes en México según Bonifaz A., 2012, utilizados en el presente trabajo, fueron

sensibles al extracto metanólico de hoja, tallo, flor y fruto de *M. grandiflora* hasta una concentración de 3.125 mg/mL incluyendo *M. canis* especie resistente a aceites esenciales de *M. grandiflora* según Guerra *et al* 2013.

En los estudios de Guerra *et al* 2013 y Bajpai *et al* 2009 no mencionan la parte de la planta utilizada, por lo cual se evaluó la actividad antifúngica de (hoja, tallo, flor y fruto), así como de (hoja y tallo) y (flor y fruto) siendo mejor la actividad en (flor y fruto), Negri M. *et al* 2014 menciona que existen compuestos antidermatofíticos polares en productos naturales por lo cual pudiera atribuirse la presente actividad a compuestos fenólicos que se extraen con el solvente utilizado, lo anterior sugiere que este extracto es útil para la impregnación con biopolímeros previamente seleccionados (quitosan y pululano).

Mayumi *et al* 2015 menciona que el quitosan mostró actividad antifúngica sobre cepas de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, y *T. tonsurans* por medio del método de inhibición del crecimiento de colonia, colocando un bloque de 2 x 2 cm de hongo y sugieren que puede deberse a las modificaciones morfológicas del hongo, o a que el quitosan puede actuar como agente quelante. Zhang *et al* 2016 y Wang *et al* 2016 mencionan que el pululano es un biomaterial no tóxico, no mutagénico, no inmunogénico y no cancerígeno; ha sido usado para prolongar la vida de anaquel de algunos alimentos y fármacos como lo menciona Kawahara *et al.*, 2003 estos datos son comparables con los resultados del presente trabajo ya que al probar el formulado hecho de quitosan-pululano sobre las cepas de dermatofitos estas fueron sensibles mostrando inhibición, pudiera deberse a la concentración utilizada en la formulación de biopolímeros (quitosan-pululano), previamente elaborada de acuerdo a la metodología desarrollada Treviño G.M *et al* 2015, de la misma forma se sugiere que el pululano pudiera contener cierta actividad antidermatofítica ya que los halos de inhibición fueron considerablemente mayores a los que se demostraron con solo quitosan en el trabajo de Mayumi *et al* 2015.

En base al antecedente antimicrobiano del quitosan, descrito por Hironori *et al* 2015, Kong *et al* 2010 y Rahman *et al* 2014, el antecedente de ser excelente vehículo de dispersión de sustancias farmacológicas, al igual que el pululano, como lo menciona Chelladurai *et al.*, 2008, Gorle and Gattani, 2009, Galaev and Mattiason, 2008 y Wang *et al.*, 2000 y al antecedente y resultados anti fúngicos de *M. grandiflora* se considerando viable la

evaluación antifúngica del formulado de biopolímero (quitosan-pululano) impregnado de extracto metanólico de (flor y fruto) de *M. grandiflora* sobre todas las cepas de dermatofitos del estudio, a diferentes condiciones de conservación como lo describe la metodología del presente estudio.

Los resultados muestran que efectivamente pudiera existir algún tipo de sinergia entre los compuestos del extracto con los del formulado que hacen que la actividad antifúngica no solo se conserve, si no que se incremente, ya que los halos de inhibición del formulado impregnado fueron significativamente mayores para todas las cepas en estudio contra los diámetros de inhibición del extracto metanólico y del formulado de biopolímeros de forma independiente.

Es de suma importancia mencionar que no se encontró reporte científico de actividad antifúngica propia de los biopolímeros (quitosan –pululano) preparada con la metodología ya mencionada, sobre las 5 cepas de dermatofitos de mayor importancia en México según Bonifaz A., 2012 lo que lleva a incrementar el esfuerzo en la investigación relacionado con micosis superficiales.

Las condiciones de conservación del formulado de biopolímero impregnado de extracto fueron, temperatura (refrigeración: 4°C y ambiente 25°C), luz y oscuridad de tiempo en días (0, 7, 14, 21, 28) similar a lo propuesto en su ensayo Rodríguez *et al* 2015, dicho trabajo presenta una mayor de actividad en los polímeros impregnados por extractos metanólicos de otras especies, conservados en refrigeración y oscuridad, comparable con el del presente estudio ya que la temperatura a la que se mostró mayor inhibición en todas las cepas estudiadas fue conservando el formulado en refrigeración y oscuridad.

Rodríguez *et al* 2015 realizó las pruebas antimicrobianas durante tres meses, mostro una disminución en la actividad antifúngica sobre otras cepas fúngicas no filamentosas, en el presente se realizó en 5 ocasiones durante máximo 28 días, con cepas de aislados clínicos de dermatofitos incrementando los halos de inhibición hasta el día 14 de conservación, para el día 21 y 28 ya no hubo diferencia significativa, lo que pudiera indicar que los primeros días de conservación los compuestos lograron realizar sinergia y para los días 21 y 28 ya mostraron estabilidad, lo que indica que pudiera ser útil para algunos tratamientos

para micosis que tienen duración de tratamiento por más de 28 días como lo menciona Bonifaz A. 2012.

En base a lo discutido se puede decir que las propiedades mostradas por formulado elaboradas a partir de quitosan y pululano y adicionadas con el extracto activo son consideradas adecuadas para ser empleado como vehículo de liberación de los principios activos de plantas o de otras sustancias. Ambos polímeros son materiales viables que permiten agregar otros elementos para mejorar sus propias características sin modificar su actividad para que sean empleadas con otro propósito y que la adición de los extractos metanólicos sea una opción tratamientos tópicos.

El extracto metanólico de *M. grandiflora* no muestra actividad sobre ninguna de las cepas bacterianas en estudio, Guerra *et al* 2013 menciona la actividad biológica de aceites esenciales de *M. grandiflora* sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Ali *et al* 2016 menciona que el aceite esencial de *A. indica* muestra actividad sobre cepas de ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* sin embargo, el extracto metanólico de *A. indica* mostró inhibición solo sobre *S. epidermidis* de las cepas en estudio, lo que sugiere que el compuesto o compuestos con actividad no fueron extraídos con el solvente utilizado en el presente trabajo; por otra parte el grado de resistencia que pudieran tener las cepas por ser aislados clínicos son factores importantes a considerar.

