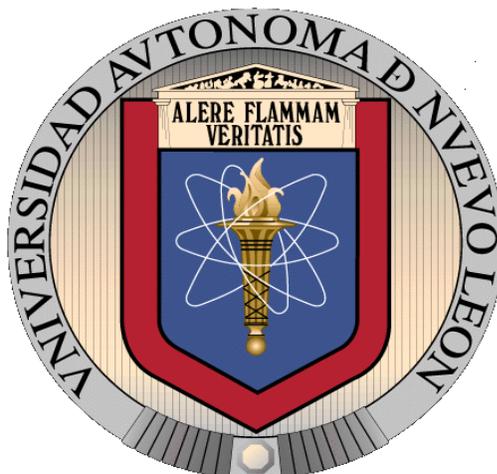


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Fouquieria splendens* (Engelmann), *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire)**

**POR**

**RAMÓN GERARDO RODRÍGUEZ GARZA**

**TESIS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de**

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**con Acentuación en Química de Productos Naturales**

**ABRIL 2010**

**TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Fouquieria splendens* (Engelmann), *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire)**

**TESIS**

**Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
con Acentuación en Química de Productos Naturales**

**Por**

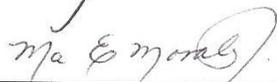
**RAMÓN GERARDO RODRÍGUEZ GARZA**

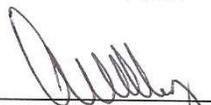
**COMISIÓN DE TESIS:**

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María Julia Verde Star  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Adriana Núñez González  
Secretario

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Catalina Rivas Morales  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Eufemia Morales Rubio  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Azucena Oranday Cárdenas  
Vocal

**ABRIL 2010**

**TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Fouquieria splendens* (Engelmann), *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire)**

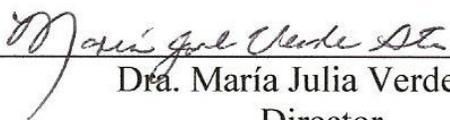
**TESIS**

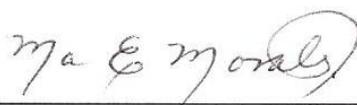
**Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
con Acentuación en Química de Productos Naturales**

**Por**

**RAMÓN GERARDO RODRÍGUEZ GARZA**

**COMISIÓN DE TESIS:**

  
\_\_\_\_\_  
Dra. María Julia Verde Star  
Director

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Eufemia Morales Rubio  
Codirector

**ABRIL 2010**

**TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Fouquieria splendens* (Engelmann), *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire)**

**TESIS**

**Presentada como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS  
con Acentuación en Química de Productos Naturales**

**Por**

**RAMÓN GERARDO RODRÍGUEZ GARZA**

**COMISIÓN DE TESIS:**



---

Dra. Gloria Ma. González G.  
Director Externo

**ABRIL 2010**

## **DEDICATORIA**

### **A Dios**

Que me ha dado la dicha de vivir, conocer y disfrutar cada día de mi vida.

### **A mis padres**

**Ester Ilda Yolanda Garza Maldonado y Ramón Gerardo Rodríguez Cantú**

Por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida, por la confianza que han depositado en mí. Porque en ustedes veo reflejados todos mis logros, gracias por ser mi mejor ejemplo, por compartir tantos momentos, pero sobre todo gracias por la libertad de elegir mi camino.

### **A mis hermanos**

**Ignacio Guillermo Rodríguez Garza e Israel Tadeo Rodríguez Garza**

Gracias por el apoyo y por tantos momentos juntos, por las sonrisas, los empujones, los regaños, porque no hay mejor consejo que el de un hermano.

### **A mis abuelos**

**Dora Cantú de Rodríguez (†), Ignacio Rodríguez García, Elisa Maldonado (†), Celestino Garza Martínez (†)**

Gracias a mis abuelos, por guiarme en el camino de la vida, por sus consejos y regaños, por esa palabras de aliento que nunca olvidaré y que siempre llevo conmigo.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al teacher **Dr. Jaime Fco. Treviño Neávez**, por la confianza que me ha brindado en todo éste tiempo de conocernos, por sus enseñanzas, su paciencia y sus consejos. Por su asesoría en éste trabajo de investigación. Pero lo más importante por ser más que un maestro, un gran amigo.

Mi más sincero agradecimiento a la teacher **Dra. María Eufemia Morales Rubio**, por la confianza que ha puesto en mi persona, por su apoyo incondicional en todo momento, por su constante motivación a seguir adelante, por sembrar el gusto por la investigación, por todos sus consejos, por mostrar siempre una actitud positiva a la vida, pero lo más valioso por ser mi madre académica.

Quiero agradecer a la **Dra. Ma. Julia Verde Star**, por su amistad, sinceridad y disposición, así como las facilidades otorgadas para la realización de ésta investigación, pero sobre todo por su confianza.

A la **Dra. Azucena Oranday Cárdenas**, por su amistad, su valiosa asesoría en la realización de este trabajo de investigación, por su constante motivación y su incondicional disponibilidad.

A la **Dra. Catalina Rivas Morales**, por su amistad, por sus valiosas observaciones, sugerencias y facilidades otorgadas para la realización de éste trabajo.

A la **Dra. Gloria María González González**, por su amistad, por su constante motivación a seguir adelante, por todas las facilidades brindadas en su laboratorio y sus observaciones.

A la **Dra. Ma. Adriana Núñez González**, por su valiosa amistad, por su motivación y por todas las facilidades brindadas para la terminación de esta investigación.

A la **Dra. Ma. Porfiria Barrón González**, por su amistad y su apoyo incondicional en todo momento, por sus acertados consejos y observaciones que fueron importantes para la culminación de esta investigación.

A la **M.C. María Esperanza Castañeda Garza**, por todos sus consejos y el apoyo incondicional que me ha brindado a lo largo de mi carrera, pero sobre todo gracias por su amistad.

Al **Dr. Roberto Mercado Hernández**, por su apoyo constante, comprensión y su interés en brindarme su ayuda en la realización de éste trabajo. Gracias por su amistad.

Al **Dr. Mario Morales Vallarta**, por su apoyo, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio de antemano muchas gracias.

A mi amiga de laboratorio **Biól. Ruth Amelia Garza Padrón**, por su apoyo constante, su paciencia, sus consejos, regaños, por participar en tantos congresos, viajes y vivencias, por involucrarse en la elaboración de ésta tesis, por compartir tantos momentos conmigo y por su valiosa amistad. Gracias.

A mis grandes amigos **LCA. José Ariel Quiróz Olvera y QBP. Jaime Perales Ramírez**, por su apoyo incondicional en todo momento, por su amistad que es algo que siempre existirá, gracias por todos los momentos que hemos convivido, por todas nuestras aventuras. Porque su amistad es para toda la vida.

A la **Lic. Diana Violeta Jaime Bautista**, por su gran amistad, cariño y su apoyo incondicional en todo momento, por el tiempo que llevamos de conocernos pero sobre todo gracias por estar, convivir y compartir tantos bellos momentos conmigo, llenando mi vida de colores.

A la Dra. **Sonia Yesenia Silva Belmares**, por sus consejos experiencias que me sirvieron para tomar el camino en esta investigación, pero sobre todo por su amistad.

A todos mis **maestros** que se dieron a la tarea de transmitir sus conocimientos, su sabiduría y sus vivencias, gracias por compartir las semillas del saber.

A todos mis **amigos y compañeros** de laboratorio, Ezequiel, Norma, Nieves, Miriam, Ara, Dulce, Vero, Yola, Andrea, gracias por sus ánimos, por su compañía, pero sobre todo gracias por su amistad.

*Vivir no es sólo existir,  
sino existir y crear,  
saber gozar y sufrir  
y no dormir sin soñar.*

**Gregorio Marañon**

## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Quiero agradecer a la beca CONACYT N° **191639**, que me fue otorgada; mi más sincero agradecimiento a esta institución.

A las instituciones, departamentos y laboratorios que me recibieron y apoyaron:

### **Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.**

- **Departamento de Biología Celular y Genética**

(Laboratorio de Micropropagación, Laboratorio de Biología Celular).

- **Departamento de Química**

(Laboratorio de Fitoquímica y Química Analítica).

### **Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.**

- **Laboratorio de Micología**

Centro Regional y Control de Enfermedades Infecciosas.

*“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas. Ahora sabemos que está en nuestros genes”.*

***James Watson***

*“Solamente aquel que construye el futuro tiene derecho a juzgar el pasado”.*

***Friedrich Nietzsche***

# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Fouquieria splendens* (Engelmann), *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire)**

POR

**RAMÓN GERARDO RODRÍGUEZ GARZA**

## AREA DE TRABAJO

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Micropropagación del Departamento de Biología Celular y Genética, el Laboratorio de Fitoquímica y Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas, y el Laboratorio de Micología del Centro Regional y Control de Enfermedades Infecciosas de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. María Julia Verde Star, Dra. María Eufemia Morales Rubio y la Dra. Gloria María González González.

CD. UNIVERSITARIA, SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

ABRIL 2010

## TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
<b>1. RESUMEN</b>	1
1.1 ABSTRACT	2
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	3
<b>3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA</b>	5
<b>4. HIPÓTESIS</b>	6
<b>5. OBJETIVOS</b>	7
5.1 Objetivo General	7
5.2 Objetivos Particulares	7
<b>6. ANTECEDENTES</b>	9
6.1 Generalidades	9
6.2 Aspectos generales de la familia Cactaceae	11
6.3 Características químicas de la familia Cactaceae	12
6.3.1 Compuestos químicos presentes en plantas	13
6.3.1.1 Alcaloides	13
6.3.1.2 Flavonoides y otros compuestos fenólicos	14
6.3.1.3 Triterpenos, Saponinas y Esteroides	15
6.3.1.4 Carbohidratos, gomas, ácidos orgánicos y aceites	15
6.4 Descripción de la especie <i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	16
6.4.1 Descripción botánica de <i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	16
6.4.2 Distribución de la especie <i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	17
6.5 Descripción de la especie <i>Ariocarpus retusus</i>	18
6.5.1 Descripción botánica de <i>Ariocarpus retusus</i>	18
6.5.2 Distribución de la especie <i>Ariocarpus retusus</i>	19
6.6 Aspectos Generales de la familia Fouquieriaceae	19
6.6.1 Actividad biológica de la familia Fouquieriaceae	20
6.7 Descripción de la especie <i>Fouquieria splendens</i>	21
6.7.1 Descripción botánica de <i>Fouquieria splendens</i>	21
6.7.2 Distribución de la especie <i>Fouquieria splendens</i>	22

6.8 Análisis fitoquímico	23
6.8.1 Aislamiento de metabolitos secundarios	24
6.8.2 Extracción con solventes	24
6.8.3 Identificación química	25
6.8.4 Cromatografía	25
6.9 Actividad biológica	26
6.9.1 Actividad bactericida	27
6.9.2 Actividad antifúngica	28
6.9.2.1 Género <i>Trichophyton</i>	30
6.9.2.2 Género <i>Microsporium</i>	31
6.9.2.3 Antecedentes de algunas plantas con actividad antifúngica	31
6.9.3 Bioensayo de letalidad contra <i>Artemia salina</i>	32
6.9.4 Actividad amebicida	34
6.9.5 Actividad antioxidante	36
6.10 Análisis estadístico	39
6.10.1 Análisis Probit	39
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
7.1 Reactivos, material y equipo	40
7.1.1 Material de laboratorio	40
7.1.2 Equipo de laboratorio	40
7.1.3 Reactivos	41
7.1.4 Material biológico	42
7.1.4.1 Material vegetal	42
7.1.4.2 Cepas de bacterias	42
7.1.4.3 Hongos dermatofitos	42
7.1.4.4 <i>Artemia salina</i>	42
7.1.4.5 <i>Entamoeba histolytica</i>	43
7.2 Recolección de las plantas e identificación del material vegetal.	43
7.3 Extracción del material vegetal	43

7.4 Métodos químicos de identificación pruebas para grupos funcionales	44
7.4.1 Insaturaciones	44
7.4.1.1 Prueba del $\text{KMnO}_4$	44
7.4.2 Grupo carbonilo	44
7.4.2.1 Prueba de la 2-4 Dinitrofenilhidracina	44
7.4.3 Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales)	45
7.4.3.1 Prueba del $\text{FeCl}_3$	45
7.4.4 Esteroides y Triterpenos	45
7.4.4.1 Prueba de Salkowski	45
7.4.5 Carbohidratos	45
7.4.5.1 Prueba de Molish	45
7.4.5.2 Prueba de las cumarinas	45
7.4.5.3 Prueba de lactonas	45
7.4.6 Sesquiterpenlactonas	45
7.4.6.1 Prueba de Baljet	45
7.4.7 Flavonoides	46
7.4.7.1 Prueba del $\text{H}_2\text{SO}_4$	46
7.4.8 Alcaloides	46
7.4.8.1 Prueba de Dragendorff	46
7.4.9 Saponinas	46
7.4.9.1 Prueba del bicarbonato de sodio	46
7.4.9.2 Prueba de Salkowski para saponinas	46
7.4.9.3 Prueba de agar sangre lisis de eritrocitos	47
7.4.10 Aromaticidad	47
7.4.10.1 Prueba del ácido sulfúrico-formaldehído	47
7.5 Determinación de la actividad antibacteriana	47
7.5.1 Cepas	47
7.5.2 Activación de bacterias	48
7.5.3 Cultivo de bacterias	48
7.5.4 Método de difusión en placa	48

7.6 Determinación de la actividad antifúngica	49
7.6.1 Cepas	49
7.6.2 Cultivo y estandarización del inóculo cepas de dermatofitos	49
7.6.3 Preparación de los extractos actividad antifúngica	50
7.6.4 Preparación del estándar control positivo	50
7.7 Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	51
7.7.1 Incubación de <i>A. salina</i>	51
7.7.2 Preparación de las concentraciones	52
7.7.3 Determinación de la dosis letal media	52
7.8 Determinación de la actividad amebicida	53
7.8.1 Medio de cultivo para <i>E. histolytica</i> cepa HM1-IMSS	53
7.8.2 Mantenimiento de <i>E. histolytica</i> cepa HM1-IMSS	54
7.8.3 Cinética de crecimiento de <i>Entamoeba histolytica</i>	54
7.8.4 Preparación de solución madre	54
7.8.5 Evaluación de la actividad amebicida de los extractos	54
7.9 Determinación de la actividad antirradical de los extractos	55
7.9.1 Evaluación de la actividad antioxidante	56
7.9.2 Preparación del estándar y extractos metanólicos	56
7.9.3 Reacción de neutralización del radical DPPH cuantificación de la actividad antioxidante	57
7.10 Separación de los extractos por métodos cromatográficos	57
7.10.1 Cromatografía en capa fina	57
7.10.2 Agentes cromogénicos	58
7.10.3 Cromatografía en columna al vacío	58
7.10.4 Métodos espectroscópicos	58
7.11 Análisis estadístico	58
7.11.1 Análisis (Probit)	59
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>60</b>
8.1 Recolección de las plantas e identificación del material vegetal	60

8.2 Obtención y rendimiento de los extractos a partir del material vegetal	60
8.3 Determinación de grupos funcionales y metabolitos secundarios	61
8.3.1 Prueba para la determinación de saponinas	62
8.4 Determinación de la actividad antibacteriana	63
8.5 Actividad antifúngica de los extractos sobre hongos dermatofitos	65
8.5.1 Análisis de varianza univariante relación hongos, extractos y medios de cultivo concentración 500 mg/mL	71
8.6 Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	72
8.7 Actividad antiamebiana	74
8.7.1 Cinética de crecimiento de <i>Entamoeba histolytica</i> en el medio PT	74
8.7.2 Determinación de la concentración inhibitoria media CI <sub>50</sub> de los extractos metanólicos sobre el cultivo axénico <i>in vitro</i> de <i>E. histolytica</i> .	75
8.7.3 Determinación del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos sobre el cultivo axénico <i>in vitro</i> de <i>E. histolytica</i> .	76
8.8 Actividad antiradical	80
8.8.1 Reacción de neutralización del radical DPPH	80
8.8.2 Determinación de la CE <sub>50</sub> de los extractos metanólicos	80
8.9 Cromatografía	81
8.9.1 Separación preliminar de los compuestos por cromatografía en columna al vacío	81
8.9.2 Rendimiento de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna al vacío	82
8.9.3 Cromatografía en capa fina <i>F. splendens</i> fracción acetónica obtenida por la separación de columna al vacío	83
8.9.4 Comprobación de la presencia de saponinas mediante una	84

cromatografía capa fina de las fracciones acetónica y metanólica de <i>F. splendens</i>	
8.9.5 Resultados de métodos espectroscópicos	85
8.9.5.1 Análisis por cromatografía de gases con detector de espectrómetro de masas (GC-MS) del extracto metanólico de tallo de <i>F. splendens</i>	85
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>88</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>93</b>
<b>11. LITERATURA CITADA</b>	<b>94</b>
<b>12. RESUMEN CURRICULAR</b>	<b>105</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Agrupación de los dermatofitos basados en la ecología y la preferencia del hospedero	30
II. Composición del medio PT	53
III. Porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos	61
IV. Identificación de grupos funcionales y metabolitos secundarios en los extractos metanólicos	62
V. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos	64
VI. Actividad antifúngica del extracto metanólico de <i>A. kotschoubeyanus</i> dosis del extracto 500 mg/mL	66
VII. Actividad antifúngica del extracto metanólico de <i>A. retusus</i> tallo dosis del extracto 500 mg/mL	66
VIII. Actividad antifúngica del extracto metanólico de <i>A. retusus</i> raíz dosis 500 mg/mL	66
IX. Actividad antifúngica del extracto metanólico de <i>F. splendens</i> dosis 500 mg/mL	67
X. Actividad antifúngica del extracto metanólico de <i>A. retusus</i> tallo dosis 250 y 150 mg/mL	69
XI. Actividad antifúngica del extracto metanólico de <i>F. splendens</i> dosis 250 y 150 mg/mL	69
XII. Análisis estadístico de varianza univariante de la actividad antifúngica de los extractos a la dosis 500 mg/mL	72
XIII. Actividad de los extractos metanólicos sobre la letalidad de nauplios de <i>Artemia salina</i>	73
XIV. Actividad de los extractos metanólicos sobre el cultivo axénico <i>in vitro</i> de <i>E. histolytica</i> HM1-IMSS	76
XV. Tratamientos que presentan diferencia significativa con respecto al control positivo y el porcentaje de inhibición	77
XVI. Diferentes aspectos morfológicos de trofozoítos de <i>E. histolytica</i> cultivados en presencia de los extractos evaluados	79
XVII. Actividad antirradical CE <sub>50</sub> de los extractos metanólicos	80
XVIII. Rendimiento de las fracciones obtenidas por VCL de los extractos metanólicos de <i>A. retusus</i> tallo y <i>F. splendens</i>	82
XIX. Bandas obtenidas de la fracción acetónica <i>F. splendens</i> y su respuesta a la luz UV CoCl <sub>2</sub> eluyente cloroformo-metanol (9:1)	84

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1 Planta de <i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	16
2 Distribución de <i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	17
3 Planta de <i>Ariocarpus retusus</i>	18
4 Distribución de <i>Ariocarpus retusus</i>	19
5 Planta de <i>Fouquieria splendens</i>	21
6 Distribución de <i>Fouquieria splendens</i>	23
7 Diagrama de flujo de la extracción metanólica de las especies	44
8 Diagrama de flujo de la determinación de la actividad antimicrobiana	49
9 Diagrama de flujo de la determinación de la actividad antifúngica	51
10 Diagrama de flujo para la determinación de la toxicidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	52
11 Diagrama de flujo de la determinación de la actividad amebicida.	55
12 Reducción del radical DPPH	56
13 Obtención de extractos metanólicos	60
14 Hemólisis en Agar sangre de los cuatro extractos metanólicos	63
15 Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos sobre <i>B. cereus</i>	64
16 Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos sobre <i>B. subtilis</i>	64
17 Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos sobre <i>E. coli</i>	65
18 Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos sobre <i>S. aureus</i>	65
19 Actividad de los extractos contra <i>M. gypseum</i> a una concentración de 500 mg/mL	67
20 Actividad de los extractos contra <i>T. tonsurans</i> a una concentración de 500 mg/mL	68
21 Actividad de los extractos contra <i>M. gypseum</i> a una concentración de 250, 125 mg/mL	70
22 Actividad de los extractos contra <i>T. tonsurans</i> a una concentración de 250, 125 mg/mL	71
23 Determinación cualitativa de actividad antirradical de los extractos metanólicos sobre DPPH	80
24 Cromatografía al vacío de los extractos metanólicos de <i>A. retusus</i> (tallo) y <i>F. splendens</i>	82
25 Separación cromatográfica de la fracción acetónica de <i>F. splendens</i> obtenida por cromatografía al vacío	83
26 Cromatograma comparativo de la fracción acetónica y metanólica de <i>F. splendens</i> (presencia de una saponina)	84
27 Espectro de masas del extracto metanólico de <i>F. splendens</i>	85

## LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica		Página
1	Análisis Probit curva dosis respuesta	39
2	DL <sub>50</sub> del extracto metanólico de <i>A. kotschoubeyanus</i> sobre <i>A. salina</i>	73
3	DL <sub>50</sub> del extracto metanólico de <i>A. retusus</i> (tallo) sobre <i>A. salina</i>	73
4	DL <sub>50</sub> del extracto metanólico de <i>A. retusus</i> (raíz) sobre <i>A. salina</i>	73
5	DL <sub>50</sub> del extracto metanólico de <i>F. splendens</i> sobre <i>A. salina</i>	73
6	Cinética de crecimiento de <i>E. histolytica</i> en el medio PT	74
7	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>A. kotschoubeyanus</i> sobre cultivos de <i>E. histolytica</i>	75
8	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>A. retusus</i> tallo sobre cultivos de <i>E. histolytica</i>	75
9	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>A. retusus</i> raíz sobre cultivos de <i>E. histolytica</i>	75
10	Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de <i>F. splendens</i> tallo sobre cultivos de <i>E. histolytica</i>	75
11	Viabilidad celular de <i>E. histolytica</i> con respecto a los extractos metanólicos	78
12	Porcentaje de inhibición celular con respecto a los extractos metanólicos	78
13	R <sup>2</sup> de las concentraciones de la vitamina “C” con respecto al DPPH	81

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>AK</b>	<i>A. kotschoubeyanus</i> extracto metanólico
<b>AMH</b>	Agar Mueller Hinton
<b>APD</b>	Agar papa dextrosa
<b>ARR</b>	<i>A. retusus</i> raíz extracto metanólico
<b>ART</b>	<i>A. retusus</i> tallo extracto metanólico
<b>Br<sub>2</sub>/CCl<sub>4</sub></b>	Bromo en tetracloruro de carbono
<b>°C</b>	Grados Celcius
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media
<b>d</b>	Días
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis letal media
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DPPH</b>	1,1-Difenil-2-picrilhidrazil
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva media
<b>EHP</b>	Extracto de hígado y páncreas
<i>et al</i>	Y colaboradores
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Cloruro de Hierro (III)
<b>Fig.</b>	Figura
<b>FS</b>	<i>F. splendens</i> extracto metanólico
<b>g</b>	Gramo
<b>h</b>	Hora
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Ácido sulfúrico
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato dibásico de potasio
<b>KH<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato monobásico de potasio
<b>KI</b>	Yoduro de potasio
<b>KMnO<sub>4</sub></b>	Permanganato de potasio
<b>KNO<sub>3</sub></b>	Nitrato de potasio
<b>m</b>	Metro
<b>MCR</b>	Medio C. Rivas
<b>μ</b>	Micra
<b>μg</b>	Microgramo
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>mg</b>	Miligramos
<b>Mg</b>	Magnesio
<b>mg/L</b>	Miligramos por litro
<b>mg/mL</b>	Miligramos por mililitro
<b>min</b>	Minuto

<b>mm</b>	Milímetro
<b>msnm</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>N</b>	Normalidad
<b>N°</b>	Número
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>PT</b>	Medio PT
<b>Rf</b>	Relación de frente
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundos
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonias
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>VCL</b>	Cromatografía de líquidos al vacío

## 1. RESUMEN

Las enfermedades han tomado gran importancia en los últimos años debido al costo que ellas representan para contrarrestarlas con la aplicación de tratamientos quimioterapéuticos. La búsqueda de nuevos antimicrobianos, antifúngicos y antihelmínticos se ha realizado en una amplia diversidad de plantas. En el presente trabajo se realizó un estudio biológico utilizando extractos metanólicos de las plantas *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus* y *Fouquieria splendens*, nativas de la región, con la finalidad de encontrar metabolitos secundarios que tengan actividad biológica, como posible alternativa terapéutica. Para la identificación química se utilizaron pruebas para grupos funcionales. La determinación de la actividad antimicrobiana y antifúngica se realizó por el método de difusión en placa con discos de papel filtro, se utilizó el bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina* para evaluar la actividad toxica, se realizaron curvas dosis-respuesta para determinar la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) sobre el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS, para determinar la actividad antirradical se utilizó el análisis de reducción de DPPH. Los resultados para la identificación de grupos funcionales fueron positivos para: insaturaciones, grupos carbonilo, oxidrilos fenólicos, esteroides y metilesteroides, cumarinas, sesquiterpenlactonas, saponinas, flavonoides en las tres especies. La presencia de alcaloides fue positiva para los extractos de las especies de *Ariocarpus*, solamente el extracto de *Ariocarpus retusus* raíz presentó grupos aromáticos. En cuanto a la actividad antibacteriana, el extracto de *Fouquieria splendens*, presentó la más relevante al inhibir el crecimiento de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, ningún extracto mostró actividad contra *Salmonella typhi*. Los extractos metanólicos de *Ariocarpus retusus* (tallo) y *Fouquieria splendens* presentaron mayor inhibición antifúngica en las tres dosis probadas; con todas las especies de dermatofitos en estudio. *Ariocarpus retusus* (tallo) presentó mayor actividad amebicida con una CI<sub>50</sub> de 0.2 µg/mL. *Fouquieria splendens* presentó la mejor actividad antioxidante con una CE<sub>50</sub> de 130.2 µg/mL. Se lograron aislar algunas fracciones de los extractos de *Ariocarpus retusus* y *Fouquieria splendens*. Se identificó por cromatografía en capa fina una saponina en el extracto de *Fouquieria splendens*, y por cromatografía de gases acoplada a espectroscopia de masas se identificó la 4-hidroxi-2metil-2-ciclopentenona.

## 1.1 ABSTRACT

Diseases have taken great importance in recent years owing to the cost that they represent to counter with the implementation of chemotherapy treatments. Search for new antimicrobials, antifungals and antihelmintics has been done in a wide variety of plants. In this work was carried out a study using methanolic extracts of the plants *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus* and *Fouquieria splendens*, natives of the region, with the aim of finding secondary metabolites that have biological activity, as a possible therapeutic alternative. For the chemical identification was used tests for functional groups, the determination of the antimicrobial and antifungic activity was used the method of dissemination in plate with discs of filter paper, was used the toxicity bioassay on nauplios of *Artemia salina* to assess the toxic activity, were carried out curves dose-response to determine the inhibitory concentration average (IC<sub>50</sub>) on the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS, to determine the antirradic activity was used the analysis of reduction of DPPH. Evidence for functional groups gave positive results for insaturations, carbonyl groups, phenolics oxhidrils, sterols and methylsterols, coumarines, sesquiterpenlactones, saponins and flavonoids in all species. Presence of alkaloids was only positive for *Ariocarpus* species. *Ariocarpus retusus* (root) present aromatic groups. For antimicrobial activity extract of *Fouquieria splendens* was better to inhibit growth of *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* was resistant for all extracts. Methanolic extracts of *Ariocarpus retusus* (root) and *Fouquieria splendens* presented greater antifungal inhibition in three doses tested over all species of dermatophytes study. *Ariocarpus retusus* (stem) presents amoebicid activity with a IC<sub>50</sub> of 0.2 µg/mL. *Fouquieria splendens* showed the best antioxidant activity with a EC<sub>50</sub> of 130.2 µg/mL. By thin layer chromatography was identified a saponin from *Fouquieria splendens* extract and also a compound identified by gas chromatography coupled mass spectroscopy as 4-hydroxy-2methyl-2-cyclopentenone.

## 2. INTRODUCCIÓN

El estudio de las sustancias de origen natural para uso y beneficio del hombre ha ido de la mano con la evolución del mismo, las plantas presentan un gran acervo de sustancias, que hoy son una importante fuente de donde obtener diversos fármacos a través de sofisticados sistemas de cultivo y extracción. Cada día se presta más atención al estudio de las plantas medicinales, de forma tal que la etnobotánica y la fitoterapia están tomando un gran auge en el mundo actual, tanto en la medicina aplicada como en la investigación experimental. El 80 % de la población mundial, aproximadamente unos 4 mil millones de personas, utiliza a las plantas como principal remedio medicinal en muchas de sus enfermedades. Llama la atención la creciente demanda de esta terapia sobre todo en los países de mayor desarrollo donde resurge la necesidad de lo natural y el rechazo a una medicina iatrogénica; por su parte en los países de menor desarrollo constituye un recurso ancestral transmitido de generación en generación como parte de las tradiciones enraizadas en cada uno de ellos (Martínez, 2000).

Las especies de plantas conocidas oscilan alrededor de 500,000. Esta riqueza es un recurso que no se aprovecha totalmente, a pesar de que su uso en el tratamiento de diversas enfermedades es ancestral. Dicha costumbre se ha conservado hasta nuestros días, principalmente en poblaciones rurales, lo que ha permitido acumular un amplio conocimiento etno-farmacológico, punto importante de partida en las investigaciones dirigidas a la búsqueda de productos naturales con actividad biológica (Mesa *et al.*, 2004).

Numerosas son las investigaciones enfocadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un gran número de estudios han sido dirigidos hacia la evaluación de actividades

antibacterianas, antifúngicas y antiprotozoas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Para ello, se han empleado técnicas *in vitro* dada la sencillez y la reproducibilidad de las mismas (Hernández y Rodríguez, 2001).

Por lo cual uno de los puntos más importantes en el estudio de las plantas medicinales es realizar análisis químicos y determinar su actividad biológica para de esta manera contribuir con validez científica al uso de las mismas como tratamiento (Huacuja, 1995). La importancia de los productos naturales en medicina, se basa no solamente en sus efectos farmacológicos o quimioterapéuticos, sino en la posibilidad que ofrecen para poder desarrollar a partir de sus estructuras nuevas drogas, las cuales no deben ser más tóxicas para los órganos del ser humano que para el microorganismo a tratar (Phillipson, 1994). Por lo cual México ha ido sumándose a la corriente mundial en la búsqueda de nuevos compuestos y a lo largo del país existen instituciones científicas que se dedican a la búsqueda de diferentes actividades farmacológicas dentro del reino vegetal para lo cual la riqueza de la flora mexicana ofrece inagotables posibilidades. En base a lo anterior y con el objetivo de encontrar nuevas fuentes de metabolitos secundarios con esta actividad se seleccionaron las siguientes especies para su estudio: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus* y *Fouquieria splendens*, plantas del noreste de México adaptadas a condiciones de sequía, que han sido poco estudiadas en cuanto a sus aplicaciones terapéuticas.

### 3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Debido a la incidencia de las infecciones y la resistencia farmacológica adquirida que han demostrado varias especies de microorganismos en la práctica médica dentro de los cuales encontramos bacterias, hongos, virus y parásitos, existe en la actualidad una marcada tendencia a la investigación y búsqueda de nuevas drogas de origen natural que sean capaces de ayudar a eliminar estos microorganismos con menores efectos secundarios indeseables.

Por los motivos anteriormente expuestos, en esta investigación consideramos relevante la evaluación de la actividad biológica de las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus* (Familia Cactácea) y *Fouquieria splendens* (Familia Fouquieriaceae), las cuales se encuentran distribuidas en nuestra región y han sido usadas por la medicina tradicional en algunos padecimientos infecciosos, lo que nos permitirá validar científicamente su uso.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los metabolitos secundarios encontrados en las plantas *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus* y *Fouquieria splendens*, presentan actividad biológica sobre bacterias, hongos dermatofitos y protozoarios de importancia médica.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Determinar la actividad biológica de los extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus* y *Fouquieria splendens*, sobre el crecimiento de bacterias, hongos dermatofitos y protozoarios de importancia médica, así como evaluar su capacidad antioxidante.

### 5.2 Objetivos particulares

- Realizar la colecta e identificación de las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Ariocarpus retusus* y *Fouquieria splendens*.
- Obtener los extractos metanólicos de *A. kotschoubeyanus*, *A. retusus* y *F. splendens*, por el método de agitación continua a temperatura ambiente.
- Determinar los metabolitos presentes en las especies, mediante el uso de pruebas para la identificación química de grupos funcionales.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos obtenidos de las especies en estudio sobre bacterias de importancia médica *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos, sobre hongos dermatofitos de importancia médica *Microsporium gypseum*, *Microsporium nanum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporium canis*, *Microsporium cookei*.
- Evaluar la toxicidad de los extractos de las especies seleccionadas con el ensayo de *Artemia salina*.
- Evaluar la actividad amebicida de los extractos sobre la cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica*, cultivada en condiciones axénicas *in vitro*.
- Evaluar la actividad antiradical de los extractos por el método de reducción del radical DPPH.

- Separar por métodos cromatográficos las fracciones de estos extractos.
- Identificar por métodos espectroscópicos los compuestos presentes en las fracciones activas.

## 6. ANTECEDENTES

### 6.1 Generalidades

La fitoterapia, tiene sus orígenes en los albores de la humanidad, desde que aparecen registros o referencias confiables. El estudio de los componentes de las plantas medicinales se centra en las sustancias que ejercen una acción farmacológica. En China y el resto de Asia, el uso de las plantas para tratar enfermedades se remonta a más de 10 mil años. Sin embargo, fueron los griegos y romanos los primeros en sistematizar en occidente, a través de sus escritos. Las plantas medicinales en la opinión de los especialistas, "son todas aquellas que contienen, en alguno de sus órganos, principios activos, los cuales administrados en dosis suficientes producen efectos curativos en las enfermedades del hombre y los animales en general". De hecho, existen alrededor de 260,000 de estas especies que se conocen en la actualidad, de las cuales el 10 % se pueden considerar medicinales, es decir, se encuentran citadas en los tratados médicos de fitoterapia modernos y de épocas pasadas, por presentar algún uso (Paladín, 1996).

La industria farmacéutica atiende la salud del 36 % de la población mundial con drogas sintéticas obtenidas a partir de productos naturales, principalmente plantas. Esta empresa, moviliza más de 100,000 millones de dólares por año. El resto de los habitantes del planeta 64 % de la población no tiene acceso a tales medicinas y utiliza regularmente, para tratar sus enfermedades plantas con supuestas propiedades medicinales. Los científicos aprovechan tal conocimiento para buscar productos con potencial terapéutico, tarea que las nuevas tecnologías y avances en el conocimiento del modo de actuar de las medicinas están haciendo cada vez más eficiente. Es así como existe un importante acervo tradicional de sabiduría popular, aprovechado por los sectores académico e industrial para descubrir y establecer el potencial terapéutico de productos naturales (Paladín, 1996).

Un estudio realizado en 1985, que recibió apoyo de la Organización Mundial de la Salud, identificó 119 sustancias, aisladas de plantas superiores, que los países desarrollados usaban como medicamentos. Ese número de drogas todavía se extrae comercialmente de alrededor de 90 especies de tales plantas, pero, dado que existen más de 250,000 especies de ellas en el planeta, y que se ignora el potencial médico de por lo menos el 95 %, el sentido común indica que numerosas sustancias utilizables como medicamentos aún esperan ser descubiertas. En la actualidad, la búsqueda de productos naturales con atributos terapéuticos se ha acelerado, aprovechando indicios proporcionados por ciertos grupos étnicos, que tradicionalmente asignan cualidades curativas a plantas y otros compuestos naturales, lo cual dio origen a la etnobotánica y la etnofarmacología. A ello se suman los avances en la automatización de las pruebas farmacológicas, que permiten realizar hasta cincuenta mil ensayos *in vitro* por mes, y el empleo, para identificar sustancias activas, de receptores específicos y de cultivos de células. En todos los casos, lo que se busca es información sobre sustancias activas llamadas líderes, las que luego se intenta transformar en drogas útiles sometiénolas a modificaciones químicas (Paladín, 1996).

Hoy, se tiende a pensar que la medicina solo progresará por el camino de la innovación biotecnológica. Sin duda, se pueden depositar grandes esperanzas en la creación de drogas por medio de diseños racionales, pero para ello, sin embargo, no podrá reemplazar a la prospección química. Innumerables productos están aún por ser descubiertos; entre ellos, compuestos con características moleculares que no podrían haber sido predichas, como algunas sustancias medicinales más recientes. Por ejemplo la ivermectina, aislada de un hongo, es uno de los antihelmínticos más eficaces que existen y que genera ventas por alrededor de mil millones de dólares anuales a la compañía que la produce. Su estructura química no hubiese podido ser diseñada a partir de los conocimientos actuales acerca de compuestos bioactivos. Lo mismo vale para la ciclosporina y para el FK 506, sustancias provenientes de hongos que suprimen la respuesta inmune, utilizadas para evitar el rechazo de órganos transplantados, y para el taxol, conocido agente antitumoral extraído de un árbol del noroeste de los Estados Unidos, el tejo (*Taxus baccata*). No existen maneras de predecir lo que encontrará la

prospección química, pero se tiene la certeza de que la búsqueda rendirá sus frutos, ya que la mayor parte de las especies no han sido estudiadas químicamente (Eisner y Niemeyer, 1996).

Los principios activos de las plantas pueden ser sustancias simples (como alcaloides), o bien mezclas complejas (resinas o aceites esenciales). Los compuestos más comunes son las azúcares y heterósidos. Otros componentes activos de las plantas son lípidos, gomas, mucílagos, principios amargos, taninos, aceites esenciales, resinas, bálsamos, oleorresinas, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas (Paladín, 1996).

## **6.2 Aspectos generales de la familia Cactaceae**

Las regiones áridas y semiáridas cubren aproximadamente el 40 % de la superficie de la tierra. En México, estas zonas ocupan el 52.5% de la superficie total del país (Pimienta, 1999). Una de las familias que representa mejor a la flora de estas regiones es la cactácea; es endémica de América y se caracteriza por su peculiar adaptación a la escasez de agua (Rojas y Vázquez, 2000).

La familia Cactaceae tiene alrededor de 200 géneros y 2000 especies (Cronquist, 1981). Se distinguen del resto de los vegetales por ciertos caracteres anatómicos y fisiológicos, tales como su estructura crasa, reducción del limbo de las hojas, hipertrofia del pecíolo hasta su transformación en un podario o tubérculo, modificación de las yemas hasta su conformación en aréolas, espinación diversa y un metabolismo de tipo ácido crasuláceo (CAM). Son plantas suculentas, de ordinario espinosas, con hojas muy reducidas o ausentes, con raíces provenientes de la radícula del embrión, los tallos son del tipo xerofítico y pueden ser simples y uniarticulados o multiarticulados y ramificados. La familia presenta las más variadas formas de tallos parecidos a raquetas, cilindroides, columnares, globosos, provistos de tubérculos o costillas, y generalmente cubiertas por espinas. El carácter más distintivo de las cactáceas, es la presencia de órganos llamados aréolas (órganos situados en los tallos), los cuales no son sino yemas que dan lugar a hojas reducidas, flores, nuevos tallos, y además espinas, gloquídeas, cerdas y pelos (Bravo, 1997).

Los géneros más importantes en número de especies y frecuencia son *Echinocereus* y *Opuntia*, (González y Estrada, 2001). En una extensa revisión bibliográfica se encontró que las cactáceas se usan como alimento, combustibles, curtientes, materiales para construcción, medicinas, selladores, así como en juegos tradicionales y en actividades espirituales por diversos grupos indígenas. Aunque la mayoría de los frutos de las cactáceas son comestibles, algunos son preferidos en ciertas zonas de Sonora como *Stenocereus gummosus* (pitaya agria), *S. montanus* (sahuira) y *S. thurberi* (pitaya) (Reina, y Thomas, 2001), en Nuevo León, *Echinocereus stramineus* (Pitaya fresa) y *Stenocereus pruinosus*, (Pitayo). Hay muchas otras que son utilizadas por sus poderes alucinógenos y curativos como el peyote *Lophophora williamsi*, el falso peyote *Ariocarpus fissuratus*, algunos *Stenocereus* y el *Echinopsis pachanoi* (cactus de San Pedro) que presentan alcaloides que causan los efectos mencionados y son muy utilizados como medicamentos en la cultura tradicional y que seguramente presentan compuestos que la comunidad desconoce pero ha servido por mucho tiempo para curarse de diversas enfermedades. La farmacognosia es la ciencia que se ocupa del estudio de las drogas y las sustancias medicinales de origen natural y dentro del grupo de las cactáceas pueden existir un gran número de compuestos químicos con propiedades terapéuticas, y con sustancias tóxicas que todavía se desconocen por lo que éste trabajo pretende buscar nuevos compuestos que puedan contribuir en el control de enfermedades.

### **6.3 Características químicas de la familia Cactaceae**

Las cactáceas son un grupo de vegetales que presentan un gran número de compuestos debido a sus complicados procesos metabólicos. A continuación se enumeran algunos: el agua es uno de los constituyentes principales de las cactáceas reportando varios autores, concentraciones que van desde 74 % a 94 % de su peso total. La composición de sales minerales es muy variable, no tan sólo entre las distintas especies, sino que también entre individuos de la misma especie, ya que dependen, en parte, de la composición química del suelo y de los complicados fenómenos de la disponibilidad de ellos para la planta relacionados con la acidez, salinidad,

conductividad, grado de disociación o ionización, humedad y textura de los suelos (Bravo y Sánchez, 1978).

Maldonado, (2008) menciona que en *Stenocereus pruinosus*, *A. kotschoubeyanus* y *E. stramineus*, las pruebas para grupos funcionales nos indican la presencia de insaturaciones, oxidrilos fenólicos, alcaloides y antioxidantes en los extractos metanólicos de las tres especies.

Garza *et al.*, (2004) obtuvieron extractos con solventes de polaridad creciente de "nopal estrella" *Acanthocereus occidentalis* y realizaron un estudio fitoquímico que indicó la presencia de insaturaciones, oxidrilos fenólicos, esteroides, triterpenos, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, flavonas y alcaloides para esta especie.

Morales *et al.*, (2004) encontraron que la pitaya agria, cactácea que se distribuye en Baja California y en la costa de Sonora, presenta diversos usos en la medicina tradicional para combatir algunas enfermedades como úlceras y diversos tipos de cáncer. Obtuvo extractos de polaridad creciente a partir de tallos y frutos. Los resultados del estudio fitoquímico de los tallos, indicaron la presencia de compuestos como: esteroides, carbohidratos, sesquiterpenlactonas, flavonas y alcaloides; mientras que en los frutos se encontraron flavonas y leucoantocianinas (antioxidantes naturales), saponinas y alcaloides, concluyendo que estos compuestos pueden ser una alternativa para ser utilizados en la industria alimentaria, cosmetológica y farmacéutica.

### **6.3.1 Compuestos químicos presentes en plantas**

#### **6.3.1.1 Alcaloides**

Las plantas alcaloideas proporcionan productos de singulares características: estimulantes, alucinógenas, venenos, antipiréticos, anestésicos, antiespasmódicos, expectorantes, vasoconstrictores, hipotensores, reguladores cardíacos. Por esta razón estas plantas presentan un gran interés desde el punto de vista farmacológico, quimiotaxonómico y botánico.

Los alcaloides son bastante frecuentes en la familia cactácea; de unas 150 especies estudiadas cerca de 100 han dado positivas a las pruebas para alcaloides, los que se han identificado por técnicas de cromatografía comparativa o de cromatografía gaseosa-espectrometría de masas. El que los alcaloides de esta familia sean derivados de la  $\beta$ -feniletilamina o de la tetrahidroisoquinolina, es de gran importancia quimiotaconómica, además de su trascendencia bioquímica.

Los huicholes, yanquis, apaches, tarahumaras y otras tribus indígenas de México y Estados Unidos, han usado el peyote (*Lophophora williamsii*), dentro de sus ritos religiosos, como alucinógeno. Estas propiedades despertaron el interés en el estudio químico de esta planta, eventualmente se han aislado cuarenta y siete alcaloides, de los cuales la mezcalina produce alucinaciones. La mezcalina y algunos de sus análogos se han encontrado en unas 40 cactáceas, incluyendo especies de los géneros *Opuntia*, *Trichocereus* y *Ariocarpus*. Se ha demostrado que tanto la mezcalina como sus análogos de la tetrahidroisoquinolina se forman en la planta a partir del aminoácido tirosina (Domínguez y Domínguez, 1976)

### 6.3.1.2 Flavonoides y otros compuestos fenólicos

De algunas cactáceas se han aislado varios flavonoides libres y como glicósidos particularmente la quercetina y sus derivados, estos flavonoides se han separado principalmente de las flores. Así en *Opuntia vulgaris* se encontró un flavonósido. De las flores de *O. ficus-indica* se extrajo isorhamnetina. Del tallo de *Ariocarpus retusus* se separó la retusina (Domínguez y Domínguez, 1976).