Govindappa *et al* 2011 menciona la eficaz actividad antibacteriana de extracto etanólico, metanólico y acuoso de la hoja de *Tecoma stans* sobre, *S. aureus*, *E. coli* y *K. neumonía*; Mohamed *et al* 2012 a su vez menciona la actividad biológica de extractos obtenidos a partir de una extracción continua con metanol y sus fracciones con acetato de etilo, cloroformo, n-butanol y acuosa de hojas y ramas de *T. stans* sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, datos que concuerdan de manera parcial ya que el extracto metanólico de *T. stans* solo mostro actividad solo sobre *E. coli* a concentraciones más elevadas que las referencias, esto pudiera deberse a la resistencia farmacológica que presentan los aislados clínicos como lo menciona Levy S, 2002.

Solo el extracto metanólico de *J. regia* mostró actividad antibacteriana sobre *E. cloacae* y *E. coli* lo que sugieren que los compuestos contenidos en lo extractos metanólicos o la sinergia de los mismos, fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano en las

concentraciones utilizadas, resultados que concuerdan con lo publicado por Farooqui A. *et al* 2015 que menciona la actividad, usando una concentración mínima bactericida de >5 mg/mL de extractos metanólicos de *J. regia* sobre aislados clínicos de las mismas especies. Lo anterior puede indicar que la actividad antibacteriana la presentan compuestos fenólicos, mismos que generan cambios en la morfología celular bacteriana, siendo el punto de acción la pared celular y que pueden ser extraídos con el tipo de solvente utilizado.

Jahanbani *et al* 2016 menciona que el hidrolizado enzimático de semillas de *Juglans regia* poseen excelente capacidad antioxidante, determinado por el método ABTS, Pereira JA *et al* 2007, que el aceite esencial de hojas de *J. regia* mostró actividad antioxidante con concentración inhibitoria del 50% (IC₅₀) entre 34,5 y 56,4 µg / mL, dato que confirma Zhao MH *et al* 2014, sin embargo Cosmulescu S, *et al* 2012 menciona que la actividad más ponente es reflejada en extractos metanólicos de hoja de *J. regia*, datos comparables con el presente trabajo ya que presento una IC₅₀ de 35 µg / mL, lo que sugiere que el método es adecuado para la conservación de la actividad antioxidante.

Anburaj *et al* 2016 menciona que *T. stans* presenta actividad antioxidante ya que existen compuestos fenólicos con actividad antioxidantes datos que se comparan con el presente ya que se puede suponer que estos compuestos pudieron ser extraídos con el método usado ya que presento una IC₅₀ de 29 µg / mL.

Sithisarn *et al* 2005 mencionan la presencia de actividad antioxidante de extracto acuoso de hojas y etanólico de flor y de tallos de *A. indica* con una IC₅₀ de 26,5, 27,9 y 30,6 µg / mL, respectivamente resultados que no son comparables ya que el presente muestra una IC₅₀ de 362 µg / mL pudiera deberse a que la composición química difiere según el área de colecta como lo menciona Herbone J.B 1973, 1990. *M. grandiflora* presento una IC₅₀ de 194 coincidiendo con la actividad antioxidante de sus aceites esenciales según menciona Guerra *et al* en el 2013, a pesar de que Bajpai *et al* en el 2009 menciona que los extractos metanólicos de otra especie del genero Magnolia (*Magnolia liliflora*) ha presentado valores de IC₅₀ alrededor de 45 µg/mL µg / mL datos que no coinciden con el presente ensayo.

J. regia y *A. indica* no mostraron toxicidad por presentar una DL₅₀ mayor a 1000 µg/mL, a diferencia de *T. stans* y *M. grandiflora* que se consideran moderadamente tóxico por presentar una DL₅₀ entre 100-500 µg/mL, esto en base a la clasificación de toxicidad establecida por Pinzón R y Sánchez, C. 1995, sin embargo, Al-Azzawi en el 2012 menciona efecto no tóxico a 5000mg/kg de extracto de acetato de etilo *Tecoma stans*.

La concentración utilizada en la actividad antifúngica del extracto metanólico de *M. grandiflora* fue de 50 mg/mL la cual fue mezclado con el formulado de biopolímeros dando una concentración menor para considerarlo toxico, aunado que solo se utilizaron 20µL en los ensayos lo que concuerda con lo descrito por Prasad *et al* 2016; Pan *et al* 2016; Sakaue *et al* 2016, que la toxicidad nula de compuestos de especies del genero *Magnolia spp* como el honikol y magnoliol.

10 CONCLUSIONES

- El estudio indicó que los extractos metanólicos de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans* y *Magnolia grandiflora* presentan instauraciones, grupos carbonilo, oxidrilos fenólicos, carbohidratos, esteroides y triterpenos, cumarinas, saponinas, flavonoides y grupos aromáticos en todas las especies en estudio; alcaloides dieron positivas solo de *Magnolia grandiflora*, *Tecoma stans* y *Juglans regia*.
- Los extractos metanólicos (flor, fruto, tallo y hoja) de *Azadirachta indica*, *Juglans regia* y *Tecoma stans* no presentan actividad antifúngica sobre cepas de aislados clínicos de dermatofitos (*M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. rubrum* y *E. floccosum*), a la concentración máxima utilizada en el presente estudio (100 mg / mL).
- El extracto metanólico (hoja, tallo, flor y fruto), de *Magnolia grandiflora* presenta actividad antifúngica sobre cepas de aislados clínicos de dermatofitos hasta una concentración mínima de 6.25 mg/mL sobre *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. rubrum* y hasta 3.125 mg/mL sobre *E. floccosum*.
- El extracto metanólico de (hoja y tallo), de *Magnolia grandiflora* presentan actividad antifúngica sobre cepas de aislados clínicos de dermatofitos hasta una concentración mínima de 12.5 mg/mL sobre *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. rubrum* y *E. floccosum*.
- El extracto metanólico de (flor y fruto), de *Magnolia grandiflora* presentan actividad antifúngica sobre cepas de aislados clínicos de dermatofitos hasta una concentración mínima de 3.125 mg/mL sobre *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. rubrum* y *E. floccosum*.
- El formulado de biopolímeros (quitosan-pululano) utilizado como control negativo, presenta una actividad antifúngica sobre todas las especies de dermatofitos utilizados, mostrando diámetros de halos de inhibición, hasta de 13.21mm.
- El formulado de biopolímeros (quitosan – pululano – terbinafina) utilizado como control positivo presenta una actividad antifúngica mayor, sobre todas las especies

de dermatofitos utilizados, que solo la terbinafina; mostrando diámetros de halos de inhibición, hasta de 44.87mm.