Domínguez *et al.*, (1969) obtuvieron flavonoides en las especies: *Ariocarpus retusus*, *Echinocereus grandis*, *Ferrocactus pringlei*, *Echinocereus merkeri* y *Cephalocereus hoppenstedtii*.

Los taninos son un grupo heterogéneo de compuestos polihidroxifenólicos; el estudio químico preliminar de 31 cactáceas mexicanas (Domínguez *et al.*, 1969), reveló

la presencia de taninos en las especies *Ariocarpus retusus*, *Lophophora williamsii* y *Epithelantha micromeris* por mencionar algunas.

### **6.3.1.3 Triterpenos, Saponinas y Esteroides**

No se han encontrado mono, sesqui y diterpenoides en las cactáceas, pero si triterpenoides, como alcoholes y ácidos triterpénicos, también unidos a carbohidratos formando saponinas. El  $\beta$ -sitosterol es ubicuo en las cactáceas, algunas de las cuales también tienen estigmasterol y estigmasten-ol. Las cactáceas son los únicos vegetales que tienen derivados como el itesmól del colesterol que es característico de los animales (Domínguez y Domínguez, 1976).

### **6.3.1.4 Carbohidratos, gomas, ácidos orgánicos y aceites**

Domínguez (1969), reporta haber encontrado azúcares en 31 especies de cactáceas estudiadas, pero la cantidad de ellos contenida en *Mammillaria multiceps* era muy superior que en las demás especies; en *Ariocarpus retusus* se identificó fructosa. Los tejidos de las cactáceas son ricos en sustancias mucilaginosas y en gomas. La lignina parece estar ausente en estas plantas, aunque se ha encontrado que el saguaro (*Carnegiea gigantea*) presenta lignina al dar positiva la prueba del nitrobenzeno. Se han estudiado la composición de algunas de las gomas de los cactus, así la goma de cholla (*Opuntia julgida*) da por hidrólisis arabinosa, xilosa, galactosa y ácido galacturónico. Las cactáceas tienden a acumular oxalato de calcio; por métodos enzimáticos se ha encontrado ácido cítrico en las especies de *Cereus*, *Echinocereus* y *Opuntia* (Domínguez y Domínguez, 1976).

#### 6.4 Descripción de la especie *Ariocarpus kotschoubeyanus*

*Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) Schumann in Engler et Prantl, Pflanzenf. Nachtr. 259, 1897. Nombre vulgar “pezuña de venado”, “pata de venado”.

Ubicación Taxonómica de *Ariocarpus kotschoubeyanus*

ORDEN: Cactales

FAMILIA: Cactaceae

SUBFAMILIA: Cactoideae

TRIBU: Cactae

SUBTRIBU: Thelocactinae

GENERO: *Ariocarpus*

SUBGENERO: *Roseocactus*

ESPECIE: *A. kotschoubeyanus*

##### 6.4.1 Descripción botánica de *Ariocarpus kotschoubeyanus*

Es una planta simple. Tallo ancho napiforme, casi enterrado, con la porción aérea apenas emergiendo de la superficie del suelo, de unos 7 cm de diámetro; porción subterránea anchamente napiforme, casi globosa, gruesa y carnosa, con algunas raíces gruesas y fibrosas (Figura 1). Tubérculos dispuestos en 5 y 8



Figura 1. *Ariocarpus kotschoubeyanus*

series espiraladas, aquillados dorsalmente, con la superficie ventral aplanada y rugosa, triangulares, agudos, relativamente pequeños para el género, casi tan largos como anchos, de 5 a 13 mm de longitud y 3 a 10 mm de anchura, llevando el surco longitudinal medio desde la punta hasta la base del tubérculo, lanoso; superficie de color verde grisáceo (Bravo y Sánchez, 1991). Aréolas floríferas situadas en el surco areolar en la base de los tubérculos, provistas de abundantes tricomas largos y sedosos. Flores brotando de las aréolas floríferas de los tubérculos jóvenes en el ápice del tallo, de 2.5 a 3 cm de longitud; pericarpelo y receptáculo desnudos; segmentos exteriores del perianto escasos, obtusos, verdosos con tinte castaño; segmentos interiores del perianto

oblanceolados, obtusos o apiculados, a veces algo retusos, de cerca de 2 cm de longitud, de color rosa claro hasta carmín, con la franja media más oscura; filamentos blancos; anteras pequeñas, amarillas; granos de polen entre 60 y 65 micras de diámetro; estilo blanco; lóbulos del estigma 4 a 6, blancos. Fruto claviforme, de 5 a 18 mm de longitud y 1 a 3 mm de diámetro, rojizo hasta rosado. Semillas de 1 mm de longitud, ovoides, negras y tuberculadas.

#### 6.4.2 Distribución de la especie *Ariocarpus kotschoubeyanus*

Se encuentra distribuida en los estados de Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas, Nuevo León y Tamaulipas, creciendo en planicies y colinas bajas, ya sea en suelos calcáreos y pedregosos o arcillosos. Anderson y Bravo, la han encontrado en una planicie aluvial situada cerca de entronque El Huizache, San Luis Potosí (Figura 2) (<http://www.living-rocks.com/distribution/kotsmap.htm>). Meyrán y Sánchez la citan de una meseta cerca del borde de la barranca del Infiernillo, en Querétaro, y Glass indica haberla encontrado en San Hipólito, a 29 km de W de Saltillo, Coahuila, creciendo juntamente con *Epithelantha micromeris* var. *greggii*, *Coryphantha poselgariana*, *Mammillaria rosealba*, *Opuntia moelleri*, *Astrophytum capricorne* y *Leuchtenbergia principis* (Bravo y Sánchez, 1991).



Figura 2. Distribución de *Ariocarpus kotschoubeyanus*.

## 6.5 Descripción de la especie *Ariocarpus retusus*

*Ariocarpus retusus* Scheidweiler, Bull. Acad. Sci. Brux. 5: 492, 1838. Nombre vulgar “chaute”, “peyote cimarrón”.

Ubicación Taxonómica de *Ariocarpus retusus*

ORDEN: Cactales

FAMILIA: Cactaceae

SUBFAMILIA: Cactoideae

TRIBU: Cactae

SUBTRIBU: Thelocactinae

GENERO: *Ariocarpus*

SUBGENERO: *Ariocarpus*

ESPECIE: *A. Retusus*

### 6.5.1 Descripción botánica de *Ariocarpus retusus*

Plantas de 12 cm de altura y 10 a 25 cm de diámetro, de color verde azulado o grisáceo tallos muy enterrados y globosos. Tubérculos triangulares, atenuados hacia el ápice, a veces con éste prolongado en forma de un mucrón angostamente cónico, superficie convexa o casi plana, algo indulada y más o menos



Figura 3. *Ariocarpus retusus*

arrugada, no fisurados, de 1.5 a 4 cm de longitud y 1 a 3.5 cm de anchura, casi tan largos como anchos (Figura 3). Aréolas espiníferas en la punta de los tubérculos o casi así, muy pequeñas, circulares, como de 1 a 5 mm de diámetro, con algo de lana y a veces con algunas espinas diminutas; aréolas floríferas cerca de la axila de los tubérculos y lanosas. Flores en las aréolas floríferas de los tubérculos jóvenes del ápice de la planta, de 4 a 5 cm de diámetro, y hasta 4.5 cm de longitud; segmentos exteriores del perianto blanquecinos, ocasionalmente con la línea media rojiza, de 1.2 a 2 cm de longitud y 5 a 8 mm de anchura, segmentos interiores del perianto lanceolados, acuminados, como de 2 cm de longitud y 5 a 9 mm de anchura; estambres numerosos; filamentos blanquecinos;

anteras de color amarillo oro; granos de polen entre 80 y 85 micras; estilo blanco; lóbulos del estigma 7 ó más. Fruto ovoide, de 10 a 25 mm de longitud, blanco verdoso hasta rosado pálido, liso ampliamente umbilicado, conserva los restos secos del perianto (Bravo y Sánchez, 1991).

### 6.5.2 Distribución de la especie *Ariocarpus retusus*

Se encuentra distribuida en los estados de Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, Tamaulipas y San Luis Potosí. Ha sido colectada cerca de Saltillo, Coahuila, Monterrey; Nuevo León; Hacienda de Cedros, Zacatecas; Valle de Jaumave, Tamaulipas; Matehuala y San Luis Potosí (Figura 4) (<http://www.living-rocks.com/distribution/retmap.htm>). Crece en colinas calizas y pedregosas, rara vez yesosas, en matorrales rosetófilos donde son comunes: *Agave stricta*, *Yucca carnerosana*, *Dasyllirion sp.* (Bravo y Sánchez, 1991).

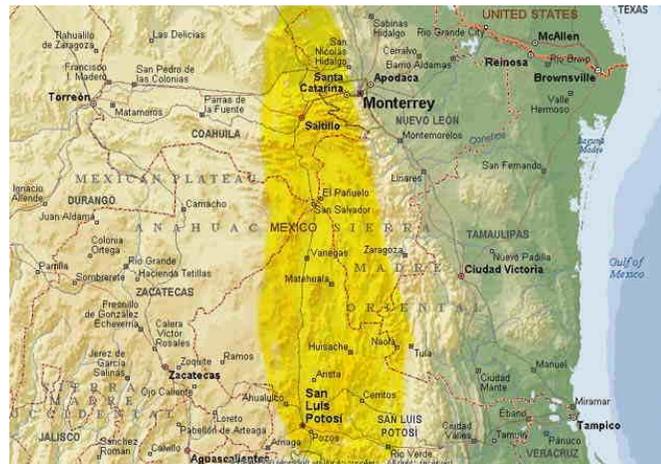


Figura 4. Distribución de *Ariocarpus retusus*.

### 6.6 Aspectos Generales de la familia Fouquieriaceae

La familia Fouquieriaceae es una familia pequeña restringida a las zonas áridas de México y el suroeste de Estados Unidos, está compuesta por pequeños árboles y arbustos leñosos así como por tres especies suculentas con reservorios de agua en el xilema esparcidos ampliamente. Las ramas de Fouquieria permanecen sin hojas la mayor

parte del tiempo, la producción de brotes largos requiere de una gran inversión de energía y su formación depende de una adecuada provisión de humedad durante el periodo de desarrollo; si la humedad es insuficiente, el desarrollo de brotes largos puede detenerse en forma temprana o morir completamente. Los brotes pequeños, por otro lado, pueden producir fascículos de hojas poco después de una lluvia sin invertir una gran cantidad de energía. Si la humedad está disponible solo por periodos cortos, las hojas se caen y otra serie de hojas se produce pronto, después de la siguiente lluvia (Henrickson, 1972).

### **6.6.1 Actividad biológica de la familia Fouquieriaceae**

La tintura del tallo fresco de *Fouquieria splendens* comúnmente llamado ocotillo es usado en casos de circulación pobre en el área pélvica, la cual es usualmente acompañada por una gran sensación de congestión, ligera hinchazón abdominal, hemorroides, hiperplasia de la próstata o el frecuente estímulo de orinar, causados por la congestión venosa del área pélvica (Moore, 1989). Otras aplicaciones son: ayudar a la asimilación de grasas y mejora la circulación haciéndola más eficiente al remover las grasas. Ayuda a aliviar la tos, venas varicosas, infecciones de tracto urinario; controla el dolor premenstrual y el dolor uterino causado por la congestión (Moore, 1989). Las flores de *Fouquieria formosa* comúnmente llamada cascarilla se utilizan en cocción administradas por vía oral para el tratamiento de la tos y resfriados (Soto, 1995).

## 6.7 Descripción de la especie *Fouquieria splendens*

*Fouquieria splendens* Engel. in Wisliz., Mem. Tour North. México, p. 98. 1848. Nombre vulgar “Ocotillo”, “Rotilla”, “Albarda”.

Ubicación Taxonómica de *Fouquieria splendens*

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliophyta

SUBCLASE: Asteridae

ORDEN: Magnoliopsida

FAMILIA: Fouquieriaceae

GÉNERO: *Fouquieria*

ESPECIE: *F. splendens*

### 6.7.1 Descripción botánica de *Fouquieria splendens*

Arbusto o árbol bajo, de 2 a 10 m de altura, tronco basal corto, de 15 a 25 cm de diámetro, ramificado cerca de la base en 6 a 30 tallos erectos o recurvados, corteza externa verde a café-amarillenta, exfoliante en pequeñas tiras (Figura 5), espinas de 15 a 25 mm de largo, rectas o curvas; hojas de los brotes cortos 4 a 11,



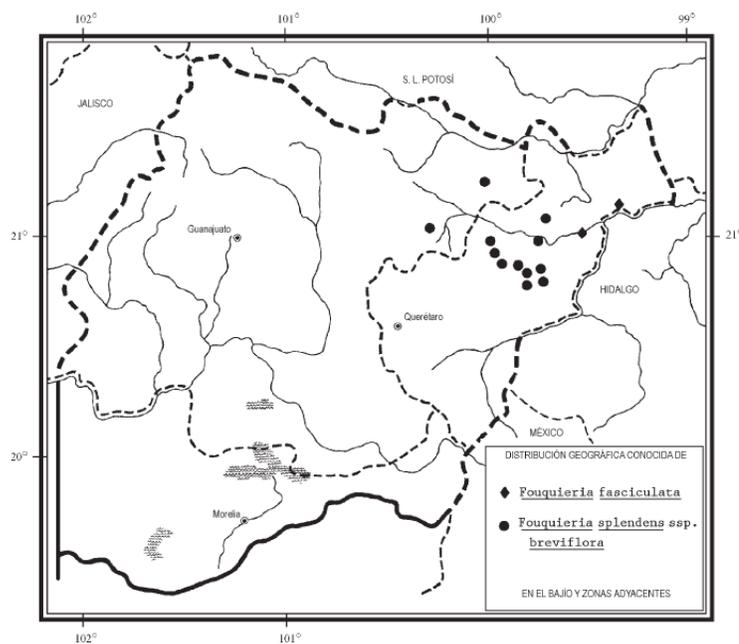
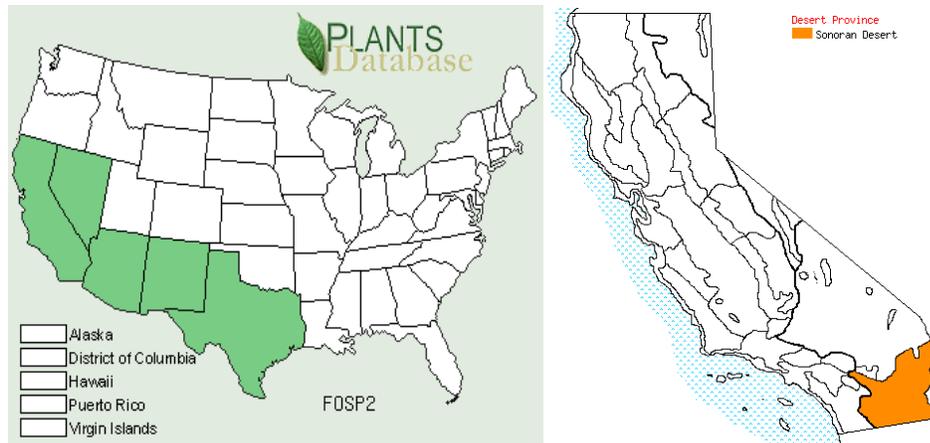
**Figura 5.** *Fouquieria splendens*

lineares patuladas ampliamente obovadas, de 17 a 35 mm de largo, por 5 a 11 mm de ancho, agudas a redondeadas y emarginadas en el ápice, cuneadas en la base; panícula estrechamente cónica a cilíndrica, de 10 a 20 cm de longitud, raquis de color púrpura a rojizo; sépalos anaranjado-rojizos, rosados a blanco-amarillentos, ampliamente ovados, oblongos a casi reniformes, de 4.5 a 6 mm de longitud, 3.5 a 5.5 mm de ancho, obtusos emarginados en el ápice; corola anaranjado-rojiza, rosado purpúrea, rosado-amarillenta a amarilla clara, de 10.5 a 28 mm de largo, tubo de 6.5 a 22 mm de largo, por 3.5 a 6 mm de ancho en la garganta, pubescente en su interior con una banda de 2 a 5 mm de pelos

unicelulares cerca de la base, lóbulos fuertemente reflejos, de 4.5 a 7 mm de longitud y 3.5 a 5 mm de ancho, ampliamente ovados a elípticos; estambres 14 a 16, filamentos de 12 a 25 mm de largo, ensanchados en la base, con un espolón truncado adaxial de 1.5 mm de largo, anteras de 4 a 5 mm de largo; ovario de 1.5 a 2 mm de alto, óvulos 12 a 16, estilo de 8.5 a 32 mm de largo; cápsulas lanceoladas a ovado-lanceoladas en contorno, de 14 a 22 mm de longitud y 5 a 7 mm de diámetro; semillas 5 a 13, blancas, de 7 a 13 mm de longitud, 4 a 6 mm de ancho, con alas hasta de 5 mm de ancho. La aparición periódica no estacional de las hojas de esta especie depende de la incidencia de la precipitación pluvial, la mayor parte del año las plantas permanecen sin follaje, pero cuando caen las lluvias, las hojas se desarrollan rápidamente. Éstas no duran mucho tiempo sobre la planta, pues se caen pronto, por lo que su presencia es un indicador seguro de que las lluvias han ocurrido recientemente. En las hojas de *Fouquieria* se presentan muchas traqueidas almacenadoras de agua, poco comunes en la mayoría de las especies de dicotiledóneas las cuales se asocian con las venas menores y las venas terminales. Estos elementos traqueales podrían considerarse como adaptación a las condiciones de baja humedad por las que pasan estas especies en condiciones de sequía (Lernsten *et al.*, 1974; Henrickson, 1969).

### **6.7.2 Distribución de la especie *Fouquieria splendens***

*Fouquieria splendens* ssp. *breviflora* se distribuye en zonas áridas, desde el suroeste de Estados Unidos, incluyendo parte de los estados de California, Arizona, Nevada, Nuevo México y partes del suroeste de Texas, se les encuentra al norte de México, en los desiertos de Sonora y Chihuahua, desde San Luis Potosí y Tamaulipas hasta la parte sur de Zacatecas, Querétaro e Hidalgo, entre los 700 y 2100 m.s.n.m. (Figura 6), se encuentra asociada con especies como *Yucca*, *Agave*, *Hechtia*, *Myrtillocactus*, *Opuntia*, *Echinocactus*, *Cephalocereus* y arbustos decíduos (Henrickson, 1972).



**Figura 6.** Distribución de *Fouquieria splendens*.

## 6.8 Análisis fitoquímico

Se ha enfocado en el aislamiento de metabolitos secundarios, moléculas o estructuras capaces de ayudar en el tratamiento y control de enfermedades, con menores efectos secundarios para el organismo.

### **6.8.1 Aislamiento de metabolitos secundarios**

Cualquier molécula biológica es un “producto natural”, pero este concepto es reservado usualmente a los metabolitos secundarios, pequeñas moléculas producidas por un organismo pero que no son estrictamente necesarias para la supervivencia del organismo. El concepto de metabolitos secundarios incluye moléculas o productos biológicos derivados del metabolismo como un resultado a limitación de nutrientes, mecanismos de defensa y moléculas reguladoras. El aislamiento de los metabolitos secundarios difiere del aislamiento de las macromoléculas biológicas más abundantes como las proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, debido a que los metabolitos secundarios son moléculas más pequeñas y químicamente más diversas, además de encontrarse en cantidades muy pequeñas, por lo que los métodos de aislamiento deben variar y tomarse en cuenta (Cannell, 1998). Valencia (1995), menciona que las sustancias que las plantas elaboran y acumulan en sus tejidos son importantes desde varios puntos de vista, muchas poseen propiedades farmacológicas y pueden utilizarse en la preparación de medicamentos, las formas de aislar los principios activos presentes en las plantas son muy diversas entre los que describe: precipitación disolvente-disolvente, extracción líquido-líquido; para su caracterización recomienda reacciones coloridas, métodos cromatográficos, electroforéticos y de espectrofotometría.

### **6.8.2 Extracción con solventes**

El primer paso de la extracción es liberar y solubilizar los metabolitos secundarios a través de la extracción acuosa o con solventes. Esto puede ser hecho por una serie de extracciones, usando solventes de polaridad variable y creciente, los cuales actúan como el primer paso del fraccionamiento o usando un solo solvente “universal” como el metanol, el cual disuelve la mayoría de los productos naturales al mismo tiempo que los libera de la matriz celular. Los materiales insolubles tales como la fibra y otros precipitados, pueden ser removidos mediante filtración o centrifugación (Cannell, 1998).

### 6.8.3 Identificación química

Para las mezclas de productos naturales que han sido extraídos con solventes, las pruebas químicas más comunes son las colorimétricas, que dan una indicación visual de la presencia de varios grupos funcionales, cuando un reactivo reacciona con un metabolito y se produce un compuesto colorido (Cannell, 1998).

Domínguez, (1973) refiere varios métodos químicos para detectar compuestos como: insaturaciones con la prueba del  $\text{Br}_2/\text{CCl}_4$  y la prueba del  $\text{KMnO}_4$ , para grupo carbonilo la prueba de 2-4- dinitrofenilhidracina, para oxidrilos fenólicos la prueba de  $\text{FeCl}_3$ , para esteroides y terpenos la prueba de Liebermann-Burchard y la de Salkowski, para carbohidratos la prueba de Molisch, para coumarinas la prueba con  $\text{NaOH}$  al 10%, para sesquiterpenlactonas la prueba de Baljet, para flavonoides la prueba de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y para alcaloides la prueba de Dragendorff.

### 6.8.4 Cromatografía

Las pruebas sobre las placas de cromatografía en capa fina sirven para hacer una separación de las fracciones presentes en un extracto y de esta manera conocer el número de compuestos presentes en la muestra. En algunos casos es posible hacer identificaciones relativas. Se recomienda emplear placas de 30 x 100 mm y aplicar a 20 mm del extremo, dos gotitas del extracto y una de una mezcla de dos ó tres sustancias testigo que se consideren representativa. El número de placas corridas en un disolvente depende del número de pruebas a efectuar. Algunas mezclas empleadas son: a) cloroformo-acetona (9:1), b) benceno-cloroformo (9:1), c) cloroformo-tetrahidro furano-ter-butanol-agua (10:6:50:1), d) ácido acético-butanol-agua (7:2:1). Treviño, (2000) recomienda utilizar una mezcla de benceno-metanol para la separación de compuestos en las siguientes proporciones en orden progresivo: 7:3, 8:2 y 9:1, para *Stenocereus griseus*. Los agentes cromogénicos pueden ser: I) tricloruro de antimonio al 10% en cloroformo (color rojo con esteroides, azul o violeta con triterpenos, II) solución de Dragendorff modificada (los alcaloides dan manchas de color naranja que no se desvanecen aún 24 horas después); III) vapores de yodo, IV) Vapores de amoníaco (para

flavonoides), V) Solución de 2,4-dinitrofenilhidrazina (grupos carbonilo, los compuestos aromáticos forman complejos púrpura), soluciones de ácido fosfomolibdico o de sales de diazonio (coloraciones con flavonoides y taninos). Solución al 0.1% de vainillina en ácido sulfúrico 2N (coloraciones muy variadas con diversos tipos de compuestos). Las cumarinas y flavonoides en luz ultravioleta tienen fluorescencia (azul, amarilla, verde, púrpura) (Kuklinski, 2000).

Bruhn y Lundstrom (1976), obtuvieron de *Carnegiea gigantea*, mediante cromatografía, cuatro alcaloides: carnegina, salsolidina, gigantina y arizonina. De los cuales la salsolidina la reportaron por primera vez en éste cactus.

Pummangura *et al.*, (1977) analizaron los extractos de la cactácea *Pilosocereus maxonii* (Rose) obteniendo seis alcaloides mediante cromatografía en capa delgada, de los que la tiramina, N-metiltiramina, está presente en otras especies de cactáceas.

Mata y McLaughlin (1980), encontraron dos alcaloides del cactus *Backebergia militaris* identificados como heliamina y 3,4-dimetoxi-beta-fentilamina, fueron cristalizados después del corrimiento de la cromatografía preparativa. Asimismo estos compuestos fueron aislados de otras especies de cactáceas.

Ferrigni *et al.*, (1982) determinaron mediante cromatografía la posible presencia de alcaloides en *Echinocereus triglochidiatus* Engelm variedad *paucispinus*; es una cactácea abundante en Texas y presenta un efecto hipotensivo similar a la histamina, similar al evaluado en otra variedad *neomexicanus* que es consumido por los indios Tarahumaras ocasionando efectos psicotrópicos.

## 6.9 Actividad biológica

Numerosas investigaciones se han dedicado al estudio y aislamiento de nuevos compuestos a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un gran número de estudios han sido dirigidos hacia la evaluación de actividades antimicrobianas en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas.

### 6.9.1 Actividad bactericida

El fenómeno de la resistencia bacteriana se considera una crisis mundial. Tanto los enfermos como los clínicos enfrentan la aparición de bacterias multi-drogo resistentes y reaparición de infecciones emergentes que precisan de nuevos tratamientos debido a la presencia de bacterias para las cuales no existe terapia antimicrobiana actual.

Aunque el arsenal de antibióticos es abundante y se ha logrado un gran avance en el tratamiento de infecciones cada vez más complejas, durante los últimos 60 años no se han descubierto medicamentos realmente novedosos, con mecanismos de acción capaces de modificar el espectro actual de cubrimiento y lo que es más grave de superar, los mecanismos de resistencia bacteriana (Levy, 2002).

La aparición de resistencia bacteriana a penicilina y estreptomicina impulsó la búsqueda de nuevos y mejores antibióticos; pronto aparecieron estos, cada uno con la expectativa de ser activo contra todo tipo de microorganismos sensibles o resistentes, o de convertirse en el fármaco mágico que terminaría con todas las infecciones. El mundo fue testigo de la introducción de cefalosporinas, aminoglicósidos, inhibidores de betalactamasas, macrólidos, glicopéptidos, tetraciclinas, quinolonas y monobetalactámicos. Cada uno tenía cualidades exclusivas y se crearon grandes expectativas con estos compuestos. Sin embargo la aparición de resistencia a cada nuevo grupo de antibióticos fue destruyendo el sueño de encontrar un compuesto indefinidamente eficaz (Nordmann y Poirel, 2002; Livermore y Woodford, 2000; Wang *et al.*, 2001).

Debido a esto, es de gran trascendencia la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana de origen vegetal; para lograr esto se hace necesario el uso de la investigación fitoquímica la cual cubre un amplio campo de trabajo cuyos objetivos principales son aislar principios activos, identificarlos, determinar su estructura y encontrar sus posibles aplicaciones (Bilboa, 1971).

Treviño *et al.*, (2004) obtuvieron resultados positivos de actividad antimicrobiana con los extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Stenocereus pruinosus*, no así de *Echinocereus stramineus*. *Pseudomonas aeruginosa* presentó mayor inhibición con extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Stenocereus pruinosus*. *Enterobacter aerogenes* fue inhibido en su mayoría por los extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus*, por último *Salmonella typhi* y *Listeria monocitogenes* fueron las que presentaron menor inhibición en estos extractos.

Extractos de *Pachycereus pecten-aboriginum* y *Lophocereus schottii* mostraron actividad bactericida y fungicida (Fimbres y García, 1998).

Morales (2006), reporta que el extracto metanólico de *Lophocereus schottii* presentó actividad antibacteriana relevante contra *Salmonella typhi*, *Enterobacter aerogenes* y *Listeria monocitogenes*.

Rico *et al.*, (2001) emplearon extractos liofilizados de *Lophocereus schottii* contra 5 cepas bacterianas, de las cuales, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* mostraron inhibición.

Silva, (2005), probó extractos de *Euphorbia pulcherrima*, *E. trigona*, *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y *Schinus molle*, para determinar la actividad antimicrobiana, usando el método de difusión en placa con discos de papel filtro.

### **6.9.2 Actividad antifúngica**

En las últimas décadas se ha observado un notable aumento de las infecciones causadas por hongos a los diferentes antimicóticos que se utilizan en la práctica médica. Esta situación ha llevado a la búsqueda de nuevos antifúngicos de origen natural (Mesa *et al.*, 2004).

Las dermatofitosis son conocidas desde la antigüedad, los romanos crearon el termino de tiña que significa “apolillado” fue utilizado desde el siglo V por Cassius.

Sin embargo los estudios científicos comienzan hasta el siglo XIX con los trabajos de Remak en 1834, el estudio del *flavus* y observó bajo el microscopio múltiples filamentos; posteriormente con una serie de estudios vino el descubrimiento de diversos dermatofitos y la creación del género *Microsporum* (Lloret *et. al.*, 2002 y Bonifaz, 1998).

En 1845 Malmsten creó el género *Trichophyton*, descubrió las especies *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans*, dos años más tarde Robin reafirmó los estudios de Malmsten y a través de varios años, realizó una serie de recopilaciones acerca de las criptogamas que parasitan al hombre y a los animales. En 1910 Sabourand divide a los dermatofitos en 4 géneros: *Trichophyton*, *Microsporum*, *Achorion* y crea el género *Epidermophyton* (Bonifaz, 1998 y Monzón, 2002).

En 1927 Nannizzi descubrió el primer estado perfecto (ascosporado) de un dermatofito, *M. gypseum*; el reconocimiento de este descubrimiento fue hecho 30 años después, cuando se volvió a encontrar el estado perfecto de este hongo (Bonifaz, 1998). Los dermatofitos representan más de 40 especies clasificadas en tres géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton* (Freedberg *et al.*, 1999; Arenas, 1993).

Los dermatofitos se clasifican en tres categorías según los huéspedes de su preferencia y su hábitat natural (Tabla 1). Los organismos geofílicos viven en la tierra y solo esporádicamente infectan al ser humano y cuando esto ocurre, la enfermedad es generalmente inflamatoria, *M. gypseum* es el hongo geófilo que con más frecuencia se aísla de infecciones en humanos. Las cepas aisladas a partir de humanos son más virulentas y en condiciones adecuadas son responsables de diseminaciones epidémicas. Los dermatofitos zoofílicos usualmente infectan animales, la transmisión de animales a humanos no es rara, por ejemplo: *M. canis* de perros y gatos es una fuente frecuente de infección y esto puede ocurrir ya sea por contacto con la especie animal infectada, a través de pelos del animal adheridos al vestido o materiales diferentes (Arenas, 1993).

Las especies antropofílicas se han adaptado para infectar al hombre, a diferencia de las dos primeras estas dan lugar a infecciones de naturaleza epidémica (Aly, 1994).

**Tabla I**

Agrupación de los dermatofitos basados en la ecología y la preferencia del hospedero

<b>Antropofílicos</b>	<b>Zoofílicos</b>	<b>Geofílicos</b>
<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. cookei</i>
<i>M. audouinii</i>	<i>M. equinum</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>M. ferrugineum</i>	<i>M. gallinae</i>	<i>M. fulvum</i>
<i>T. concentricum</i>	<i>M. persicolor</i>	<i>M. nanum</i>
<i>T. megninii</i>	<i>T. equinum</i>	<i>M. praecox</i>
<i>T. mentagrophytes var interdigitalis</i>	<i>T. mentagrophytes var erinacei</i>	<i>M. vanbreusemgenii</i>
<i>T. mentagrophytes var nodulare</i>	<i>T. mentagrophytes var mentagrophytes</i>	
<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes var quickeanum</i>	
<i>T. schoenleinii</i>	<i>T. simii</i>	
<i>T. soudanense</i>	<i>T. verrucosum</i>	
<i>T. tonsurans</i>		

#### **6.9.2.1 Género *Trichophyton***

Se caracteriza por presentar abundantes microconidias de aproximadamente de 2 a 4 µm de tamaño, con diversas formas como piriformes, esféricas, claviformes, tiene pocas macroconidias en forma de clava, o “puro” que llegan a medir de 40 a 50 micras de longitud, tienen paredes lisas y delgadas con septos transversales. Las especies más aisladas en México son: *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* (Bonifaz, 1998 y Monzón, 2002).

De este género se han encontrado aproximadamente 22 especies de las cuales 11 son comúnmente aisladas de tiñas del cuero cabelludo, uñas y piel en humanos. Solo 4 especies son aisladas frecuentemente de animales (Summerbell, 1996).

#### **6.9.2.2 Género *Microsporum***

Se caracteriza por presentar abundantes macroconidias de muy diversas formas como fusiformes, claviformes, ovoides, etc.; miden entre 40-60  $\mu$  de largo por 5-15  $\mu$  de ancho, con paredes gruesas, tienen septos transversales. En México las especies más comunes son *M. canis* y *M. gypseum* (Bonifaz, 1998).

Este género incluye algunas 17 especies de las cuales 5 especies son aisladas de humanos y 7 de animales; infecta el cuero cabelludo, el pelo, pero principalmente infecta uñas (Summerbell, 1996).

#### **6.9.2.3 Antecedentes de algunas plantas con actividad antifúngica**

Los vegetales sintetizan metabolitos secundarios, como las fitoalexinas y las fitoalexinas, que utilizan para defenderse de la infección por agentes fitopatógenos, entre ellos, los hongos; por esta razón dichas moléculas pueden ser candidatas para estudios *in vitro* contra agentes micóticos implicados en las infecciones humanas (Taylor, 1998; Osbourn, 1999).

Clowan, (1999) menciona que en la actualidad se dispone de una amplia variedad de agentes antimicóticos obtenidos de plantas que se han probado tanto *in vitro* como *in vivo* con buenos resultados tal es el caso de la planta australiana *Malaleuca alternifolia* de la cual se obtiene el aceite esencial del árbol del té un fitofármaco que ha demostrado actividad antimicótica por la acción directa de sus componentes activos, contra las estructuras de las membranas celulares, no solo en hongos si no también en bacterias, el aceite se utiliza para el tratamiento de infecciones de la piel por hongos de los géneros *Candida* y *Malassezia* y en las onicomicosis causadas por hongos dermatofitos. Con la

aplicación tópica del aceite no se han descrito reacciones adversas; sin embargo, la administración oral accidental produjo toxicidad sistémica (Carson, 2001).

Ledezma *et al*, (2000) mencionan que en los extractos alcohólicos, en los aceites esenciales y los compuestos de naturaleza sulfúrica aislados de los bulbos del ajo (*Allium sativum*) se ha demostrado un importante efecto antimicótico, atribuido a los componentes activos alicina y ajoeno, sobre especies de los géneros *Candida*, *Malassezia*, *Cryptococcus* y *Aspergillus*; así como contra especies de dermatofitos. La formulación tópica del ajoeno para el tratamiento de tiña corporis, y tiña pedis, ha demostrado resultados favorables.

Las plantas *Thymus vulgaris* y *Thymus zygis* son fuente de moléculas como el timol y carvacrol, ambas con reconocido efecto desinfectante en heridas y componentes de enjuagues bucales. Asimismo, es reconocida su actividad principalmente contra *Cryptococcus neoformans* y especies de *Candida*, *Aspergillus*, *Saprolegnia* y *Zygorhynchus* (Mesa *et al*, 2004).

Maldonado (2008), menciona que el extracto metanólico de *Stenocereus pruinosus* presentó actividad antifúngica contra *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* y *Microsporum cookei*, en dosis de 500, 250 y 125 mg/mL, mientras que *Echinocereus stramineus* no presentó actividad antifúngica, utilizando metanol como control negativo y ketaconazol como control positivo.

### **6.9.3 Bioensayo de letalidad contra *Artemia salina***

La industria farmacológica somete todos sus compuestos químicos a pruebas para detectar toxicidad; la mayoría de estas pruebas involucran protocolos que trabajan sobre líneas celulares específicas humanas, células de animales o bien en animales de laboratorio con cepas específicas de ratones, ratas, conejos, chimpancés; este tipo de bioensayos son muy costosos en términos de tiempo, dinero, infraestructura sofisticada, sin mencionar las habilidades de manejo de las técnicas.

El Dr. Jerry L. McLaughlin, (1998) de la Universidad de Purdue, desarrolló un bioensayo de bajo costo, rápido, fácil de realizar para búsqueda y fraccionamiento de extractos de plantas fisiológicamente activos utilizó un bioensayo en el que utiliza un pequeño crustáceo, para la detección y aislamiento de productos naturales bioactivos, conocidos como “letalidad de las nauplios de *Artemia salina*.” Para disminuir todo tipo de costos, sin demeritar la efectividad de los análisis de toxicidad, se utiliza este ensayo que es confiable, económico, reproducible y no requiere de condiciones extremas de asepsia ni habilidades de manejo específicas (Molina, 2004). *A. salina*, pertenece a la familia de crustáceos Artemiidae, invertebrados de hábitats salinos, que forman parte de la cadena trófica de su ecosistema. *A. salina* sólo había sido utilizada en varios bioensayos, entre las aplicaciones están: análisis de pesticidas, micotoxinas, contaminantes de corrientes, anestésicos, toxinas de dinoflagelados, compuestos parecidos a morfina, toxicidad de aceites dispersantes, carcinogenicidad de esteres de forbol y toxinas en medios ambientes marinos. El bioensayo con nauplios de *A. salina* consiste en la determinación de la  $DL_{50}$  de los extractos de plantas. Aquellos que presentan una  $DL_{50} < 1000$  mg/L, es muy probable que contengan uno o varios compuestos activos, por lo que es necesario fraccionarlos para repetir el bioensayo a menores concentraciones. Una vez que se hayan obtenido la o las fracciones activas, se aísla el o los productos para determinar su  $DL_{50}$  e investigar su actividad biológica específica.

Maldonado (2008), menciona que determinó la  $DL_{50}$  del extracto metanólico de *Stenocereus pruinosus* por medio del Bioensayo de “Letalidad de las nauplios de *Artemia salina*” el cual mostró tener un efecto tóxico sobre los nauplios de este crustáceo; al observarse un alto porcentaje de mortalidad a 1000mg/mL, el análisis Probit reveló la  $DL_{50}$  se encuentra en 826.72 mg/mL con una diferencia significativa entre las concentraciones probadas.

Morales, (2006) obtuvo una  $DL_{50}$  de 64.57  $\mu$ g/mL del extracto metanólico de *Lophocereus schottii* sobre la letalidad de crustáceo *A. salina*.

Abreu *et al.*, (2001) evaluaron el extracto hidroalcohólico concentrado de los frutos de *Bromelia pinguin* (piña de ratón) contra *A. salina* teniendo que a la mayor concentración empleada (1000 µg/mL) solo se alcanzó el 30 % de mortalidad como valor medio.

Ramos *et al.*, (2005) reportan la actividad citotóxica de extractos acetónicos y hexánicos de *Agave lechuguilla* y hexánicos de *Acacia berlandieri*, *Acacia gregii* y *Brassica nigra* contra *A. salina* con una DL<sub>50</sub> de 53.5, 56.3, 86.3, 120 y 131.6 µg/mL respectivamente.

Alluri, *et al.*, (2005) evaluaron la toxicidad mediante el ensayo de letalidad sobre *Artemia salina*, de los extractos acuosos de diversas plantas que se usan en la medicina tradicional de la India, obteniendo las DL<sub>50</sub> de *Pistacia lentiscus* con 2.5 µg/mL, *Aristolochia indica* (Aristolochiaceae), *Boswellia serrata* (Burseraceae), *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae), *Garcinia cambogia* (Clusiaceae) y *Semecarpus anacardium* (Anacardiaceae) con DL<sub>50</sub> de 13, 18, 21, 22 y 29.5 µg/mL respectivamente.

#### **6.9.4 Actividad amebicida**

La amibiasis es una enfermedad parasitaria infecciosa del tracto gastrointestinal, ocasionada por el protozooario parásito *Entamoeba histolytica*, representa un problema de salud mundial y afecta principalmente a los países en vías de desarrollo, con mayor frecuencia en las regiones tropicales, con climas cálidos y templados, con mayor orientación en las áreas pobres y mal saneadas. Se estima que el 10% de la población mundial está infectada por *E. histolytica*, ocupa el tercer lugar como causa de muerte provocada por protozoarios, lo que resulta en aproximadamente 50 millones de casos de amibiasis invasora y hasta 100,000 muertes por año, la prevalencia de infección amibiana puede ser tan alta como 50 % en ciertas áreas de los países en desarrollo. Tasas elevadas de infección amibiana se reportan principalmente en la India, África y

Centroamérica; en México constituye un problema muy importante de salud pública por su frecuencia y mortalidad (Padilla, 1999).

González *et al.*, (2000), estudiaron la actividad antiprotozoaria de los extractos acuoso y metanólico de dos especies del género *Acacia* sobre cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica*, y comprobaron la actividad inhibitoria de los extractos acuosos de hojas en ambas especies, resultando para *Acacia farnesiana* un 67.5 % de inhibición y para *Acacia rigidula* 58.4 %, confirmando de esta manera su uso en la medicina tradicional como amebicida. Calzada *et al.*, (2001), lograron inhibir en un 50 % el enquistamiento de *Entamoeba invadens*, utilizando extractos de *Castela texana*. Barrón (2007), trabajó con extractos metanólicos de *Castela texana* sobre *E. histolytica*, obteniendo una  $CI_{50}$  de 218.5  $\mu\text{g/mL}$ , recientes investigaciones reportan la resistencia de la cepa HM1-IMSS de *E. histolytica* al metronidazol, droga de elección para el tratamiento de esta enfermedad (Samarawickream *et al.*, 1997).

Sharma y Sharma (2001), hacen una recopilación de información que desde tiempos inmemorables la gente ha utilizado las plantas para el uso de enfermedades y debido al resurgimiento de las mismas ocasionadas por protozoarios como la amibiasis y la malaria, es necesario incrementar los reportes sobre las plantas que tengan actividad antiamibiana y antiplasmoidal.

Los habitantes del Noreste de México usan hojas de *Artemisia ludoviciana* en infusión como remedio anti diarreico, por lo que se evaluaron extractos acuoso, metanólico, acetónico y hexánico de hojas de plantas adultas, obteniéndose como resultado que son efectivos contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* en condiciones *in vitro* (Said *et al.*, 2005).

Oranday *et al.*, (2004) determinaron la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) del extracto etanólico del *Agave lophantha* sobre el crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia*, siendo ésta última la más susceptible al extracto.

Calzada *et al.*, (2003) encontraron que un extracto crudo de *Lepidium virginicum* mostró actividad antiprotozoaria contra trofozoitos de *E. histolytica* con una  $CI_{50}$  de 100.1  $\mu\text{g/mL}$ . Estos resultados concuerdan lo recopilado en la medicina tradicional del uso de *L. virginicum* en el control de la diarrea y disentería en Chiapas, México.

Calzada *et al.*, (2005) examinaron la actividad antiprotozoaria del extracto diclorometano-metanol, fracciones y compuestos puros de raíces de *Geranium mexicanum* sobre *E. histolytica* y *Giardia lamblia*. El resultado indicó que el extracto, la fracción orgánica y un flavonoide puro fueron activos contra ambos protozoarios con valores de  $CI_{50}$  de 1.9 a 79.2  $\mu\text{g/mL}$  para *E. histolytica* y de 1.6 a 100.4  $\mu\text{g/mL}$  en el caso de *Giardia lamblia*.

Calzada *et al.*, (2007) fraccionaron el extracto metanólico de la parte aérea de *Helianthemum glomeratum* proporcionando 5 flavonoides glicosilados. El ensayo antiprotozoario *in vitro* mostró que el tilirósido fue el más potente amebicida y compuesto giardicida con valores de  $CI_{50}$  de 17.5  $\mu\text{g/mL}$  para *E. histolytica* y 17.4  $\mu\text{g/mL}$  para *G. lamblia*. La isoquercitina mostró selectividad contra *E. histolytica* con  $CI_{50}$  de 14.7  $\mu\text{g/mL}$  y la quercitina hacia *G. lamblia* con una  $CI_{50}$  de 24.3  $\mu\text{g/mL}$ . Todos los compuestos aislados mostraron menos actividad que el metronidazol y emetina, dos drogas antiprotozoarias usadas como controles positivos.

Moo-Puc, *et al.*, (2007), utilizaron extractos metanólicos de hojas, raíces y corteza de *Senna racemosa* para determinar su actividad antiprotozoaria contra *Giardia intestinalis* y *Entamoeba histolytica*. Los extractos de la corteza del tallo mostró una  $CI_{50}$  de 2.10  $\mu\text{g/mL}$  para *Giardia intestinalis* y 3.87  $\mu\text{g/mL}$  para *E. histolytica*.

### **6.9.5 Actividad antioxidante**

Los antioxidantes pueden proteger directa o indirectamente a las células contra los efectos adversos de numerosas drogas y sustancias carcinogénicas. Tienen una gran capacidad para disminuir la carga de radicales en el organismo y desempeñan una

importante función para la prevención de numerosas patologías como problemas cardiovasculares, enfermedades degenerativas e incluso el proceso de envejecimiento (Bendich, 1990).

Últimamente se ha registrado un marcado interés por los radicales libres y la función que desempeñan en los sistemas biológicos. Un radical libre se define como una especie química con existencia propia que en su conformación involucra electrones desapareados en los orbitales que participan en las uniones químicas. Los radicales libres pueden ser formados tanto por la pérdida como por la ganancia de un electrón. En el primer caso, se trata de una oxidación inducida por el radical, mientras que en el segundo caso estamos hablando de una reducción (Molina, 2001). La incapacidad de nuestro cuerpo para neutralizar los radicales libres a los que nos exponemos diariamente nos obliga a recurrir a componentes con la propiedad de neutralizarlos. Estos compuestos actúan liberando electrones en nuestra sangre que son captados por los radicales libres convirtiéndose así en moléculas estables (Desmarchelier, 1998).