- El formulado de biopolímeros (quitosan – pululano – extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora*) presenta una actividad antifúngica mayor, sobre todas las especies de dermatofitos utilizados, que solo el extracto metanólico; mostrando diámetros de halos de inhibición, hasta de 20.45mm.
- El formulado de biopolímeros (quitosan – pululano – extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora*) conservado a 0 días a condiciones de luz y temperatura no muestra diferencia entre los halos de inhibición de la actividad antifúngica.
- El formulado de biopolímeros (quitosan – pululano – extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora*) conservado a 7, 14, 21 y 28 días, a temperatura de 4°C (refrigeración) y obscuridad presentan mayores halos de inhibición de la actividad antifúngica, que los conservados a 25°C y a exposición de luz.
- Para las cuatro formas de conservación de formulado de biopolímeros (quitosan – pululano – extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora*) evaluados, fueron mayor los halos de inhibición con 21 y 28 días de conservación.
- El formulado de biopolímeros (quitosan – pululano – extracto metanólico de flor y fruto de *Magnolia grandiflora*) es una opción para el tratamiento de micosis ocasionadas por *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. rubrum* y *E. floccosum*.
- El extracto metanólico de *M. grandiflora* no muestra actividad sobre ninguna de las cepas bacterianas en estudio.
- Solo el extracto metanólico de *T. stans* solo mostro actividad antibacteriana solo sobre *E. coli*., el extracto metanólico de *J. regia* sobre *E. cloacae*, *E. coli* y *S. epidermidis* y el extracto metanólico de *A. indica* sobre *S. epidermidis*
- La mejor actividad antioxidante corresponde a los extractos metanólicos de *J. regia* y *T. stans*, seguido del extracto metanólico de *M. grandiflora* y por ultimo extracto metanólico de *A. indica*

- Los extractos metanólicos de *A. indica* y *J. regia* mostraron toxicidad y Los extractos metanólicos de *T. stans* y *M. grandiflora* mostraron medianamente toxicidad.
- Se puede concluir de manera general que los resultados del presente estudio indican la utilidad clínica biotecnológica de extractos activos en formulados de biopolímeros a base de quitosan y pululano, como sistemas tópicos de liberación de metabolitos, así como la innovación del desarrollo de nuevas soluciones de origen natural para tratamiento de enfermedades infecciosas de la piel.

11 PERSPECTIVAS

El presente trabajo muestra la base para el uso de sistemas de liberación de bioactivos de extractos naturales para el uso de tratamiento de enfermedades infecciosas por en base a este contexto se presentan las siguientes perspectivas:

- Aislar y caracterizar los metabolitos presentes en los extractos activos y evaluar su actividad biológica.
- Aislar y caracterizar los compuestos que presentan en el formulado de biopolímeros impregnado de extracto y evaluar su actividad biológica.
- Evaluar otras condiciones fisicoquímicas para la estabilidad y conservación del biopolímero.
- Llevar acabo estudios de microscopia electrónica para el análisis de la morfología de las películas y los microorganismos.
- Impregnar el formulado de polímeros con nuevos extractos con antecedente de actividad biológica.
- Buscar nuevas formulaciones de polímeros
- Probar con otros microorganismos para evaluar la actividad antimicrobiana

12 REFERENCIAS

1. Ahmad H, Khan J, Wahid A. 2012. Antiglycation and antioxidation properties of *Juglans regia* and *Calendula officinalis*: possible role in reducing diabetic complications and slowing down ageing. *Journal of traditional Chinese medicine* 32(3):411-4.
2. Ahmad S, Wahid M, Bukhari A. 1973. Fungistatic action of *Juglans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 3(3): 436–438.
3. Akbari V, Jamei R, Heidari R, Esfahlan A. 2012. Antiradical activity of different parts of Walnut (*Juglans regia* L.) fruit as a function of genotype. *Food chemistry* 135(4):2404-10.
4. Akram E, Jalal M, Pejman M, Shamsali R, Somayeh O. 2013. Hepatoprotective effects of *Juglans regia* extract against CCl₄-induced oxidative damage in rats. *Pharmaceutical Biology Journal* 51(5): 558-565.
5. Aksungur P, Sungur A, Unal S, Iskit AB, Squier CA, Senel S. 2004. Chitosan delivery systems for the treatment of oral mucositis: in vitro and in vivo studies. *J. Control Release*. 98:269-279.
6. Ali W, Sultana P, Joshi M, Rajendran S. 2016. A solvent induced crystallisation method to imbue bioactive ingredients of neem oil into the compact structure of poly (ethylene terephthalate) polyester. *Materials science & engineering* 64:399-406.
7. Alkhawajah A. 1997. Studies on the antimicrobial activity of *Juglans regia*. *The American journal of Chinese medicine* 25(2):175-80.
8. Álvarez J. 2004. “Uso y abusos de los suplementos dietéticos”, *Revista de Endocrinología y Nutrición*, Vol. 51, Numero 2.
9. Alzohairy Hindawi. *Therapeutics Role of Azadirachta indica (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment* Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2016. doi: 10.1155/2016/7382506.

10. Anburaj G, Marimuthu M, Sobiyana P, Manikandan R. 2016. A review on *Tecoma stans*. International Journal of Engineering Research and Modern Education 1(1): 2455-4200.
11. Argueta A. 1994. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. [En línea]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php>
12. Avello M, Cisternas I. 2010. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Revista Médica de Chile 138(10): 1288-1293.
13. Azcurra A, Barembaum SR, Bojanich MA, Calamari SE, Aguilar J, Battellino LJ, Dorronsoro ST. 2006. Effect of the high molecular weight chitosan and sodium alginate on *Candida albicans* hydrophobicity and adhesión to cells. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 11:120-125.
14. Azuma H, Thien LB, Kawano S. 1999. Floral scents, leaf volatiles and thermogenic flowers in Magnoliaceae. Plant Species Biology 14:121-127.
15. Azzawi AM. 2012. Genotoxic and cytotoxic study of *Tecoma stans* Bignoniaceae. Pakistan journal of biological sciences 15(2):92-7.
16. Bajpai, VK, Yoon JI, Kang SC. 2009. Antioxidant and antidermatophytic activities of essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. Food and Chemical Toxicology 47(10): 2606-12.
17. Balandrin MF, Kinghorn AD, Farnsworth NR. 1993. Plant-Derived Natural Products in Drug Discovery and Development: An Overview. Human Medicinal Agents form Plants. (A. D. Kinghorn, M. F. Balandrin, eds.) ACS Symposium Series 534; American Chemical Society: Washington, D.C., Pp 2-12.
18. Baligar NS, Aladakatti MR, Ahmed H, Hiremath MB. 2014. Evaluation of acute toxicity of neem active constituent, nimbolide and its hepatoprotective activity against acute dose of carbon tetrachloride treated albino rats. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 5(8):3455-66.
19. Baligar NS, Aladakatti RH, Ahmed M, Hiremath MB. 2014. Hepatoprotective activity of the neem-based constituent azadirachtin-A in carbon tetrachloride intoxicated Wistar rats. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology 92(4):267-277.

20. Barua CC, Talukdar A, Barua AG, Chakraborty A, Sarma RK, Bora RS. 2010. Evaluation of the wound healing activity of methanolic extract of *Azadirachta Indica* (Neem) and *Tinospora cordifolia* (Guduchi) in rats. *Pharmacologyonline*. 1:70–7.
21. Bastidas O. 2013. Conteo Celular con Hematocitómero. Technical Note, Neubauer Chamber Cell Counting, pp. 1-6.
22. Berenzon S, Ito E, Vargas LA. 2006. Enfermedades y padeceres por los que se recurre a terapeutas tradicionales de la ciudad de México. *Revista Salud Pública de México* 48 (1): 45-56.
23. Bhanwra S, Singh J, Khosla P. 2000. Effect of *Azadirachta indica* (neem) leaf aqueous extract on paracetamol induced liver damage in rats. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* 44 (1):64–8.
24. Bhat M, Bhat M, Kothiwale SK, Tirmale AR, Bhargava SY. 2011. Antidiabetic properties of *Azadirachta indica* and *Bougainvillea spectabilis*: *In Vivo* Studies in Murine Diabetes Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. doi: 10.1093/ecam/nep033.
25. Bhattarai N, Ramay H, Chou SH, Zhang M. 2006. Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. *International Journal of Nanomedicine*. 1:181–187.
26. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM). 2009. Atlas de las plantas de la medicina tradicional. Magnolia (online) Encontrado en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7425>
27. Bonifaz A. 2012. *Micología medica básica*. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, 4 Edición, México DF, pp.10-15.
28. Bonifaz Alexandro, 2012 *Micología medica básica*. Ed. Mc Graw Hill Interamericana, 4 Edición, Mexico DF. P.10-15.
29. Brehm BF, Johnson EA. 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47(10): 3357-60.

30. Champion JJ, Chung P, McNamara PJ, Titlow WB, Evans ME. 2005. Pharmacodynamic modeling of the evolution of levofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 49(6):2189-99.
31. Campos S, Vázquez L, Olivares E, Treviño LM, Santos O, Lemus H, Aguilar H, Leyva J. 2005. Diagnóstico del cultivo del Nogal. (En línea). Disponible en: http://www.agronuevoleon.gob.mx/oeidrus/estudios_e_investigaciones/AGRICULTURA/nogal.pdf
32. Carneiro SM, Carvalho FA, Santana LC, Sousa AP, Neto JM, Chaves MH. 2012. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). *Biological research* 45(2):111-6.
33. Castaños M. 1992. Arborización para carreteras y zonas urbanas. Secretaría de Comunicaciones y Transportes. México, D. F. 432pp
34. Castro A, Zapata R, Romo J, Camarillo P, Gómez M, Salazar LA. 2010. The antidiabetic plants *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth (Bignoniaceae) and *Teucrium cubense* Jacq (Lamiaceae) induce the incorporation of glucose in insulin-sensitive and insulin-resistant murine and human adipocytes. *Journal of ethnopharmacology* 127(1):1-6.
35. Catalán B., G. 1993. Semillas de árboles y arbustos forestales. 4ª ed. Madrid, España. Icona (Ministerios de Agricultura Pesca y Alimentación). pp. 250-252.
36. Chaieb K, Kouidhi B, Slama R, Fdhila K, Zmantar T, Bakhrouf A. 2013. Cytotoxicity, Antibacterial, Antioxidant, and Antibiofilm Properties of Tunisian *Juglans regia* Bark Extract. *Journal of herbs, Spices & Medicinal Plants* 19(2): 168-179.
37. Chanes R. 1979. Deodendron; árboles y arbustos de jardín en clima templado. 2ª ed. España. Blume. 547 p.
38. Chelladurai S, Mishra M, Mishra B. 2008. Design and Evaluation of Bioadhesive in-Situ Nasal Gel of Ketorolac Tromethamine. *Chem. Pharm. Bull.* 56:1596-1599
39. Chen N, Yang H, Sun Y, Niu J, Lui S. 2012. Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. *Peptides* 38(2):344-9.
40. Chyang DY, Chan MH, Zong Y, Sheng W, He Y, Jiang JH, Simony A, Gu Z, Fritsche KL, Cui J, Lee JC, Folk WR, Lubahn DB, Sun AY, Sun GY. 2013.

Magnolia polyphenols attenuate oxidative and inflammatory responses in neurons and microglial cells. *Journal of neuroinflammation* 29; 10:15.