Los fitonutrientes son componentes de las plantas que contribuyen en la estabilización de los radicales libres en el cuerpo. Estos incluyen los polifenoles, como la catequina, localizada en el té verde (Benzie *et al.*, 1999). Antocianinas encontradas en las semillas de uva; ácido elálgico encontrado en uvas y nueces; ácidos fenólicos del vino tinto y el frijol de soya; tioles en la cebolla y ajo; carotenos en los frutos y vegetales rojos y amarillos; limonoídes en las cáscaras de los cítricos; índoles en brócoli y repollo; y bioflavonoides en los frutos cítricos. Algunos de estos compuestos como los isotiocianatos y el sulfuro de alilo presentes en el ajo bloquean la acción carcinogénica de diversos químicos (Yeon *et al.*, 2001).

Treviño *et al.*, (2006), evaluaron la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *Echinocereus stramineus*, *A. kotschoubeyanus* y *Stenocereus pruinosus* a diferentes concentraciones utilizando el radical 1,1-difenil-2-picrihidrazil y encontró que *Stenocereus pruinosus* tuvo una  $CI_{50}$  de 50 ppm, *A. kotschoubeyanus*  $CI_{50} > 50$  ppm y *Echinocereus stramineus*  $CI_{50}$  25 ppm; los extractos concentrados de esta cactácea,

indican la presencia de oxidrilos fenólicos, lo que hace suponer que estos compuestos pueden ser los responsables de esta actividad.

Lee *et al.*, (2002) evaluaron la actividad antioxidante de un extracto etanólico de *Opuntia ficus-indica* var. Saboten mediante varias técnicas, concluyendo que debido a la alta cantidad de fenoles (180.3 mg/g), puede ser que éstos compuestos sean los responsables de la propiedad antioxidante del extracto probado.

Saleem *et al.*, (2006) obtuvieron de *Opuntia ficus-indica* var. Saboten tres compuestos mediante la técnica de cromatografía y HPLC fase reversa, (1) isoramnetina 3-O-(6''-O-E-feruroyl) neohesperidosido, (2) (6R)-9,10-dihidroxy-4,7-megastigmadien-3-uno-9-O-beta-D-glucopiranosido, (3) (6S)-9,10-dihidroxy-4,7-megastigmadien-3-uno-9-O-beta-D-glucopiranosido; de los cuales el compuesto 1 mostró moderada actividad inhibitoria en el ensayo de secuestro del radical DPPH con una  $CI_{50}$  de 45.58  $\mu\text{g/mL}$ .

Cho *et al.*, (2006), evaluaron la actividad antioxidante mediante el radical DPPH y actividad antiinflamatoria de diversos extractos (metanol, hexano, cloroformo acetato de etilo, butanol y agua) de *Opuntia humifusa* Raf., obteniendo resultados con una  $CI_{50}$  de 3.6 a 48.2  $\mu\text{g/mL}$  para el extracto de acetato de etilo.

Casanova *et al.*, (2008), realizaron extractos clorofórmicos, de acetato de etilo y metanólico al 50 % de hojas de *Verbena officinalis*, posteriormente determinaron la actividad antioxidante mediante la técnica del DPPH y la actividad antifúngica, concluyendo que el extracto 50 % metanólico presentó mejor actividad en el ensayo con DPPH.

Argolo *et al.*, (2004), probaron mediante la técnica de secuestro de radicales libres con DPPH los extractos clorofórmicos y de acetato de etilo con una planta de Brasil, *Bauhinia monandra* Kurz, determinando que ambos extractos presentaron una  $CI_{50}$  de aproximadamente 2 mg/g.

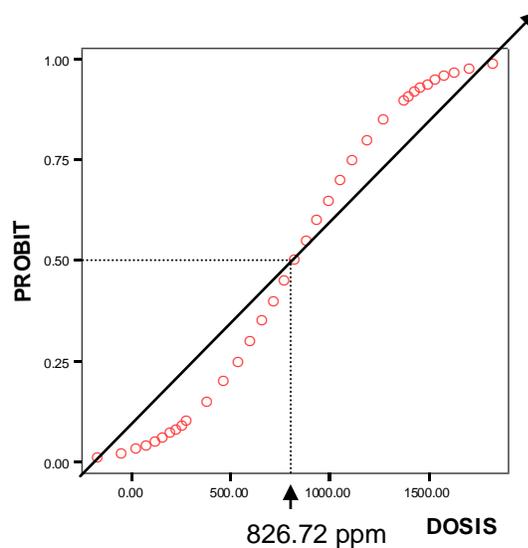
## 6.10 Análisis estadístico

### 6.10.1 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. El modelo es aplicable solo para aquellos fenómenos de los que se dispone de la “ecuación Probit” (Gráfica 1) (Ferrán, 2001).

El resultado es una curva con estas características:

Gráfica para Probit (Mercado, 1998)



**Gráfica 1.** Análisis Probit curva dosis respuesta (Mercado-Hernández, 1998).

El valor de la variable Probit se determina por la expresión:

$$Y = K_1 + K_2 \ln V$$

Donde V es la variable física representativa del estímulo y  $K_1$  y  $K_2$  son unas constantes (Ferrán, 2001).

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 Reactivos, material y equipo

#### 7.1.1 Material de laboratorio

- Matraz Erlenmeyer de 250 y 500 mL
- Asa Driblasky
- Cajas de petri
- Cámara de Neubauer
- Capilar
- Cuba cromatográfica
- Embudos de vidrio
- Filtros milipore membrana 0.22 $\mu$ m
- Frascos de vidrio de 250 mL
- Microplaca de 96 pozos
- Placas de silica gel 60 F<sub>254</sub>
- Papel filtro Whatman No. 1
- Placas de cerámica de 12 pozos
- Pipeta graduada 1, 5, 10 mL
- Tubos de ensaye (12  $\times$  50)
- Porta objetos.
- Matraz bola de 1000 mL
- Probeta graduada de 100 mL
- Micropipetas 10, 20, 50 100 y 1000 $\mu$ l

#### 7.1.2 Equipo de laboratorio

- Agitador Dual action, Shaker Lab-Line
- Rotavapor Buchi 461
- Mechero Bunsen
- Cámara con luz ultravioleta
- Microscopio estereoscópico Leica
- Microscopio invertido Axiovert 25
- Plancha de agitación Thermolyne
- Potenciómetro Orion 420 A+
- Espectrofotómetro Spectronic Genesis 5
- Autoclave All American Mod. 25x-1
- Balanza Analítica Sartorius
- Estufa Despatch. Termostato de 150-550° C
- Incubadora Binder
- Cromatógrafo de gases con detector de espectrómetro de masas GC-MS Agilent 5973n
- Mufla 1500 Sybron Thermolyne
- Campana de flujo laminar Velco
- Refrigerador

### 7.1.3 Reactivos

- 1,1-Difenil-2-picrihidrazil
- 2,4-Dinitrofenilhidracina
- Ácido acético glacial
- Ácido Ascórbico
- Ácido clorhídrico
- Ácido pícrico
- Ácido sulfúrico
- Acetato de etilo
- Agar
- Agua bidestilada estéril
- Agua desionizada
- Alfa-naftol
- Anhídrido acético
- Benceno
- Acetona
- Hexano
- Cloroformo
- Metanol
- Butanol
- Tetra cloruro de carbono
- Levadura de cerveza (Pronal Ultra)
- Limaduras de Magnesio
- Metronidazol
- Penicilina-estreptomicina
- Peptona de caseína
- Peptona de colágeno
- Sacarosa
- Tween
- L-cisteína
- Hidróxido de amonio
- Sal de mar Coralife Scientific Grad Marine Salt
- Suero bovino
- Permanganato de potasio
- Gentamicina
- Ketoconazol
- Hidróxido de sodio
- Cloruro de fierro
- Nitrato de bismuto
- Yoduro de potasio
- Silica Gel 60 G
- Hipoclorito de sodio (Cloralex)
- Cloruro de sodio
- Detergente no iónico (Tween)
- D-glucosa anhidra
- Dicromato de potasio
- Dimetilsulfóxido
- EDTA disódico
- Etanol
- Extracto de hígado y páncreas
- Extracto de levadura
- Formaldehído
- Medio de cultivo C. Rivas
- Carbonato de calcio
- Agar Papa dextrosa
- Agar sangre
- Agrar Mueller Hinton
- Azul de Metileno

## 7.1.4 Material Biológico

### 7.1.4.1 Material vegetal

Plantas: *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Fouquieria splendens* y *Ariocarpus retusus*, fueron colectadas en los Municipios de Mina y Galeana N. L. respectivamente, con el permiso de colecta N°139.0.DDR2.22 (2006).

### 7.1.4.2 Cepas de bacterias

Las cepas fueron obtenidas del Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

- *Bacillus cereus* (ATCC 14579)
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)
- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Salmonella typhi* (ATCC 6539)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

### 7.1.4.3 Hongos dermatofitos

Las cepas de hongos dermatofitos fueron aislados clínicos de pacientes, proporcionadas por el Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas de la Fac. de Medicina de la UANL.

- *Microsporium gypseum*
- *Microsporium nanum*
- *Trichophyton mentagrophytes*
- *Trichophyton tonsurans*
- *Microsporium canis*
- *Microsporium cookei*

### 7.1.4.4 *Artemia salina*

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

#### 7.1.4.5 *Entamoeba histolytica*

Cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica*, cultivada en condiciones axénicas *in vitro* en medio de cultivo PT, fue proporcionada por el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.

### 7.2 Recolección de las plantas e identificación del material vegetal

La recolección de las especies se realizó con el permiso de la Corporación para el Desarrollo Agropecuario de Nuevo León Oficio N° 139.0.DDR2.22 (2006). Las plantas se colectaron en el mes de Junio del 2006. *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Fouquieria splendens* se colectaron en el municipio de Mina y la colecta de *Ariocarpus retusus* se realizó en el ejido El Potosí del municipio de Galena en Nuevo León.

### 7.3 Extracción del material vegetal

La extracción se llevó a cabo primero lavando el material vegetal para eliminar la tierra y partículas extrañas que se pudieran presentar, después las plantas se cortaron en trozos pequeños para posteriormente secarse en un horno a 40°C, para eliminar el exceso de agua; las partes utilizadas de las plantas fueron para *A. kotschoubeyanus* (toda la planta), *A. retusus* (tallo y raíz) y para *F. splendens* (tallos). Posteriormente se tomaron 50 g de *A. kotschoubeyanus*, 25 g de *A. retusus* (tallo), 50 g de *A. retusus* (raíz) y 50 g de *F. splendens* (tallo) y se depositaron por separado en matraces Erlenmeyer de 500 mL y se le adicionaron 300 mL de metanol, se sellaron herméticamente para evitar evaporación del solvente durante la extracción, se dejaron en agitación constante por 7 días en un Agitador Dual Action Shaker Lab-Line. Una vez transcurrido el tiempo de la extracción el solvente se separó del resto de la muestra mediante filtración con papel Wathman N° 1, obteniendo de esta manera los extractos libres de residuos, los extractos se desengrasaron con hexano y se evaporaron hasta sequedad a presión reducida en un rotaevaporador Büchi a 40°C y 60 rpm con el fin de agilizar la evaporación y evitar contaminación (Figura 7) (Velásquez, 1997).

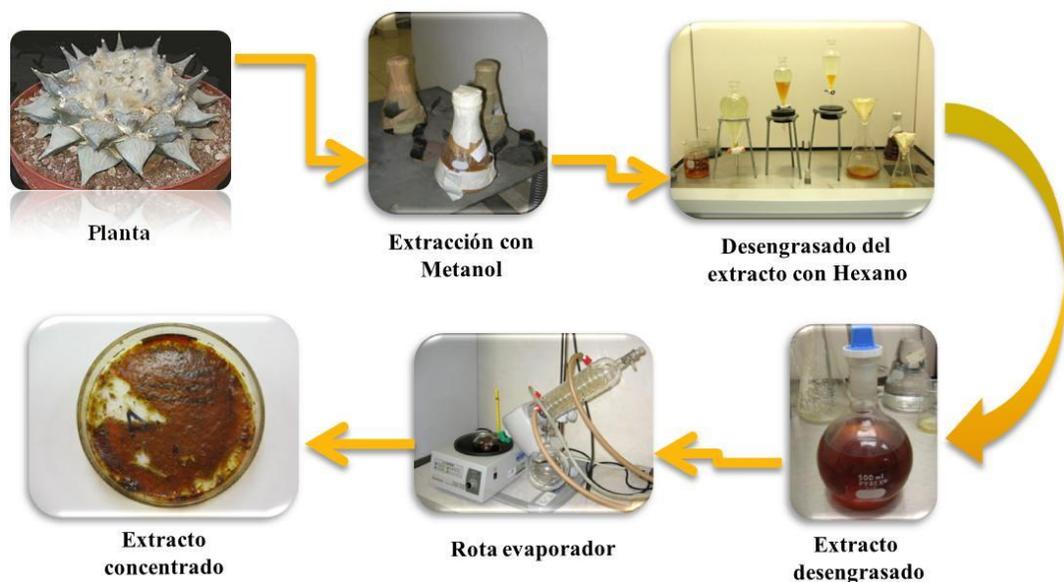


Figura 7. Diagrama de flujo de la extracción metanólica de las especies.

## 7.4 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 (Domínguez, 1979).

### 7.4.1 Insaturaciones

#### 7.4.1.1 Prueba del $\text{KMnO}_4$

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  $\text{KMnO}_4$  al 2% en agua. La prueba es positiva si se observa decoloración o formación de precipitado café, resultado de la formación de dióxido de magnesio (Domínguez, 1979).

### 7.4.2 Grupo carbonilo

#### 7.4.2.1 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 (Domínguez, 1979).

### **7.4.3 Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales)**

#### **7.4.3.1 Prueba del FeCl<sub>3</sub>**

Se disolvieron 1-2 mg del extracto en 1 mL de agua o etanol y después se le agregaron unas gotas de cloruro de fierro al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul-violeta o verde es considerado positivo (Domínguez, 1979).

### **7.4.4 Esteroides y triterpenos**

#### **7.4.4.1 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 metilesteroides (Domínguez, 1979).

### **7.4.5 Carbohidratos**

#### **7.4.5.1 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.

#### **7.4.5.2 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.

#### **7.4.5.3 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 (Domínguez, 1979).

### **7.4.6 Sesquiterpenlactonas**

#### **7.4.6.1 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 % (Domínguez, 1979).

#### **7.4.7 Flavonoides**

##### **7.4.7.1 Prueba del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**

Una pequeña cantidad del extracto se disolvió en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se observa coloración amarilla para flavonoides, naranja-guinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas (Domínguez, 1979).

#### **7.4.8 Alcaloides**

##### **7.4.8.1 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 (Domínguez, 1979).

#### **7.4.9 Saponinas**

##### **7.4.9.1 Prueba del 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 agregó 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 (Domínguez, 1979).

##### **7.4.9.2 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La prueba es positiva si hay aparición de color rojo (Verástegui, 2000).

#### **7.4.9.3 Prueba de agar sangre lisis de eritrocitos**

De cada extracto se inoculó una alícuota en caja petri con agar-sangre como medio de cultivo. La caja inoculada se dejó en incubación a 37 °C por 24 h. La prueba da como resultado un halo de hemólisis en el medio. El medio está libre de azúcares reductores, ya que estos influirían de forma adversa en reacciones hemolíticas. Cuando la muestra contiene taninos, deben eliminarse antes de realizar la prueba ya que la interfieren. Esto se logra por tratamiento repetido de la muestra con óxido de magnesio, el cual forma complejos insolubles con los taninos, por lo cual es fácil eliminarlos por filtración. (Martínez, 2001)

#### **7.4.10 Aromaticidad**

##### **7.4.10.1 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 (Treviño, 2001).

#### **7.5 Determinación de la actividad antimicrobiana**

Con los extractos obtenidos se realizaron las pruebas para la determinación de la actividad antimicrobiana. El método empleado para el ensayo microbiológico fue el de difusión en placa con discos de papel filtro. Las soluciones de prueba se esterilizaron por filtración con membranas de 0.25 µm (Figura 9) (Koneman *et al.*, 1989).

##### **7.5.1 Cepas**

Se utilizaron los siguientes microorganismos: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*.

### 7.5.2 Activación de bacterias

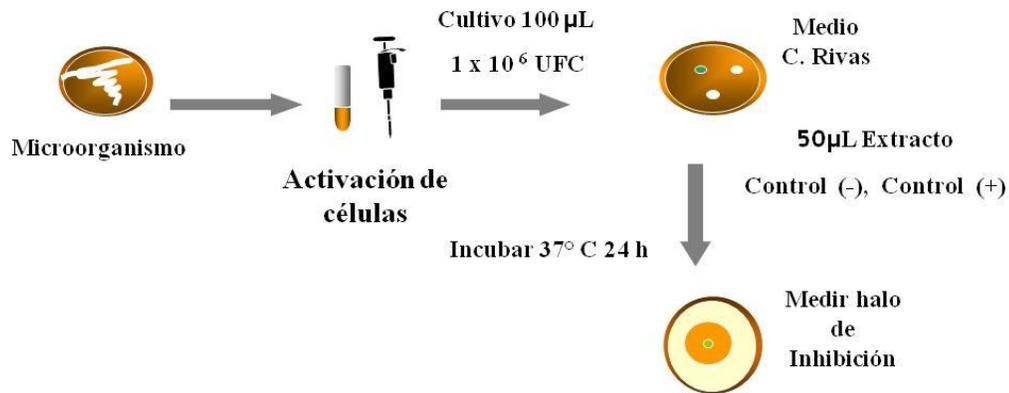
Para la activación de las bacterias se usó medio líquido preparado con 5 g de medio C. Rivas (Patente IMPI MX/10892.2007) en 100 mL de agua destilada, ajustando a pH 7.0. Para el ensayo se utilizaron tubos de ensaye 18 × 150 mm a lo que se les agregaron 5 mL de medio, se esterilizaron a 15 Lb/10 min, se inocularon con las diferentes cepas adicionando una asada a cada tubo previamente identificado y se incubaron durante 12-18 h a 37 °C (Rivas, 1998; Silva, 1999).

### 7.5.3 Cultivo de bacterias

Para el cultivo de bacterias se utilizó el medio sólido C. Rivas 8.5 g en 100 mL de agua destilada, se esterilizó y se adicionó sobre cajas Petri (20 mL) para posteriormente ser utilizadas en las pruebas de inhibición "*in vitro*" (Velásquez, 1997).

### 7.5.4 Método de difusión en placa

Las pruebas microbiológicas se realizaron mediante el método de difusión en placa colocando 50 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 papel filtro Whatman No. 1 sobre una placa sólida de medio C. Rivas, previamente inoculada con 100 µL de una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^6$  UFC. Como control negativo se utilizó 50 µL del solvente empleado para disolver el extracto y 50 µL de gentamicina a una concentración de 10 mg/mL como control positivo (Figura 8). Las placas se incubaron a 37°C por 24 h; después de este período se midieron los halos de inhibición en mm (Ríos *et al.*, 1988; Koneman *et al.*, 1989; Murphy, 1999).



**Figura 8.** Diagrama de flujo para la determinación de la actividad antimicrobiana.

## 7.6 Determinación de la actividad antifúngica

Con los extractos obtenidos se realizaron las pruebas para la determinación de la actividad antifúngica. El método empleado para el ensayo de actividad antifúngica fue el de difusión en placa con discos de papel filtro. Las soluciones de prueba se esterilizaron por filtración con membranas de 0.25 µm (Figura 10) (Koneman *et al.*, 1989).

### 7.6.1 Cepas

Se utilizaron los siguientes microorganismos: *M. gypseum*, *M. nanum*, *M. cookie*, *T. tonsurans*, *M. canis*.

### 7.6.2 Cultivo y estandarización del inóculo cepas de dermatofitos

Para obtener las suspensiones de inóculo se utilizaron cultivos puros obtenidos a partir del crecimiento de 7 a 14 días en medio agar papa dextrosa (PDA) a 30 °C. Se emplearon colonias maduras para obtener por arrastre de la superficie con 1 mL de solución salina (0.85% de NaCl) y Tween al 80 % los elementos fúngicos que servirán de inóculo. Posteriormente, la suspensión de conidios y fragmentos de hifas se retiraron

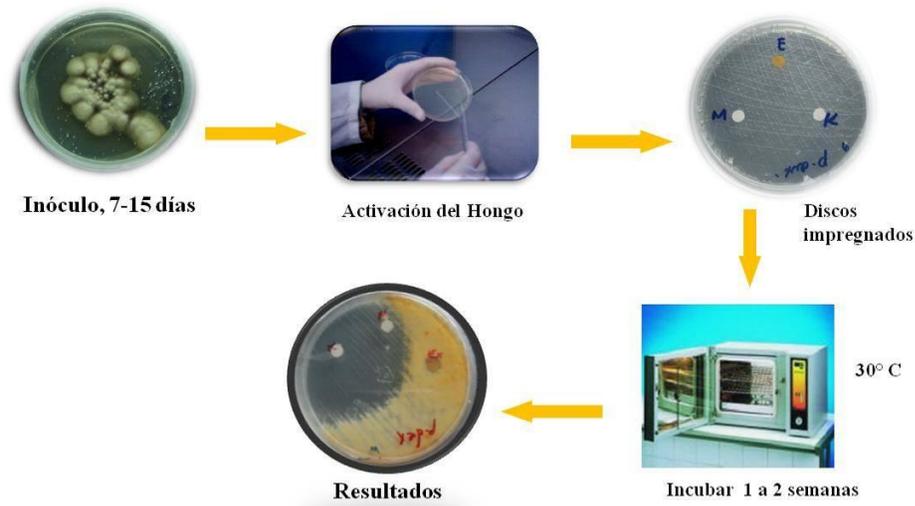
con la ayuda de una pipeta y fue transferida a tubos de vidrio estériles. Las partículas pesadas se retiraron por precipitación (15-20 min a temperatura ambiente) y el sobrenadante fue homogenizado con un vortex mixer durante 15 s. Se ajustó la turbidez del sobrenadante con solución salina hasta 0.5 de la escala de Mc Farland, correspondiente a una transmitancia del 68 % a 70 % medida a 530 nm de longitud de onda (Carrillo *et al.*, 2004). Tras agitar los tubos con las suspensiones de conidias ya homogenizadas se tomó un inóculo de 100  $\mu$ L y se inoculó en tres direcciones en medio Agar Papa Dextrosa, Agar Mueller Hilton y Medio C. Rivas sólido (Patente IMPI MX/10892.2007), por triplicado y se dejó secar durante 20 a 30 min.