41. Convenio sobre la diversidad biológica “Conabio” 2008. Biodiversidad Mexicana. gob. La diversidad biológica en México. (Online) encontrado en: <http://www.biodiversidad.gob.mx/planeta/CDB/cdb.html>.
42. Cruz DE, Verde MJ, Salinas N, Rosales B, Estrada I, Méndez P, Carranza P, González MT, Castro J. 2008. Antimycobacterial activity of *Juglans regia*, *Juglans mollis*, *Carya illinoensis* and *Bocconia frutescens*. *Phytotherapy research* 22(4):557-9.
43. Dholi SK, Raparla R, Mankala SK, Nagappan K. 2011. *In vivo* Antidiabetic evaluation of Neem leaf extract in alloxan induced rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1(4)100–105.
44. Domínguez XA, 1979. Fitoquímica. 1 Ed., Editorial Limusa. México D.F.94 p
45. Dong L, Zhou S, Yang X, Chen Q, He Y, Huang W. 2013. Magnolol Protects Against Oxidative Stress-Mediated Neural Cell Damage by Modulating Mitochondrial Dysfunction and PI3K/Akt Signaling. *Journal of Molecular Neuroscience* 50(3):469-81.
46. Dutta AK, Kawamoto N, Sugino G, Izawa H, Morimoto M, Saimoto H, Ifuku S. 2013. Simple preparation of chitosan nanofibers from dry chitosan powder by the Star Burst system. *Carbohydrate polymers* 97(2):363-7.
47. Dzidziguri D, Rukhadze M, Modebadze I, Bakuradze E, Kurtanidze M, Giqoshvili V. 2016. The study of the immune corrective properties of greek walnut (*Juglans regia* L.) septa on the experimental model of leukopenia. *Georgian medical news* (252): 84-9.
48. Estrada, E. 1995. Plantas medicinales de Mexico. 2 ed. Universidad Autonoma de Chapingo. 580 p.
49. Farooqui A, Khan A, Borghetto I, Kazmi SU, Rubino S, Paglietti B. 2015. Synergistic antimicrobial activity of *Camellia sinensis* and *Juglans regia* against multidrug-resistant bacteria. *Public Library of Science one* 10(2):e0118431.
50. Ford R. 1978. The nature and the status of ethnobotany. *Anthropological Papers* No 67. University of Michigan. Ann Arbor, MI, EEUU. Pp. 29-32

51. Fu Y, Liu B, Zhang N, Liu Z, Liang D, Li F, Cao Y, Feng X, Zhang X, Yang Z. 2013. Magnolol inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by interfering with TLR4 mediated NF- κ B and MAPKs signaling pathways. *Journal of ethnopharmacology* 145(1):193-9.
52. Galaev I, Mattiasson B. 2008. Smart polymers. Applications in Biotechnology and Biomedicine. Second Edition. CRC Press.
53. García CL, Salinas MY, Valle GS. 2012. Betalainas, compuestos fenólicos y actividad antioxidante en potaya de mayo (*Stenocereus griseus*. H.) *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 35 (Núm. Especial 5): 1 – 5 (online) Encontrado en http://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/35-3_Especial_5/1a.pdf.
54. Ghonmode WN, Balsaraf OD, Tambe VH, Saujanya KP, Patil AK, Kakde DD. 2013. Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extracts, grape seed extracts and 3% sodium hypochlorite against *E. feacalis* - An *in vitro* study. *Journal of international oral health* 5(6):61-6.
55. Gómez A. 2002. Plant use knowledge of the Winikina Warao: The case for questionnaires in ethnobotany. *Journal of Economic Botany* 56(3): 231-241.
56. Gonçalves FA, Andrade M, Bezerra JN, Macrae A, Sousa OV, Fonteles AA, Vieira RH. 2008. Antibacterial activity of GUAVA, *Psidium guajava* Linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from Seabob shrimp, *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 50(1):11-5.
57. González CM. 1984. Especies vegetales de importancia económica en México. México, D. F. Porrúa. pp. 149
58. Gorle A, Gattani S. 2009. Design and evaluation of polymeric ocular drug delivery system. *Chem. Pharm. Bull.* 57:914-919.
59. Govindappa M, Sadananda TS, Channabasava R, Jeevitha MK, Pooja KS, Vinay B. 2011. Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunt. *Journal of Phytology* 3(3): 68-76.
60. Guerra BL, Alvarez RR, Salazar AR, Torres CA, Rivas GV, Waksman TN, Gonzalez GG, Perez L. 2013. Chemical compositions and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils from *Magnolia grandiflora*, *Chrysactinia*

mexicana, and *Schinus molle* found in northeast Mexico. Natural Products communications 8(1):135-8.

61. GuȚu CM, Olaru OT, Purdel NC, Ilie M, NeamȚu MC, Dănciulescu R, Avramescu ET, Margina DM. 2015. Comparative evaluation of short-term toxicity of inorganic arsenic compounds on *Artemia salina*. Romanian journal of morphology and embryology 56(3):1091-6.
62. Han HK, Van LT. 2012. Modulation of P-glycoprotein expression by honokiol, magnolol and 4-O-methylhonokiol, the bioactive components of *Magnolia officinalis*. Anticancer research 32(10):4445-52.
63. Harbone, J.B. 1973 Phytochemical methods. Chapman and Hall. London 278 p.
64. Harbone, J.B. 1990 Introduction to ecological biochemistry. Academic Press. London. 278 p.
65. Hernández ME, 1980. Flora de Veracruz, Magnoliaceae. La Flora de Veracruz Fascículo 14. Xalapa Veracruz. 1-14.
66. Hostettmann K, Wolfender JL. 1997. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. Journal of medical plant research 63(1): 2-10.
67. Hu Y, Qiao J, Zhang X, Ge C. 2011. Antimicrobial effect of *Magnolia officinalis* extract against *Staphylococcus aureus*. Journal of the science of food and Agriculture 91(6):1050-6.
68. Igbal J, Siddiqui R, Urooj S, Ahmed N. 2013. A Simple Assay to Screen Antimicrobial Compounds Potentiating the Activity of Current Antibiotics. BioMed Research International 2013: 1-4.
69. Ikan, R. 1991. Natural Products: a laboratory guide. Academic Press. San Diego. 360 p.
70. Ilango K, Maharajan G, Narasimhan S. 2013. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Azadirachta indica* fruit skin extract and its isolated constituent azadiradione. Journal of Natural Product Research 27(16):1463–1467.
71. Indra M, Ramesh S. 2010. Antifungal and haemolytic activities of organic extracts of *Tecoma stans* (Bignoniaceae). Journal of Ecobiotechnology 2(2): 26-32.