### **7.6.3 Preparación de los extractos actividad antifúngica**

Se pesó el equivalente a 500, 250 y 125 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 7,25 mm de diámetro, se cargó con 10  $\mu$ L de la solución correspondiente (carga final por disco 5 mg, 2.5 mg, 1.25 mg respectivamente).

### **7.6.4 Preparación del estándar control positivo**

Se pesó el equivalente a 0.01 mg de ketaconazol (Recetario Magistral) puro y se disolvió en 1.6 mL de metanol destilado al 98 % para obtener una concentración de 60  $\mu$ g/mL. Cada disco de papel Whatman N° 1 (Whatman International Ltd., England) estéril, se cargó con 10  $\mu$ L de la solución (carga final por disco 0.6 microgramos) (Figura 9). Para el control negativo se utilizó metanol al 98% de pureza (CTR SCIENTIFIC).



**Figura 9.** Diagrama de flujo para la determinación de la actividad antifúngica.

## 7.7 Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*

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

### 7.7.1 Incubación de *A. salina*

Para la incubación de huevecillos de *Artemia salina*, se elaboró agua de mar artificial, de la manera siguiente: se pesan 40 g de sal de mar (Coralife Scientific Grad Marine Salt), 0.006 g de levadura de cerveza (Pronal Ultra) se aforaron a un litro de agua bidestilada, se ajustó el pH a 7.8. El procedimiento se realizó incubando 0.1 g de huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC) en el agua de mar artificial, colocados en un recipiente de plástico dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm; se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación. Uno de los compartimentos se mantuvo iluminado con una lámpara de 20 watts ya que al eclosionar los nauplios son atraídos a la luz. A las 24 h los nauplios fueron pasados con la ayuda de una micropipeta a otro recipiente y mantenidos

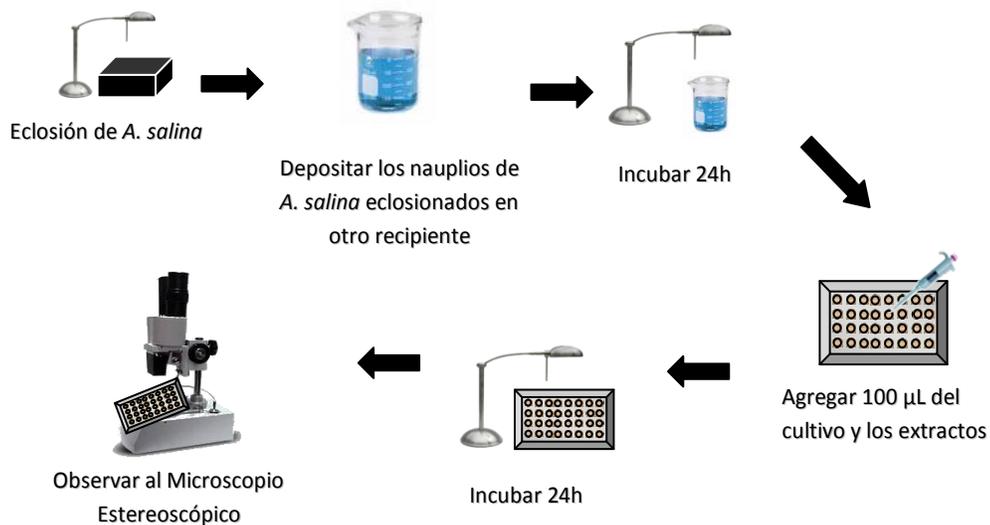
en condiciones de oxigenación y temperatura de 22-29 °C por 24 h más. (Figura 10) (Meyer *et al.*, 1982 y Solís *et al.*, 1993)

### 7.7.2 Preparación de las concentraciones

Los extractos se disolvieron en agua salada, se probaron en concentraciones de 1000, 500 y 100 ppm.

### 7.7.3 Determinación de la dosis letal media

Con una micropipeta se toman 100 µL del cultivo de artemias, y se depositan en cada pozo de la microplaca (6 repeticiones por extracto). Y posteriormente se adicionan 100 µL de las diluciones de los extractos a probar. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio 400 ppm y agua de mar como control negativo. Después de aplicados los extractos la placa se incuba por 24 horas a 25 °C y se cuentan las artemias con ayuda de un microscopio estereoscópico. Utilizando el método Probit se determinó la DL<sub>50</sub> (Meyer *et al.*, 1982 y Solís *et al.*, 1993).



**Figura 10.** Diagrama de flujo para la determinación de la toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*.

## 7.8 Determinación de la actividad amebicida

Con los extractos obtenidos se realizaron las pruebas para la determinación de la actividad amebicida sobre *E. histolytica* (Figura 11).

### 7.8.1 Medio de cultivo para *E. histolytica* cepa HM1-IMSS

Se preparó medio PT (Tabla II), se mezclaron los componentes y se disolvieron en 62.5 mL de Extracto de Hígado y Páncreas se aforó a 500 mL con agua desionizada. El pH se ajustó a 7.00 con NaOH 10 N, el medio se colocó en tubos de ensayo de borosilicato de 18 × 150 mm con tapón de rosca conteniendo 10 mL del medio de cultivo y se esterilizó en autoclave por 20 min a 121 °C/15 Lb de presión, después se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se almacenaron a 4 °C hasta su empleo (Barrón, 2008).

**TABLA II**

Composición del medio PT<sup>a</sup> 500 mL

<b>Compuesto</b>	<b>Cantidad g</b>
Peptona de caseína	7.5
Extracto de levadura	7.5
Extracto de hígado y páncreas <sup>b</sup>	62.5
NaCl	0.5
L-cisteína	0.5
Ácido ascórbico	0.1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.3
Citrato férrico de amonio	0.00057
D-glucosa anhidra	8.0

<sup>a</sup>Se mezclaron todos los componentes y se disolvieron en 31.25 mL de <sup>b</sup>EHP y se aforaron a 500 mL con agua desionizada. El pH se ajustó a 7.00 con NaOH 10 N, el medio se colocó en alícuotas de 10 mL en tubos para cultivo de 16 × 150 mm con tapón de rosca y se esterilizó en autoclave por 15 min a 15 Lb de presión a 121°C.

### **7.8.2 Mantenimiento de *Entamoeba histolytica* cepa HM1-IMSS**

La cepa se mantuvo mediante resiembras sucesivas, inoculando  $1 \times 10^4$  trofozoítos/mL a un tubo  $16 \times 150$  mm con tapón de rosca, conteniendo 10 mL de caldo MPT adicionado con 0.1 mL de solución de penicilina-estreptomicina y 1.0 mL de suero bovino, la cepa fue incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 72 h. Antes de cada resiembra los cultivos se observaron en un microscopio invertido para comprobar el buen estado de las amibas. El cultivo que mostró la mejor densidad y el mejor aspecto, se colocó en agua-hielo por 15 min para despegar las células adheridas al tubo, este se agitó 10 veces por inversión suave, y el número de trofozoítos se determinó tomando una alícuota del cultivo, se colocó en una cámara de Neubauer y se determinó el número de trofozoítos/mL. Las resiembras y bioensayos se realizaron cuando las células se encontraban en la mitad de su fase logarítmica de crecimiento.

### **7.8.3 Cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica***

Se inocularon 24 tubos con medio de cultivo PT-caldo con volumen de 5 mL, 0.05 mL de solución de penicilina-estreptomicina y 0.5 mL de suero bovino y un inóculo de  $1 \times 10^4$  trofozoítos/mL. Se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  y a partir del día 1 cada 24 h, se determinó el número de trofozoítos/mL a 2 tubos de cultivo hasta el 6 día de incubación.

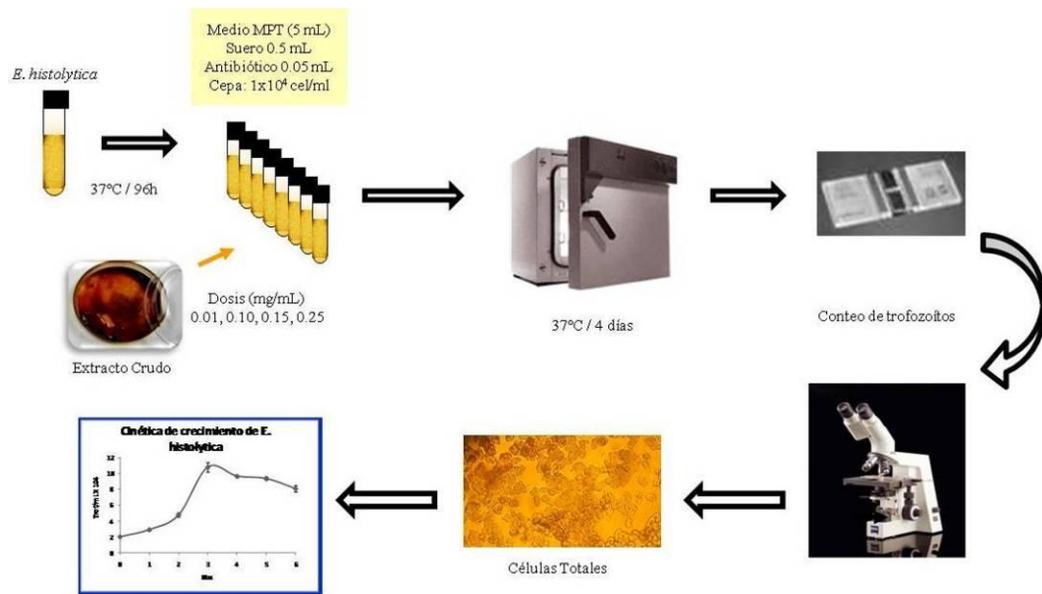
### **7.8.4 Preparación de solución madre**

Se preparó una solución madre o stock disolviendo 30 mg/mL del extracto metanólico de cada uno de las especies en 1 mL de DMSO y a partir de esta solución stock se prepararon concentraciones de 0.01, 0.1, 0.15 y 0.25 mg/mL de cada extracto.

### **7.8.5 Evaluación de la actividad amebicida de los extractos metanólicos**

Se realizaron curvas dosis-respuesta para determinar la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) de los extractos sobre el cultivo axénico de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS, empleando concentraciones de 0.01, 0.1, 0.15 y 0.25 mg/mL de cada

extracto y como control positivo se utilizó el metronidazol [0.111  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ], para cada dosis se dispuso de 12 tubos conteniendo 5 mL de medio PT, adicionado con 0.5 mL de suero bovino y 0.05 mL de una mezcla de antibiótico (penicilina-estreptomicina), cada tubo se inoculó con  $1 \times 10^4$  trofozoítos/mL y fueron incubadas a 37 °C por 96 h. Cada concentración se probó en tres eventos independientes por triplicado, comparándose contra el crecimiento de las cepas sin la adición de las drogas como control negativo. Finalizado el tiempo de incubación se procedió a contar el número de trofozoítos/mL utilizando una cámara de Neubauer. La  $\text{CI}_{50}$  se calculó mediante el método estadístico Probit.



**Figura 11.** Diagrama de flujo para la determinación de la actividad amebicida.

## 7.9 Determinación de la actividad antirradical de los extractos

Con los extractos obtenidos se realizaron las pruebas para la determinación de la actividad antirradical, el método empleado fue el de reducción del radical DPPH (Figura 12).

### 7.9.1 Evaluación de la actividad antioxidante

Para la determinación de la actividad antiradical se utilizaron 2 métodos: uno cualitativo y otro cuantitativo. Primero se colocaron los 4 extractos de las especies en estudio sobre Placas de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> Fisher, en donde se colocó una cantidad de cada extracto así como la Vitamina C como control positivo, utilizando como revelador una solución de DPPH (1,1-Difenil-2-picrihidrazil) radicales libres desecados, al 0.04 %. Después de dejar secar el solvente del extracto, se agregó la solución reveladora de DPPH por aspersión sobre la placa cromatográfica.

Para la cuantificación de la actividad antioxidante se utilizó el método de Cottele *et al*, (1996) se evaluaron los extractos metanólicos para determinar la actividad antioxidante, utilizando el método del radical libre DPPH, 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 que decoloran el reactivo DPPH.

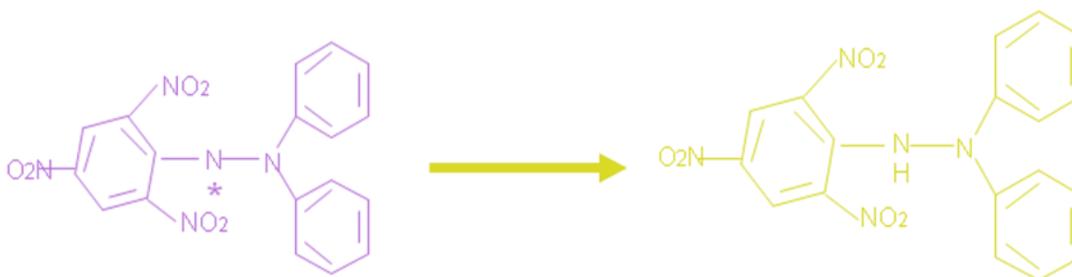


Figura 12. Reducción del radical DPPH.

### 7.9.2 Preparación del estándar y extractos metanólicos

La solución estándar se preparó a una concentración de 0.1 mM de DPPH en etanol absoluto mientras que los extractos concentrados de las especies en estudio se disolvieron en metanol, de cada uno se prepararon stocks de 5mg/5mL y a partir de cada solución concentrada se elaboraron las diluciones correspondientes para lograr soluciones de 10, 20, 50 y 100  $\mu$ L.

### **7.9.3 Reacción de neutralización del radical DPPH cuantificación de la actividad antioxidante**

Para la cuantificación de la actividad antioxidante la mezcla de reacción se realizó en tubos de ensaye, se realizaron cuatro repeticiones para cada concentración de cada extracto, en dos eventos independientes. A cada tubo se adicionó un volumen de 750  $\mu\text{L}$  del estándar de DPPH y 250  $\mu\text{L}$  de las disoluciones por cada extracto disueltas en metanol y como blanco se utilizó solución de DPPH y como control positivo se utilizó Acido ascórbico. Las mezclas de reacción se mantuvieron en agitación a temperatura ambiente por 30 min. La absorbancia se midió transcurridos los 30 min a 517 nm, en un espectrofotómetro Spectronic Genesis 5 (Tamil *et al.*, 2003). Se determinó la  $CE_{50}$ , la cual nos indica la concentración necesaria para reducir el 50% del radical DPPH se utilizó el programa SPSS versión 17 para hacer los cálculos correspondientes.

### **7.10 Separación de los extractos por métodos cromatográficos**

Con los extractos obtenidos se realizó la separación de fracciones de los extractos con el propósito de separar las bandas e identificar los  $R_f$  de las fracciones.

#### **7.10.1 Cromatografía en capa fina**

Se utilizaron placas de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> Fisher que fueron colocadas dentro de una cuba cromatográfica. Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de cada extracto mediante un capilar, el extracto se aplica aproximadamente a 1cm de la parte inferior, se aplicaron varias muestras para hacer comparaciones entre estas, asegurando que al poner cada gota dejar secar entre cada una, antes de poner la siguiente. Después de secar las gotas, las placas se colocaron en cubas cromatográficas con diferentes mezclas de eluentes para su corrimiento y de esta manera encontrar el mejor eluente para la separación de las fracciones de cada uno de los extractos. El  $R_f$  se calculó midiendo la distancia del punto de aplicación de la muestra a la mitad de la mancha detectada y se dividió el valor obtenido sobre la distancia del punto de aplicación de la muestra y la distancia recorrida por el eluente. Se utilizaron diferentes mezclas de solventes Cloruro de Metilo-

Cloroformo-Acetona (6:3:1), Etanol-Butano-Hidróxido de Amonio (4:4:1), Benceno-Cloroformo (9:1), Cloroformo-Metanol (7:3), Cloroformo-Metanol (8:2) y Cloroformo-Metanol (9:1) (Huacuja, 1995).

### **7.10.2 Agentes cromogénicos**

Los cromatogramas se observaron a luz visible y en una campana con luz ultravioleta para visualizar las bandas que no son apreciables en luz visible. También se utilizó cloruro de cobalto para revelar algunas cromatografías y lograr una mejor identificación.

### **7.10.3 Cromatografía en columna al vacío**

Se montó una columna empacada con 110 g de sílica gel 60 para separar las fracciones de los extractos activos, una para *A. retusus* (tallo) y otra para *F. splendens*. Se recogieron fracciones cada 100 mL. La serie eleutrópica empleada fue: hexano, éter de petróleo, benceno, cloroformo, acetona, metanol y etanol.

### **7.10.4 Métodos espectroscópicos**

Se utilizó un cromatógrafo de gases con detector de espectrómetro de masas (GC-MS) para identificar los compuestos de las fracciones con efecto inhibitorio sobre los microorganismos en estudio. El análisis se realizó en un GC-MS Agilent 5973 n utilizando columnas HP 5.

### **7.11 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS versión 17. Se capturaron los datos y de esta manera se construyó la base de datos, incluyendo las variables obtenidas de los parámetros evaluados durante el diseño experimental.

### **7.11.1 Análisis (Probit)**

La media o promedio de las concentraciones a las cuales se observó la actividad biológica (efecto tóxico, amebicida y secuestro de radicales DPPH), se sometieron a un análisis de varianza ANOVA (una vía) y test de Tuckey (Tukey Honestly Significant Difference, HDS) para el estudio comparativo de sus medias. Se tomó como diferencia significancia un  $p < 0.05$  con respecto al testigo positivo (Vitamina “C” para DPPH) o negativo (medio de cultivo).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Recolección de las plantas e identificación del material vegetal

Los ejemplares secos y montados fueron entregados al Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas para su depósito e identificación, extendiendo el N° de registro correspondiente para las especies: *Ariocarpus retusus* # 025523, *Ariocarpus kotschoubeyanus* # 025522 y *Fouquieria splendens* # 025524.

### 8.2 Obtención y rendimiento de los extractos a partir del material vegetal

Se obtuvieron cuatro extractos metanólicos en total (Figura 13). Los rendimientos de los extractos obtenidos se presentan en la Tabla III, se encontró que el extracto con mayor rendimiento fue el extracto metanólico de tallo de *Fouquieria splendens* 11.98 %, los rendimientos fueron obtenidos a partir del material seco y se obtuvieron por diferencia de pesos con el extracto.



**Figura 13.** Obtención de extractos metanólicos.

**Tabla III**

Porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos

<b>Especie vegetal</b>	<b>Rendimiento extracto metanólico</b> %
<i>Fouquieria splendens</i>	11.98
<i>A. retusus (tallo)</i>	11.76
<i>A. retusus (raíz)</i>	7.65
<i>A. kotschoubeyanus</i>	3.36

### **8.3 Determinación de grupos funcionales y metabolitos secundarios**

En la Tabla IV se muestran los resultados de las pruebas químicas para grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de las especies evaluadas. Se encontró la presencia de insaturaciones, grupos carbonilo, oxidrilos fenólicos, esteroides y metilesteroides, cumarinas, saponinas, sesquiterpenlactonas y flavonoides en todos los extractos. Las pruebas para alcaloides fueron positivas solo para las dos especies de *Ariocarpus*; en cambio la prueba de Salkowski para saponinas fue positiva en los extractos de *A. retusus* tallo y *F. splendens*. Solamente el extracto de *A. retusus* raíz presentó grupos aromáticos.

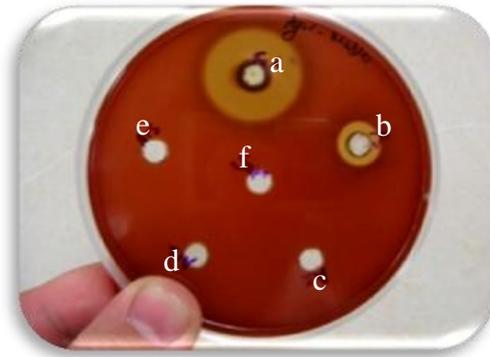
**Tabla IV**  
Identificación de grupos funcionales y metabolitos secundarios en los extractos metanólicos

Pruebas Químicas	Extractos metanólicos			
	<i>Ariocarpus kotschoubeyanus</i>	<i>Ariocarpus retusus</i>		<i>Fouquieria splendens</i>
	<b>AK</b>	<b>ART</b>	<b>ARR</b>	<b>FS</b>
<b>KMnO<sub>4</sub></b> (Insaturaciones)	+	+	+	+
<b>2,4-Dinitrofenilhidracina</b> (Carbonilo)	+	+	+	+
<b>FeCl<sub>3</sub></b> (Oxidrilos fenólicos)	+	+	+	+
<b>Salkowski</b> (Esteroles y Metilesteroles)	+	+	+	+
<b>NaOH al 10%</b> (Cumarinas)	+	+	+	+
<b>Sol'n alcohólica NaOH al 10%</b> (Lactonas)	+	-	+	+
<b>Baljet</b> (Sesquiterpenlactonas)	+	+	+	+
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> (Flavonoides)	+	+	+	+
<b>HCl 2N en Propanol-1</b> (Leucoantocianinas)	+	+	+	-
<b>Dragendorff</b> (Alcaloides)	+	+	+	-
<b>Bicarbonato de Sodio</b> (Saponinas)	+	+	+	+
<b>Salkowski para</b> (Saponinas)	-	+	-	+
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Formaldehído</b> (Aromaticidad)	-	-	+	-

**AK** = *Ariocarpus kotschoubeyanus* extracto metanólico, **ART** = *Ariocarpus retusus* (tallo) extracto metanólico, **ARR** = *Ariocarpus retusus* (raíz) extracto metanólico, **FS** = *Fouquieria splendens* extracto metanólico.

### 8.3.1 Prueba para la determinación de saponinas

Para corroborar la presencia de saponinas en los extractos, se utilizó la prueba de lisis de eritrocitos en agar sangre. Los extractos se disolvieron a una concentración de 250 mg/mL, se hicieron pozos en el agar y se adicionaron 100 µL, se midió el halo de lisis a las 24 horas. La prueba de agar sangre se consideró positiva al observarse hemólisis de los eritrocitos como se muestra en la Figura 14, donde *F. splendens* resultó con la mayor hemólisis (2.5 cm).



**Figura 14.** Hemolisis en agar sangre de los cuatro extractos metanólicos. a) *F. splendens* desgrasado, b) *F. splendens* c) *A. kotschoubeyanus*, d) *A. retusus* (tallo), e) *A. retusus* (raíz).

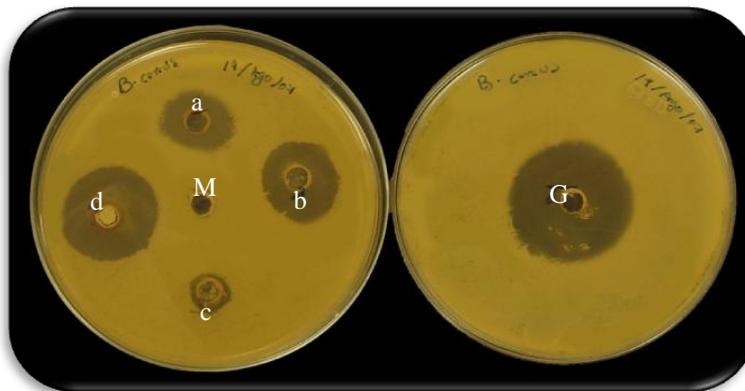
#### 8.4 Determinación de la actividad antibacteriana

En cuanto a la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos, los resultados se muestran en la Tabla V, observándose que el extracto de *Fouquieria splendens* (d) fue el que presentó mayor halo de inhibición contra *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli* y *S. aureus*, como se observa en la Figuras 15, 16, 17 y 18. El extracto de *A. retusus* tallo (b) mostró actividad contra *B. subtilis* y *B. cereus* como se observa en las Figuras 15 y 16. Los extractos de *A. kotschoubeyanus* (a) y *A. retusus* raíz (c) presentaron actividad contra *B. cereus* y *B. subtilis* Figuras 15 y 16, ningún extracto mostró actividad contra *Salmonella typhi*. El control positivo utilizado fue la gentamicina y como control negativo se utilizó metanol. La actividad antimicrobiana se midió en milímetros (mm), determinándose como débilmente activos aquellos extractos que presentaban de 5 a 10 mm de diámetro (++) , medianamente activos aquellos que mostraban una inhibición de 10 a 20 mm (+++), y altamente activos aquellos que presentaron actividad antibacteriana por arriba de 20 mm (++++).

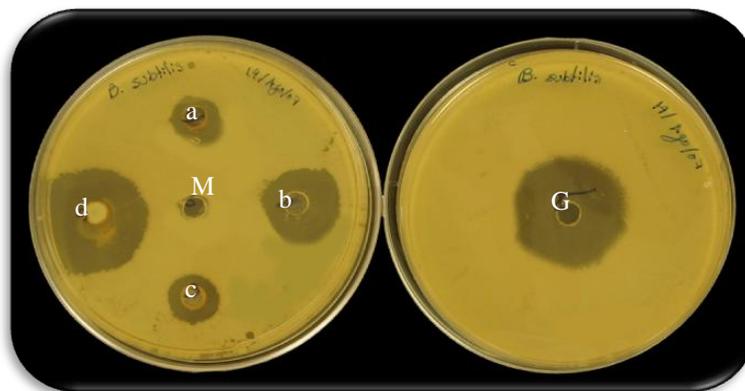
**Tabla V**  
Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos

Microorganismo	AK	ART	ARR	FS	Control (-) Metanol	Control (+) Gentamicina
<i>Bacillus cereus</i>	+++	+++	+++	++++	-	++++
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	++++	+++	++++	-	++++
<i>E. coli</i>	-	-	-	+++	-	+++
<i>Salmonella typhi</i>	-	-	-	-	-	++++
<i>S. aureus</i>	-	-	-	+++	-	++++

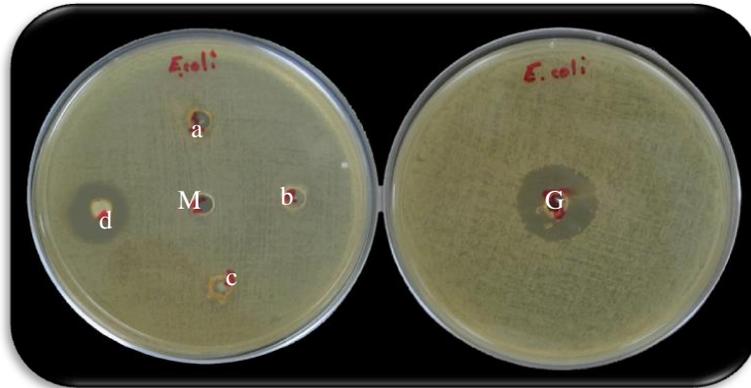
n = 3 + inhibición de 0 - 5 mm, ++ inhibición de 5 - 10 mm, +++ inhibición de 10 - 20 mm, +++++ inhibición > a 20 mm. Se inoculó 100 µL de una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^6$  UFC y se difundió homogéneamente con una asa Driblasky en cada caja petri, posteriormente se colocaron discos de papel filtro impregnados con 50 µL del extracto y un control negativo con etanol, 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.



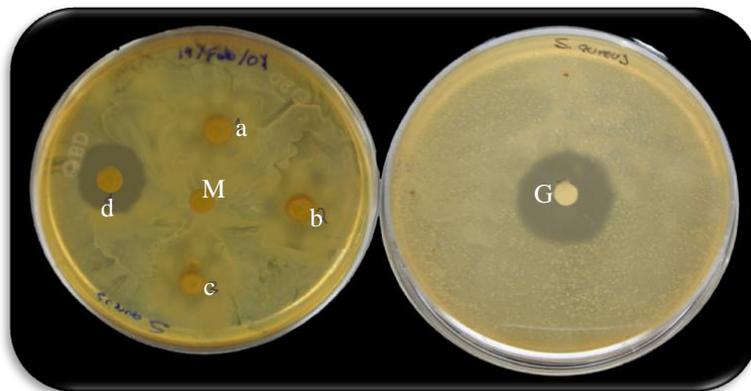
**Figura 15.** Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos sobre *B. cereus* a) AK, b) ART, c) ARR, d) FS, control (-) M metanol, control (+) G gentamicina.



**Figura 16.** Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos sobre *B. subtilis* a) AK, b) ART, c) ARR, d) FS, control (-) M metanol, control (+) G gentamicina.



**Figura 17.** Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos sobre *E. coli* a) AK, b) ART, c) ARR, d) FS, control (-) M metanol, control (+) G gentamicina.



**Figura 18.** Efecto inhibitorio de los extractos metanólicos sobre *S. aureus* a) AK, b) ART, c) ARR, d) FS, control (-) M metanol, control (+) G gentamicina.

### 8.5 Actividad antifúngica de los extractos sobre hongos dermatofitos

En las Tablas VI y VIII se muestran los resultados de la actividad antifúngica de los extractos de *A. kotschoubeyanus* y *A. retusus* raíz, los cuales no presentaron buena actividad contra las cepas probadas, los extractos que presentaron mayor actividad antifúngica a una dosis de 500 mg/mL fueron *A. retusus* tallo (b) Tabla VII y *F. splendens* (d) Tabla IX. Como control positivo se utilizó ketoconazol y como control negativo se utilizó metanol. La actividad antifúngica se midió en centímetros (cm) Figuras 19 y 20.

**Tabla VI**

Actividad antifúngica del extracto metanólico de *A. kotschoubeyanus* dosis del extracto 500 mg/mL en diferentes medios de cultivo

Hongos	<i>A. kotschoubeyanus</i>			Controles			
	AMH	APD	MCR	(ketoconazol) (+)			(metanol) (-)
				AMH	APD	MCR	
<i>M. gypseum</i>	-	1.5	-	2.0	2.0	1.7	-
<i>M. nanum</i>	-	-	-	5.1	4.5	5.5	-
<i>M. cookie</i>	-	-	-	4.3	3.8	-	-
<i>T. tonsurans</i>	1.3	-	-	2.6	2.5	-	-
<i>M. canis</i>	-	-	-	2.0	2.5	-	-

n = 3 AMH: Agar Mueller Hinton, APD: Agar Papa Dextrosa, MCR: Medio C. Rivas, (-) No inhibición. Inhibición medida en cm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes.

**Tabla VII**

Actividad antifúngica del extracto metanólico de *A. retusus* (tallo) dosis del extracto 500 mg/mL en diferentes medios de cultivo

Hongos	<i>A. retusus</i> (tallo)			Controles			
	AMH	APD	MCR	(ketoconazol) (+)			(metanol) (-)
				AMH	APD	MCR	
<i>M. gypseum</i>	1.6	1.9	4.0	2.0	2.0	1.7	-
<i>M. nanum</i>	3.0	1.5	5.0	5.1	4.5	5.5	-
<i>M. cookie</i>	2.5	2.5	-	4.3	3.8	-	-
<i>T. tonsurans</i>	2.5	2.5	-	2.6	2.5	-	-
<i>M. canis</i>	-	-	-	2.0	2.5	-	-

n = 3 AMH: Agar Mueller Hinton, APD: Agar Papa Dextrosa, MCR: Medio C. Rivas, (-) No inhibición. Inhibición medida en cm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes.

**Tabla VIII**

Actividad antifúngica del extracto metanólico de *A. retusus* (raíz) dosis 500 mg/mL en diferentes medios de cultivo

Hongos	<i>A. retusus</i> (raíz)			Controles			
	AMH	APD	MCR	(ketoconazol) (+)			(metanol) (-)
				AMH	APD	MCR	
<i>M. gypseum</i>	1.0	1.6	-	2.0	2.0	1.7	-
<i>M. nanum</i>	2.0	-	-	5.1	4.5	5.5	-
<i>M. cookie</i>	-	-	-	4.3	3.8	-	-
<i>T. tonsurans</i>	1.3	-	-	2.6	2.5	-	-
<i>M. canis</i>	-	-	-	2.0	2.5	-	-

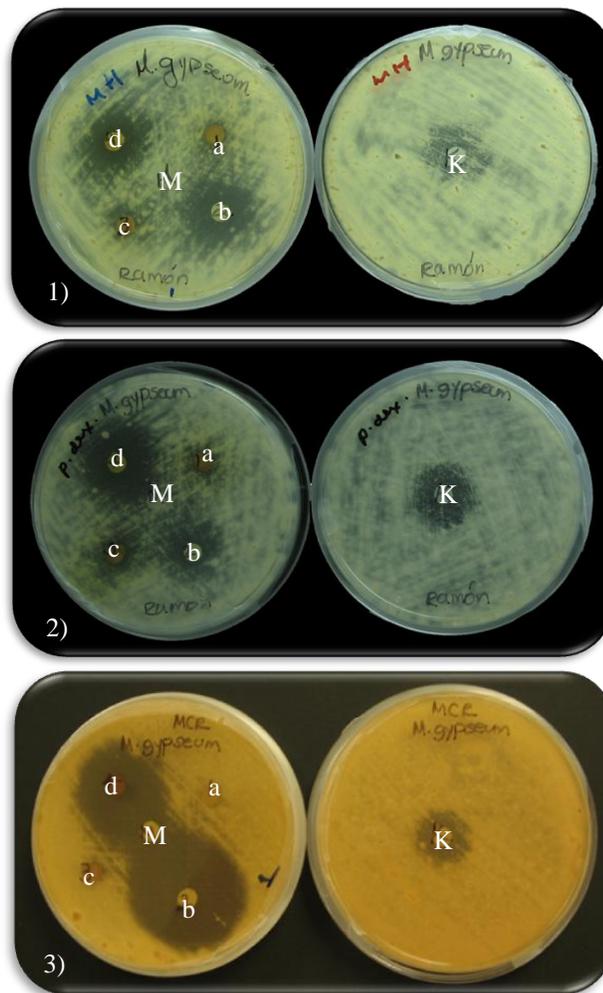
n = 3 AMH: Agar Mueller Hinton, APD: Agar Papa Dextrosa, MCR: Medio C. Rivas, (-) No inhibición. Inhibición medida en cm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes.

**Tabla IX**

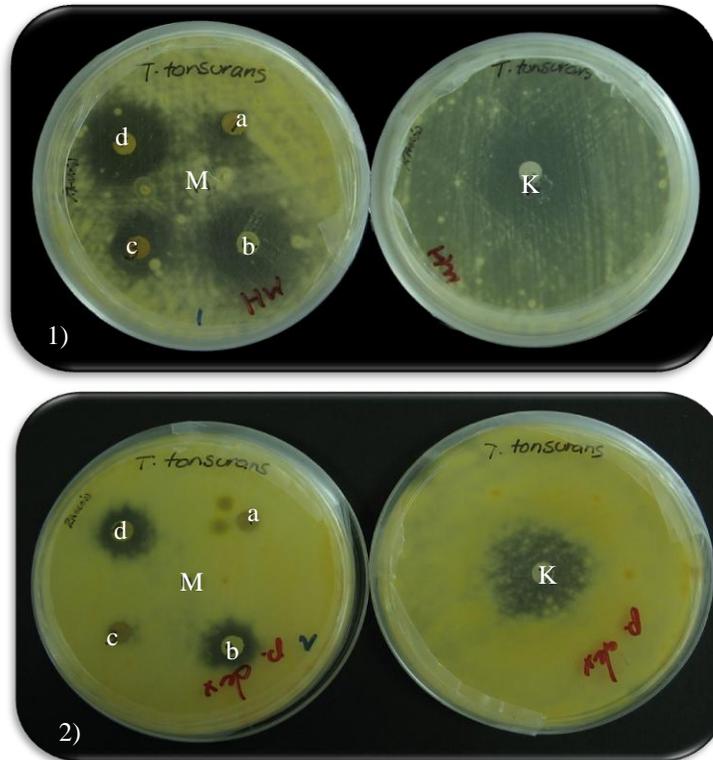
Actividad antifúngica del extracto metánolico de *F. splendens* dosis 500 mg/mL en diferentes medios de cultivo

Hongos	<i>F. splendens</i>			Controles			
				(ketoconazol) (+)			(metanol) (-)
	AMH	APD	MCR	AMH	APD	MCR	
<i>M. gypseum</i>	1.8	3.0	3.0	2.0	2.0	1.7	-
<i>M. nanum</i>	2.0	1.8	4.8	5.1	4.5	5.5	-
<i>M. cookie</i>	2.0	3.1	-	4.3	3.8	-	-
<i>T. tonsurans</i>	2.0	2.0	-	2.6	2.5	-	-
<i>M. canis</i>	1.8	2.3	-	2.0	2.5	-	-

n = 3 AMH: Agar Mueller Hinton, APD: Agar Papa Dextrosa, MCR: Medio C. Rivas, (-) No inhibición. Inhibición medida en cm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes.



**Figura 19.** Actividad de los extractos contra *M. gypseum* a la concentración de 500 mg/mL, de *A. kotschoubeyanus* (a), *A. retusus* (tallo) (b), *A. retusus* (raíz), (c) y *F. splendens* (d) en diferentes medios de cultivo, 1) Agar Mueller Hinton (AMH), 2) Agar Papa Dextrosa (APD), 3) Medio C. Rivas (MCR) en donde se observa que los extractos de *A. retusus* (tallo) y *F. splendens* presentan mayor actividad.



**Figura 20.** Actividad de los extractos contra *T. tonsurans* a la concentración de 500 mg/mL, de *A. kotschoubeyanus* (a), *A. retusus* (tallo) (b), *A. retusus* (raíz), (c) y *F. splendens* (d) en diferentes medios de cultivo, 1) Agar Mueller Hinton (AMH), 2) Agar Papa Dextrosa (APD), en donde se observa que los extractos de *A. retusus* tallo y *F. splendens* presentan mayor actividad.

En vista de los resultados obtenidos para *A. retusus* y *F. splendens*, se decidió probar estos dos extractos a dosis más bajas (250 y 125 mg/mL) Tablas X y XI encontrándose que también presentaban actividad en dosis más bajas. Como control positivo se utilizó ketoconazol y como control negativo se utilizó metanol. La actividad antifúngica se midió en centímetros (cm) y se puede apreciar en las Figuras 21 y 22.

**Tabla X**

Actividad antifúngica del extracto metanólico de *A. retusus* (tallo) dosis 250 y 150 mg/mL en diferentes medios de cultivo.

Hongos	<i>Ariocarpus retusus</i> (tallo)						Controles			
	250			125			(ketoconazol) (+)			metanol (-)
	AMH	APD	MCR	AMH	APD	MCR	AMH	APD	MCR	
<i>M. gypseum</i>	1.5	1.5	2.0	-	-	1.5	2.8	2.2	2.2	-
<i>M. nanum</i>	1.5	1.0	1.5	-	0.5	-	5.5	5.0	4.0	-
<i>M. cookie</i>	1.8	1.3	-	1.0	-	-	4.5	4.5	-	-
<i>T. tonsurans</i>	2.0	2.3	-	0.5	2.0	-	4.5	4.0	-	-
<i>M. canis</i>	-	-	-	-	-	-	2.0	2.5	-	-

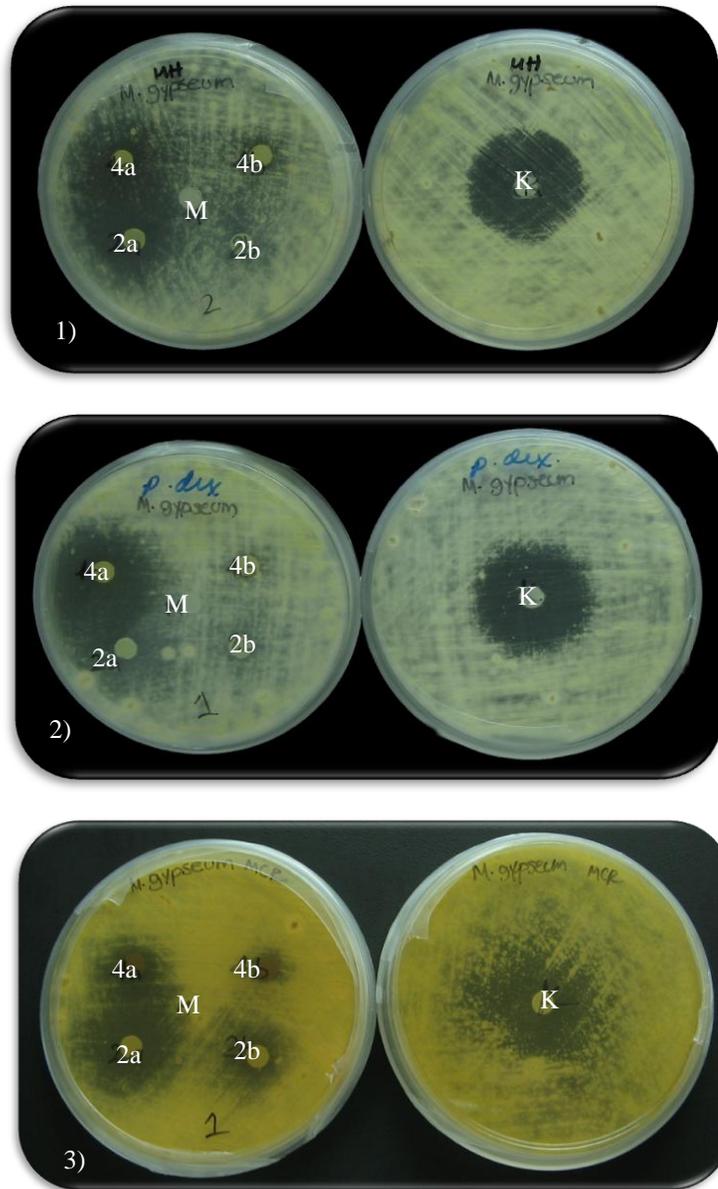
n = 3 AMH: Agar Mueller Hinton, APD: Agar Papa Dextrosa, MCR: Medio C. Rivas, (-) No inhibición. Inhibición medida en cm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes.

**Tabla XI**

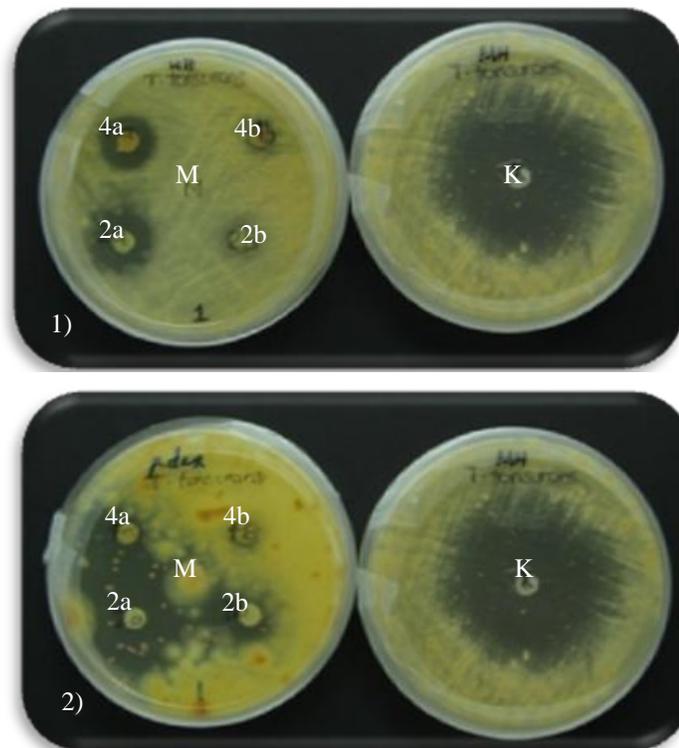
Actividad antifúngica del extracto metanólico de *F. splendens* dosis 250 y 150 mg/mL en diferentes medios de cultivo.

Hongos	<i>Fouquieria splendens</i>						Controles			
	250			125			(ketoconazol) (+)			metanol (-)
	AMH	APD	MCR	AMH	APD	MCR	AMH	APD	MCR	
<i>M. gypseum</i>	1.5	1.8	2.0	-	-	1.0	2.8	2.2	2.2	-
<i>M. nanum</i>	1.2	1.8	2.0	0.5	1.5	-	5.5	5.0	4.0	-
<i>M. cookie</i>	1.8	1.0	-	0.7	0.8	-	4.5	4.5	-	-
<i>T. tonsurans</i>	2.0	1.8	-	1.0	1.0	-	4.5	4.0	-	-
<i>M. canis</i>	-	-	-	-	-	-	2.0	2.5	-	-

n = 3 AMH: Agar Mueller Hinton, APD: Agar Papa Dextrosa, MCR: Medio C. Rivas, (-) No inhibición. Inhibición medida en cm. Se realizaron por triplicado 3 ensayos independientes.



**Figura 21.** Actividad de los extractos contra *M. gypseum* en la concentración de 250 y 125 mg/mL, de *A. retusus* (tallo) (2a=250 y 2b=125), y *F. splendens* (4a=250 y 4b=125) en diferentes medios de cultivo, 1) Agar Mueller Hinton (AMH), 2) Agar Papa Dextrosa (APD), 3) Medio C. Rivas (MCR), en donde se observa que los extractos de *A. retusus* (tallo) y *F. splendens* presentan actividad a dosis más bajas.



**Figura 22.** Actividad de los extractos contra *T. tonsurans* en la concentración de 250 y 125 mg/mL, de *A. retusus* (tallo) (2a=250 y 2b=125), y *F. splendens* (4a=250 y 4b=125) en diferentes medios de cultivo, 1) Agar Mueller Hinton, 2) Agar Papa Dextrosa, en donde se observa que los extractos de *A. retusus* (tallo) y *F. splendens* presentan actividad a dosis más bajas.