72. Jaiswal AK, Bhattacharya SK, Acharya SB. 1994. Anxiolytic activity of *Azadirachta indica* leaf extract in rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 32(7):489–91.
73. Johnson H. 1976. *Los árboles*. Barcelona, España. Blume. 288 p.
74. Kale BP, Kothekar MA, Tayade HP, Jaju JB, Mateenuddin M. 2003. Effect of aqueous extract of *Azadirachta indica* leaves on hepatotoxicity induced by antitubercular drugs in rats. *Indian Journal of Pharmacology* 35:177–180.
75. Kameshwaran S, Suresh V, Arunachalam G, Frank PR, Manikandan V. 2012. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory potential of flower extract *Tecoma stans*. *Indian Journal of Pharmacology* 44(4): 543–544.
76. Kankariya AR, Patel AR, Kunte SS. 2016. The effect of different concentrations of water soluble azadirachtin (neem metabolite) on *Streptococcus mutans* compared with chlorhexidine. *J Indian Soc Pedod Prev Dent. Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry* 34(2):105-10.
77. Kawahara M, Mizutani K, Suzuki S, Kitamura S, Fukada H, Yui T, Ogawa K. 2003. Dependence of the mechanical properties of a pullulan film on the preparation temperature. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 67(4):893-895.
78. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International journal of food microbiology* 144(1):51–63.
79. Kook-II H, Mi K, Bu J, Min K, Min K, Ki-hyoun P, Ye K, Byeongseong K, Eui J, Man H. 2015. Antimicrobial and Antioxidative Activities of the Extracts from Walnut (*Juglans regia* L.) Green Husk. *Journal of Life Science* 25(4):433-440.
80. Kuklinski, C. 2000. *Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Editorial Omega S.A. Barcelona: pp. 106-183
81. Kumar S, Agrawal D, Patnaik J, Patnaik S. 2012. Analgesic effect of neem (*Azadirachta indica*) seed oil on albino rats. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 3(2):222–5.
82. Kumar S, Kumar N. 2014. Neem oil poisoning as a cause of toxic encephalopathy in an infant. *The Indian Journal of Pediatrics* 81(9):955-955.

83. Kuo W, Chung C, Hwang T, Chen J. 2012. Biphenyl-type neolignans from *Magnolia officinalis* and their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry* 85:153-60.
84. Kuo WL, Chung CY, Hwang TL, Chen JJ. 2013. Biphenyl-type neolignans from *Magnolia officinalis* and their anti-inflammatory activities. *Phytochemistry* 85:153-60.
85. Lai SM, Lim KW, Cheng HK. 1990. Margosa oil poisoning as a cause of toxic encephalopathy. *Singapore Medical Journal* 31(5):463-5.
86. Levy SB. 2002. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49(1): 25-30.
87. López Y, Angulo M, Martínez C, Soto J, Chaidez C. 2007. Efecto antimicrobiano de extractos crudos de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22. *Medigraphic* 32 (4): 117-125.
88. Lovely T, Neha S, Navin S. 2012. Identification and standardization of *Tecoma Stans* Linn through transverse section, phytochemical investigation and powder characteristics determination of roots. *International Journal of Pharmaceutical Sciences* 3(4): 484-486.
89. Luo J, Xu Y, Zhang M, Gao L, Fang C, Zhou C. 2013. Magnolol inhibits LPS-induced inflammatory response in uterine epithelial cells : magnolol inhibits LPS-induced inflammatory response. *Inflammation* 36(5):997-1003.
90. Mabit J. 2004. Articulación de las Medicinas Tradicionales y Occidentales: El Reto de la Coherencia. Seminario Taller regional sobre políticas y experiencias de salud e interculturalidad. Ecuador, Quito, pp. 3-42.
91. Mahmoud D, Hassanein N, Youssef K, Abou M. 2011. Antifungal activity of different neem leaf extracts and the nimonol against some important human pathogens. *Brazilian journal of microbiology* 42(3): 1007-1016.
92. Manas N, Bhattacharya A, Behera R, Agrawal D, Dehury S, Kumar S. 2014. Study of anti-inflammatory effect of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on infected albino rats. *Journal of Health Research and Reviews* 1(3): 66-69.

93. Martin G. 2001. Etnobotánica: Manual de métodos. Nordan-Comunidad. Montevideo, Uruguay. Pp. 240
94. Martínez G, Chacalo HA. 1994. Los árboles de la Ciudad de México. Universidad Autónoma Metropolitana (Unidad Azcapotzalco). México, D. F. 351 p.
95. Martínez M. 1979. Plantas Mexicanas, Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos. Fondo de Cultura Económica, México p. 636 y 1142.
96. Mayumi E, Iwamoto R, Izawa H, Morimoto M, Saimoto H, Kaminaka H, Ifuku S. 2015. Characterization of Chitosan Nanofiber Sheets for Antifungal Application. International Journal of Molecular Sciences 16(11): 26202–26210.
97. McFarland J. 1907. Nephelometer: an instrument for media used for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. Journal of the American Medical Association 14:1176-8.
98. Mendez Valderrey J. “*juglans regia* L.” Asturnatura (on line). Num 184 15/06/08(consultado el :5/11/2013). Disponible en <http://asturnatura.com/especie/juglans-regia.html>. ISSN 1887-5068
99. Mendoza MR y Rodríguez C. 1959. Apuntes de Botánica Forestal. Escuela Nacional de Guardas forestales y de Caza “Dr. Manuel Martínez Solorzano. Uruapan, Michoacán. pp. 112-113.
100. Mistry KS, Sanghvi Z, Parmar G, Shah S, Pushpalatha K. 2015. Antibacterial efficacy of *Azadirachta indica*, *Mimusops elengi* and 2% CHX on multispecies dentinal biofilm. Journal of conservative dentistry 18(6):461-6.
101. Mohamed ZM, Yousry MG, Camacho LM, Nader A, Salem AZ. 2013. Antioxidant and antibacterial activities of leaves and branches extracts of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth against nine species of pathogenic bacteria. African Journal of Microbiology 7(5):418-426.
102. Morris J, Fang Y, Mukhopdhyay K, Wargovich MJ. 2016. Natural Agents Used in Chemoprevention of Aerodigestive and GI Cancers. Current pharmacology reports 2(1):11-20.
103. Navarro VM, Rojas G, Zepeda LG, Aviles M, Fuentes M, Herrera A, Jimenez E. 2006. Antifungal and Antibacterial Activity of Four Selected Mexican Medicinal Plants. Pharmaceutical Biology Journal 44(4): 297-300.

104. Negri M, Salci T, Shinobu CS, Capoci I, Svidzinski TI, Kioshima E. 2014. Early state research on antifungal natural products. *Journal of Molecules* 19(3): 2925-56.
105. Nostro A, Germano MP, D' Angelo V, Marino A, Canatelli MA. 2000. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology* 30: 379-384.
106. Nostro A, Guerrini A, Marino A, Tacchini M, Di M, Grandini A, Akin M, Cellini L, Bisignano G, Saracoglu HT. 2016. In vitro activity of plant extracts against biofilm-producing food-related bacteria. *International journal of food microbiology* 238:33-39.
107. Noumi E, Snoussi M, Hajlaoui H, Valentin E, Bakhrouf A. 2010. Antifungal properties of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts against oral *Candida* strains. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 29(1):81-8.
108. Nweze E, Mukherjee P, Ghannoum M. 2010. Agar-Based Disk Diffusion Assay for Susceptibility Testing of Dermatophytes. *Journal of clinical microbiology* 48(10): 3750–3752.
109. Ofusori DA, Falana BA, Ofusori AE, Abayomi TA, Ajayi SA, Ojo GB. 2010. Gastroprotective effect of aqueous extract of neem *Azadirachta indica* on induced gastric lesion in rats. *International Journal of Biological and Medical Research* 1(4):219–222.
110. Oh HI, Kim YJ, Chang EJ, Kim JY. 2001. Antimicrobial characteristics of chitosan against food spoilage microorganisms in liquid media and mayonnaise. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 65(11):2378-83.
111. Organización Mundial de la Salud 2008. Centro de prensa. Medicina tradicional. Nota descriptiva N°134 (Online) Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/es/index.html>.
112. Organización Mundial de Salud 2003. “Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales”. Ginebra. <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s5527s/s5527s.pdf>

113. Osunwoke EA, Olotu EJ, Allison TA, Onyekwere JC. 2013. The Wound Healing Effects of Aqueous Leave Extracts of *Azadirachta Indica* on Wistar Rats. *Journal of Natural Science and Research* 3(6): 2224-3186.
114. Pañella BJ. 1972. Árboles de jardines. Barcelona, España. Oikos-tau. pp. 182-183
115. Parrotta JA, Chaturvedi AN. 1994. *Azadirachta indica* A. Juss. Neem, margosa. SO-ITF-SM-70. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 8p.
116. Patil P, Patil S, Mane A, Verma S. 2013. Antidiabetic activity of alcoholic extract of Neem (*Azadirachta indica*) root bark. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology* 3(2):142–146.
117. Philips, R. 1985. Los árboles. Trad. J. R. Vivil. Barcelona, España. Blume. pp. 134-136
118. Priyadarsini RV, Manikandan P, Kumar GH, Nagini S. 2009. The neem limonoids azadirachtin and nimbolide inhibit hamster cheek pouch carcinogenesis by modulating xenobiotic-metabolizing enzymes, DNA damage, antioxidants, invasion and angiogenesis. *Free Radical Research* 43(5):492-504.
119. (PUMNM) Programa Universitario México, Nación Multicultural- UNAM 2008. Medicina Tradicional Mesoamericana en el contexto de la migración a los EUA. México. 3-17 pp.
120. Qasim M, Singh B, Nagvi A, Paik P, Das D. 2015. Silver nanoparticles embedded mesoporous SiO₂ nanosphere: an effective anticandidal agent against *Candida albicans* 077. *Nanotechnology* 26(28):285102.
121. Rahman MH, Shovan LR, Hjeljord LG, Aam BB, Eijsink VG, Sørli M, Tronsmo A. 2014. Inhibition of fungal plant pathogens by synergistic action of chito-oligosaccharides and commercially available fungicides. *Public Library of Science one* 9(4): e93192.
122. Raizada RB, Srivastava MK, Kaushal RA, Singh RP. 2001. Azadirachtin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. *Food and Chemical Toxicology*. Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 39(5):477–83.

123. Raju S, Kavimani S, Maheshwara VU, Reddy KS, Kumar GV. 2011. Floral extract of *Tecoma stans*: a potent inhibitor of gentamicin-induced nephrotoxicity in vivo. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 4(9):680-5.
124. Ramdas M, Dileep K, Anitha Y. 1999. Alginate encapsulated bioadhesive chitosan microspheres for intestinal drug delivery. *J. Biomater Appl.*13:290-296.
125. Ramírez LS, Marin D. 2009. Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*. ISSN 0122-1701.
126. Robles RE, Velazquez CA, Garibay A, Galvez JC, Ruiz E. 2011. Antimicrobial Activity of Northwestern Mexican Plants Against *Helicobacter pylori*. *Journal of Medicinal Food* 14(10):1280-3.
127. Rodríguez G., Peixoto T., Verde S., DelaTorre Z., Aviles A. and Ruiz G., 2015. In Vitro Antimicrobial and Antiproliferative Activity of *Amphipterygium adstringens*, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* Volume 2015 (2015), Article ID 175497, 7
128. Rodríguez R. 2010. Tamizaje fitoquímico y actividad biológica de *Fouquieria splendens*, *Ariocarpus retusus* y *Ariocarpus kotschoubeyanus*. Tesis doctoral. Facultad de ciencias Biológicas UANL. pp 28-50.
129. Rodríguez RG, González GM, Verde MJ, Morales ME, Rivas C, Oranday A, Núñez MA, Treviño JF. 2011. Bioprospección de la actividad antimicótica de extractos metanólicos de *Ariocarpus retusus* y *Ariocarpus kotschoubeyanus*. *Polibotanica* 31: 134-155.
130. Roma A, Ovadje P, Steckle M, Nicoletti L, Saleem A, Pandey S. 2015. Selective Induction of Apoptosis by *Azadirachta indica* Leaf Extract by Targeting Oxidative Vulnerabilities in Human Cancer Cells. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 18(4):729-46.
131. San T, Sakharkar K, Lim C, Sakharkar K. 2009. Activity of Chitosans in combination with antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biological Sciences*. 5:153-160.
132. Sánchez L, Neira A. 2005. Bioensayo General de letalidad en *Artemia Salina* a las fracciones del extracto etanólico de *P. guajaba L* y *P. guineense*. Sw. Fundación Universitaria Juan de Castellanos, pp. 40-45.

133. Secretaria de Salud en México. 2001. Farmacopea Herbolaria De Los Estados Unidos Mexicanos. México, pp. 15-16.
134. Secretaria de Salud en México. 2001. Relación de Uso de especies Etnobotánico en México. Farmacopea Herbolaria De Los Estados Unidos Mexicanos. México D.F, pp. 45-50.
135. Sharma N, Ghosh P, Sharma UK, Sood S, Sinha AK, Gulati A. 2009. Microwave-Assisted Efficient Extraction and Stability of Juglone in Different Solvents from *Juglans regia*: Quantification of Six Phenolic Constituents by Validated RP-HPLC and Evaluation of Antimicrobial Activity. *Analytical Letters Journal* 42(16): 2592-2609.
136. Sharma RS, Mishra V, Singh R, Seth N, Babu CR. 2008. Antifungal activity of some Himalayan medicinal plants and cultivated ornamental species. *Fitoterapia* 79(7-8):589-91.
137. Shtayenh M, Abu S. 1999. Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses* 42(11-12):665-72.
138. Sinniah D, Baskaran G. 1981. Margosa oil poisoning as a cause of Reye's syndrome. *Lancet* 1(8218):487-9.
139. Sithisarn P, Supabphol R, Gritsanapan W. 2005. Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209). *Journal of Ethnopharmacology* 13(99):109-112.
140. Sizovs A, McLendon PM, Srinivasachi S, Reineke TM. 2010. Carbohydrate polymers for nonviral nucleic acid delivery. *Topics in current chemistry* 296:131-90.
141. Treviño M, García S, Flores M, and Arévalo K. 2015. Edible Active Coatings Based on Pectin, Pullulan, and Chitosan Increase Quality and Shelf Life of Strawberries (*Fragaria ananassa*). *Journal of Food Science* 80(8):M1823-30.
142. Universidad Nacional Autónoma de México "UNAM". 2005. México como un país megadiverso. (Online) encontrado en: <http://biolambiental.posgrado.unam.mx/pdf/Mexicocomopaismegadiverso14.pdf>.
143. Valero M., Ortegón Y., Uscategui Y. 2013. Biopolímeros: avances y perspectivas. (on line) <http://www.scielo.org.co/pdf/dyna/v80n181/v80n181a19.pdf>

144. Vennila K, Elanchezhiyan S, Ilavarasu S. 2016. Efficacy of 10% whole *Azadirachta indica* (neem) chip as an adjunct to scaling and root planning in chronic periodontitis: A clinical and microbiological study. *Indian journal of dental research* 27(1):15-21.
145. Wang D, Ju X, Ahang G, Wang D, Wei G. 2016. Copper sulfate improves pullulan production by bioconversion using whole cells of *Aureobasidium pullulans* as the catalyst. *Carbohydr Polym* 150:209-15.
146. Wang D, Wang C, Chu CY, Yeh HM. 2000. Permeation of drug and swelling agent through polymeric membranes. *American Institute of Chemical Engineers Journal*. 46:2383-2394.
147. Wren RC. 1988. *Nueva Enciclopedia de Medicina Herbolaria y Preparados Botánicos*. Editorial Grijalbo. México.
148. Youn UJ, Fatima N, Chen QC, Chae S, Hung TM, Min BS. 2013. Apoptosis-inducing and Antitumor Activity of Neolignans Isolated from *Magnolia officinalis* in HeLa Cancer Cells. *Phytotherapy research* 27(9):1419-22.
149. Younes I, Rinaudo M. 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. *Structure, Properties and Applications*. *Marine drugs* 13(3):1133-74.
150. Zakavi F, Golpasand L, Daraeighadikolaei A, Farajzadeh A, Daraeighadikolaei A, Leilavi Z. 2013. Antibacterial Effect of *Juglans Regia* Bark against Oral Pathologic Bacteria. *International Journal of Dentistry* 2013: 5.
151. Zakavi F, Golpasand L, Daraeighadikolaei A, Farajzadeh A, Daraeighadikolaei A, Leilavi Z. 2013. Antibacterial Effect of *Juglans Regia* Bark against Oral Pathologic Bacteria. *International Journal of Dentistry* 2013: 1-5.
152. Zhang W, Yu X, Kwak M, Xu L, Zhang L, Yu Q, Jin JO. 2016. Maturation of dendritic cells by pullulan promotes anti-cancer effect. *Oncotarget* 7(28):44644-44659.
153. Zolla C. 1994. *Diccionario enciclopédico de la medicina tradicional mexicana*. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. [En línea]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/alfa.php?p=a>
154. Zolla C. 2008. *Medicina Tradicional Mesoamericana en el contexto de la Migración a los Estados Unidos de América*. p. 1-20.

13 RESUMEN BIOGRAFICO

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias

Con acentuación en Química de Productos Naturales

Abdel Zaid Martínez Báez

Tesis: ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans*, *Magnolia grandiflora* Y SU APLICACIÓN EN FORMULACIONES A BASE DE BIOPOLÍMEROS.

Campo de estudio: Productos Naturales

Datos personales: Nacido en Cd. Victoria, Tamaulipas el 22 de agosto de 1981.

Estudios :

- Químico Clínico Biólogo de la Facultad de Medicina de la UANL (1999-2004)
- Maestro en Salud Pública de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL (2007-2010)

Experiencia Profesional:

- Laboratorio Clínico de Servicios Médicos de la UANL (2004-2005)
- Gerente General de Distribuidora de Medicamentos: Control Operativo Médico SA de CV (2005-2012)
- Profesor de asignatura de la Facultad de Salud Pública y Nutrición de la UANL (2006- a la fecha).
- Encargado de Laboratorio de análisis químico de los alimentos de la Facultad de Salud Pública y Nutrición. UANL
- Ponente e Impartición de Unidades de aprendizaje relacionadas con: Bioquímica estructura, Bioquímica Metabólica, Bioquímica Clínica, Bromatología, Suplementación y Suplementos alimenticios, Soporte Nutricio en pregrado de la Facultad de Salud Pública y Nutrición. UANL.

- Profesor invitado en:
 - Diplomado en Nutrición Clínica. FaSPyN, UANL
 - Diplomado en Nutrición y Obesidad. FaSPyN, UANL
 - Diplomado de Diabetes y Nutrición. FaSPyN, UANL
 - Diplomado en Nutrición y Deporte. FaSPyN, UANL
 - Unidad de aprendizaje Terapias alternativas. Fac. de Medicina UANL