### 8.5.1 Análisis de varianza univariante relación hongos, extractos y medios de cultivo concentración 500 mg/mL.

Con el propósito de comparar la diferencia de los halos de inhibición (tratamiento-control) en base a los extractos se realizó un análisis de varianza de dos vías (extractos y medios), con una hipótesis nula de igualdad de medias de dichas diferencias, para cada factor y la interacción de ambos. Habiéndose encontrado que la hipótesis se rechaza, posteriormente se aplicó la prueba de Tukey para determinar entre que pares de medias existe las diferencia significativa. En la Tabla XII se presentan los resultados de tales pruebas.

**Tabla XII**

Análisis estadístico de varianza univariante de la actividad antifúngica de los extractos en la dosis 500 mg/mL en diferentes medios de cultivo (AMH y PDA)

Hongos	F <sup>a</sup> / P <sup>b</sup>			Tukey (Extractos)			
	Extractos	Medios	Ex./Medios	AK	ART	ARR	FS
<i>M. gypseum</i>	11.131 <sup>a</sup>	10.513	0.739	a	ab	bc	a
	0.003 <sup>b</sup>	0.012	0.558				
<i>M. nanum</i>	64.893	6.760	15.293	c	a	b	a
	0.000	0.032	0.001				
<i>M. cookie</i>	22.540	1.869	2.102	b	a	b	a
	0.000	0.209	0.178				
<i>T. tonsurans</i>	103.630	40.164	15.776	c	b	c	b
	0.000	0.000	0.001				
<i>M. canis</i>	25.600	3.600	0.400	b	b	b	a
	0.000	0.094	0.757				

En la prueba de Tukey las letras diferentes marcan diferencia significativa. (P < 0.05).

### 8.6 Bioensayo de toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*

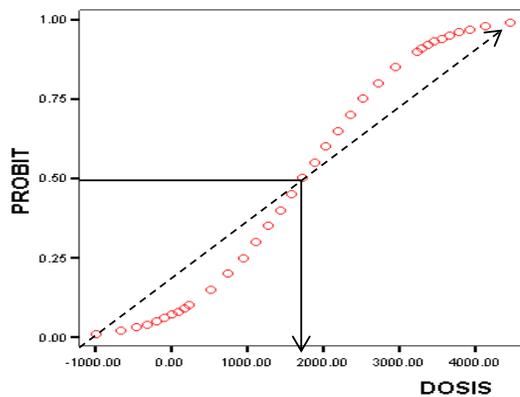
Con el propósito de determinar la DL<sub>50</sub> (Dosis Letal Media) de cada uno de los extractos metanólicos, se diseñó el experimento en base al análisis Probit, mediante el programa SPSS versión 17. Para evaluar la actividad toxica se adicionaron 100 µL de las diluciones de los extractos a probar, las concentraciones probadas estuvieron en un rango de 100 a 1000 µg/mL. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio 400 ppm y agua de mar como control negativo. A las 24 h de aplicados los extractos, se realizó el conteo de nauplios vivos por dosis.

En la Tabla XIII se muestran los resultados obtenidos para la actividad de letalidad sobre *Artemia salina* para cada uno de los extractos, no se observó actividad tóxica sobre *A. salina*, ya que los extractos presentaron dosis > 1000 µg/mL. En las gráficas 2, 3, 4 y 5 se muestran los resultados de las DL<sub>50</sub> de cada extracto.

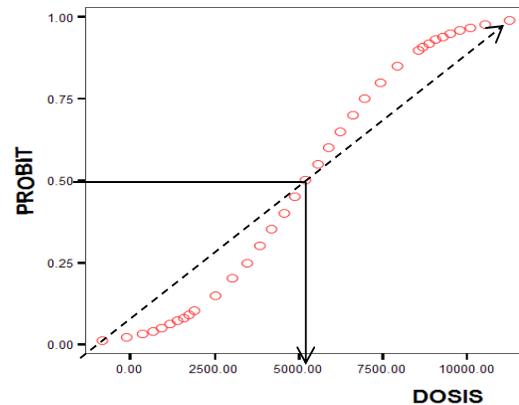
**Tabla XIII**  
Actividad de los extractos metanólicos sobre la letalidad de nauplios de *Artemia salina*

Ext. Metanólico	DL <sub>50</sub> (µg/mL)	X <sup>2</sup>	P
<i>A. kotschoubeyanus</i>	1863.3	36.6	0.837
<i>A. retusus</i> (tallo)	5222.4	39.14	0.753
<i>A. retusus</i> (raíz)	3959.5	65.70	0.030
<i>F. splendens</i>	1742.2	68.24	0.018

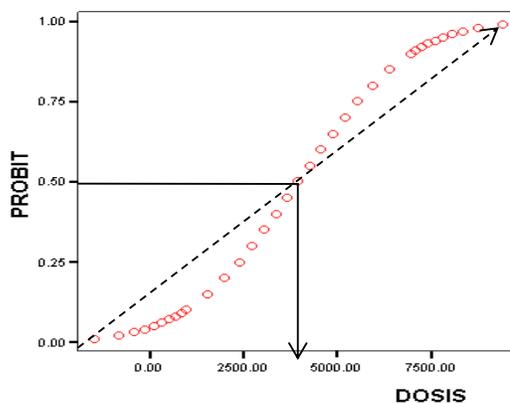
Valor de la DL<sub>50</sub> de los extractos contra *Artemia salina*, mediante el diseño estadístico Probit, mostrando el valor de la X<sup>2</sup> (Chi-cuadrada) y (P) la significancia de los resultados obtenidos.



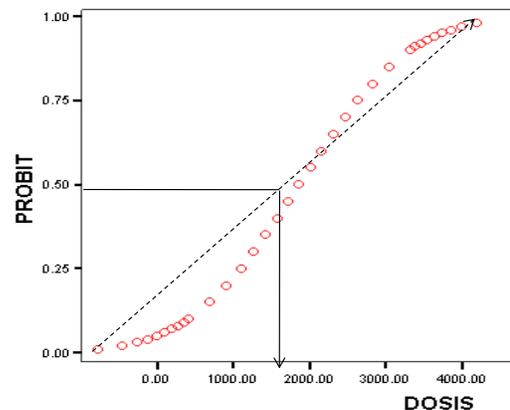
**Gráfica 2.** DL<sub>50</sub> extracto metanólico de *A. kotschoubeyanus* sobre *A. salina*.



**Gráfica 3.** DL<sub>50</sub> extracto metanólico de *A. retusus* (tallo) sobre *A. salina*.



**Gráfica 4.** DL<sub>50</sub> extracto metanólico de *A. retusus* (raíz) sobre *A. salina*.

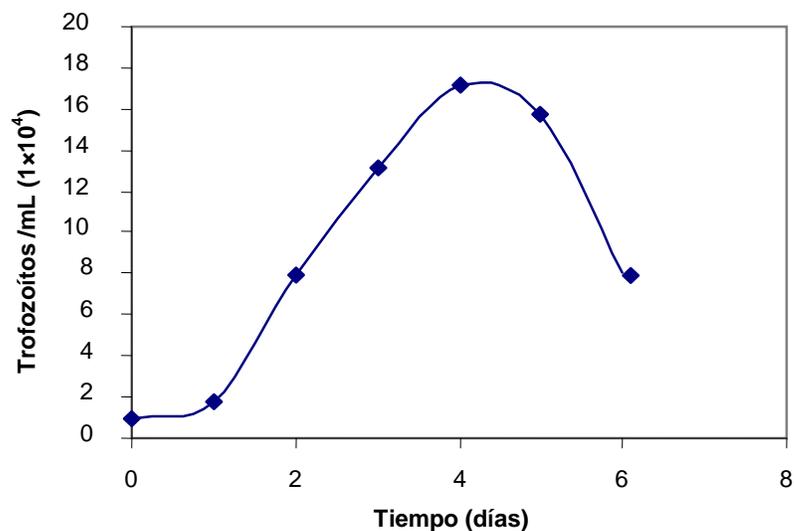


**Gráfica 5.** DL<sub>50</sub> extracto metanólico de *F. splendens* sobre *A. salina*.

## 8.7 Actividad anti*amibiana*.

### 8.7.1 Cinética de crecimiento de *Entamoeba histolytica* en el medio PT

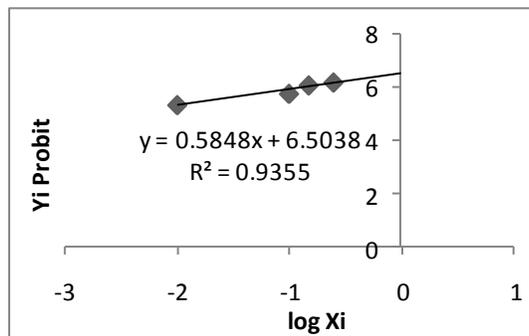
La cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS en medio PT se muestra en la gráfica 6, en la cual se observa una corta fase de adaptación durante las primeras 24 h, y posteriormente un crecimiento logarítmico hasta el 4° día alcanzando un rendimiento máximo de 171,875 trofozoítos/mL, posteriormente se observó una disminución gradual del rendimiento. No se observa una típica fase estacionaria, sino más bien un rápido descenso en el número de células después del cuarto día. Cada punto graficado representa el promedio de la lectura por triplicado de nueve tubos.



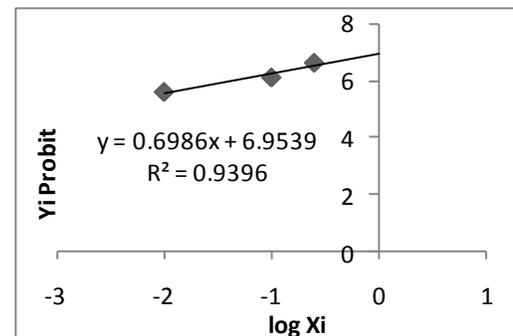
**Gráfica 6.** Cinética de crecimiento de *E. histolytica* HM1-IMSS en el medio PT. Aproximadamente al cuarto día se observa el máximo rendimiento celular. Se dispuso de 24 tubos (18 × 150 mm), adicionados con 5 mL del medio de cultivo PT, 0.05 mL de solución de penicilina-estreptomicina y 0.5 mL de suero bovino, cada tubo se inoculó con  $1 \times 10^4$  trofozoítos/mL. Posteriormente, se incubaron a 37 °C, y cada 24 h se determinó el crecimiento celular de tres tubos de cultivo hasta el cuarto día de incubación.

### 8.7.2 Determinación de la concentración inhibitoria media $CI_{50}$ de los extractos metanólicos sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica*

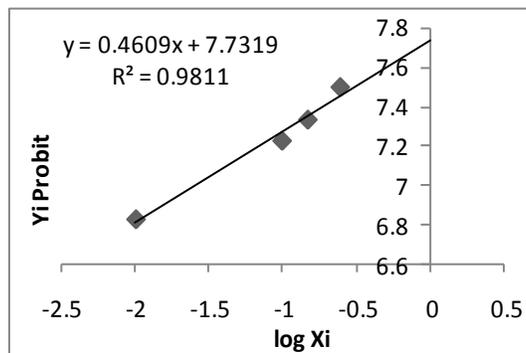
Una vez obtenidos los extractos metanólicos de las especies seleccionadas se procedió a evaluar su actividad amebicida sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica* HM1-IMSS como se describió en la estrategia experimental. La determinación de la  $CI_{50}$  de los extractos se obtuvo a través del análisis Probit y empleando la ecuación  $Y = mx + b$ , gráficas 7, 8, 9 y 10.



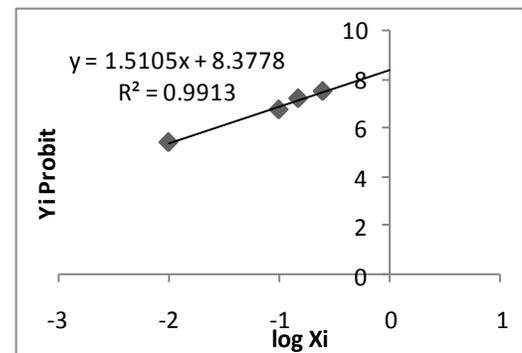
**Gráfica 7.** Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de *A. kotschoubeyanus* sobre cultivos de *E. histolytica*.



**Gráfica 8.** Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de *A. retusus* (tallo) sobre cultivos de *E. histolytica*.



**Gráfica 9.** Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de *A. retusus* (raíz) sobre cultivos de *E. histolytica*.



**Gráfica 10.** Diagrama de dispersión de las variables Yi Probit y Log Xi del extracto de *F. splendens* tallo sobre cultivos de *E. histolytica*.

En la Tabla XIV se muestran los resultados de la actividad antimibiana de los extractos, se observó que los extractos que tuvieron mejor actividad fueron los de

*A. retusus* (tallo) con una  $CI_{50}$  de 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , seguida del extracto de la misma especie pero del extracto de la (raíz) con una  $CI_{50}$  de 1.9  $\mu\text{g/mL}$ , *A. kotschoubeyanus* con una  $CI_{50}$  de 2.6  $\mu\text{g/mL}$  y *F. splendens* con una  $CI_{50}$  de 5.4  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla XIV**

Actividad de los extractos metanólicos sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica* HM1-IMSS

Extracto Metanólico	Dosis (mg/mL)	Media±D.E. Trofozoítos/mL	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$X^2$	P
<i>A. kotschoubeyanus</i>	0.01	87,656 ± 15,181	2.6	1722.3	0.000
	0.10	109,084 ± 18,063			
	0.15	120,394 ± 9,590			
	0.25	120,711 ± 6,969			
<i>A. retusus</i> (tallo)	0.01	111,301 ± 7,470	0.2	5398.4	0.000
	0.10	118,281 ± 9,006			
	0.15	129,322 ± 4,735			
	0.25	130,513 ± 4,223			
<i>A. retusus</i> (raíz)	0.01	106,431 ± 14,917	1.9	4477.1	0.000
	0.10	124,972 ± 8,316			
	0.15	127,219 ± 8,015			
	0.25	145,285 ± 3,447			
<i>F. splendens</i>	0.01	88,541 ± 18,235	5.4	1234.0	0.000
	0.10	129,679 ± 6,428			
	0.15	134,679 ± 1,339			
	0.25	135,572 ± 1,146			

Valor de la  $CI_{50}$  de los extractos contra *E. histolytica*, mediante el diseño estadístico Probit, mostrando el valor de la  $X^2$  (Chi-cuadrada) y (P) la significancia de los resultados obtenidos. Metronidazol  $CI_{50}$  = 0.111  $\mu\text{g/mL}$ .

### 8.7.3 Determinación del porcentaje de inhibición de los extractos metanólicos sobre el cultivo axénico *in vitro* de *E. histolytica*

En la Tabla XV se muestran los tratamientos cuyos rendimientos celulares presentaron diferencia significativa con respecto al control positivo (metronidazol [0.111  $\mu\text{g/mL}$ ]).

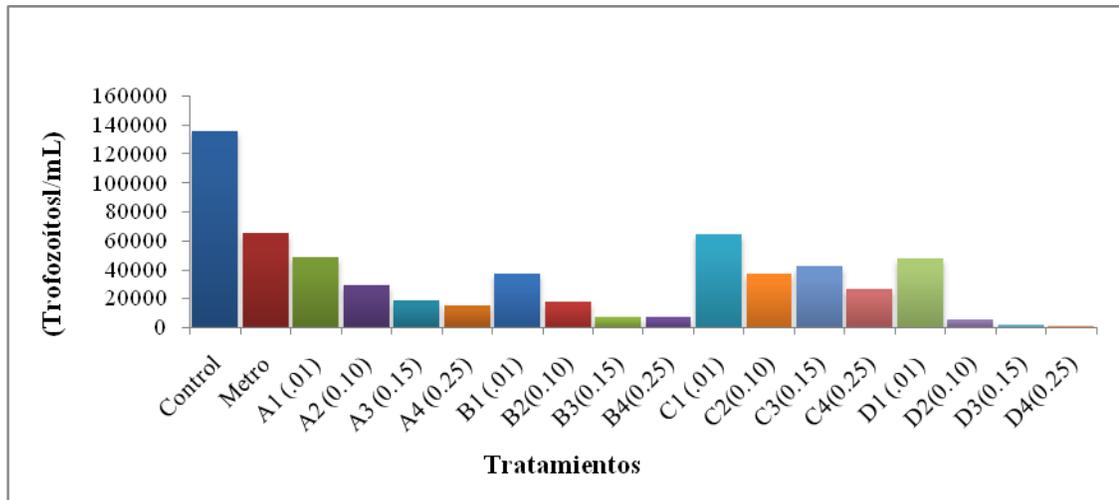
**Tabla XV**

Tratamientos que presentan diferencia significativa con respecto al control positivo y el porcentaje de inhibición

<b>Tratamientos</b>	<b>Concentración mg/mL</b>	<b>Viabilidad Trofozoítos/mL</b>	<b>% de inhibición</b>
Testigo control (-)	0.0	136,406	0.0
Metronidazol control (+)	0.111 (µg/mL)	65,300	52.12
<i>A. kotschoubeyanus</i>	0.01	48,750	64.26
	0.10	29,653	78.26
	0.15	18,750	86.25
	0.25	15,694	88.49
<i>A. retusus (tallo)</i>	0.01	37,500	72.50
	0.10	18,125	86.71
	0.15	7,083	94.80
	0.25	6,964	94.89
<i>A. retusus (raíz)</i>	0.01	64,535	52.68
	0.10	37,226	72.70
	0.15	42,691	68.70
	0.25	26,899	80.28
<i>F. splendens</i>	0.01	47,864	64.91
	0.10	5,500	95.96
	0.15	1,875	98.62
	0.25	833	99.38

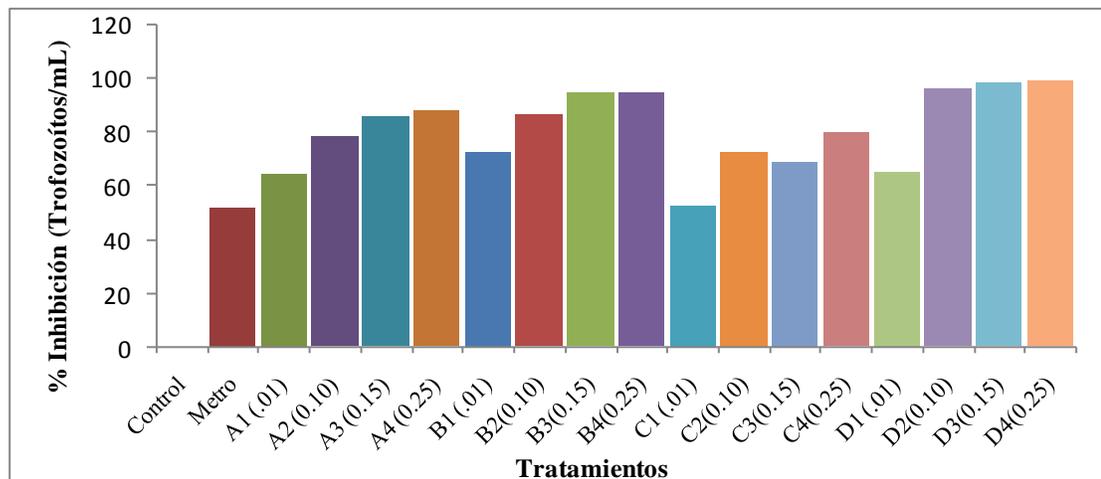
En la gráfica 11 se encuentra graficado el rendimiento celular obtenido en base a las concentraciones evaluadas de los extractos probados sobre los cultivos axénicos *in vitro* de *E. histolytica*. De acuerdo a estos resultados, se observa que el testigo (cultivo de *E. histolytica*) presentó una viabilidad celular aproximada de 136,406 trofozoítos/mL en el control positivo, mientras que el metronidazol con una  $CI_{50} = 0.111 \mu\text{g/mL}$  obtuvo una viabilidad celular de 65,300 trofozoítos/mL, se observó que los tratamientos

evaluados, presentaron diferencia significativa con respecto al testigo y los tratamientos presentaron diferencia significativa con respecto al control positivo, el metronidazol.



**Gráfica 11.** Viabilidad celular de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS con respecto a los extractos metanólicos. A) *A. kotschoubeyanus*, B) *A. retusus* (tallo), C) *A. retusus* (raíz), D) *F. splendens*, y controles positivo y negativo.

En la gráfica 12 se encuentra graficado el porcentaje de inhibición celular en base a las concentraciones evaluadas de los extractos probados sobre los cultivos axénicos *in vitro* de *E. histolytica* en donde se observó que los extractos de *A. retusus* (tallo) y *F. splendens* presentaron mayor porcentaje de inhibición con respecto a los demás extractos.

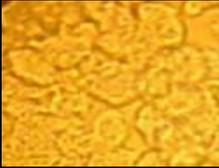
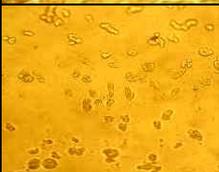
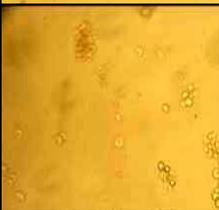
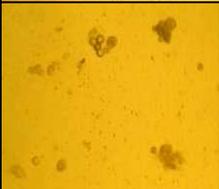


**Gráfica 12.** Porcentaje de inhibición celular de *Entamoeba histolytica* HM1-IMSS en contacto con los extractos metanólicos. A) *A. kotschoubeyanus*, B) *A. retusus* (tallo), C) *A. retusus* (raíz), D) *F. splendens*, y controles positivo y negativo.

En la Tabla XVI se muestran diferentes aspectos morfológicos de trofozoítos de *E. histolytica* cultivados en presencia de los extractos evaluados.

**Tabla XVI**

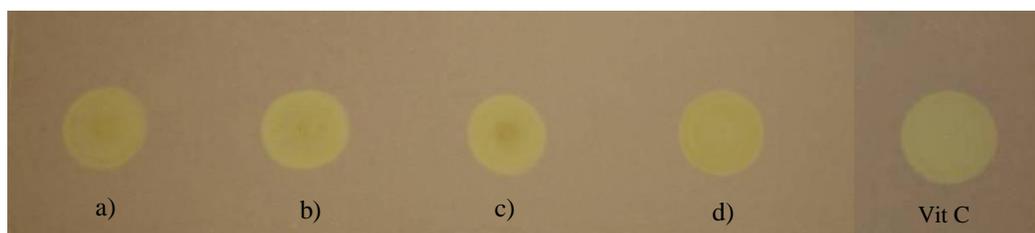
Diferentes aspectos morfológicos de trofozoítos de *E. histolytica* cultivados en presencia de los extractos evaluados.

Tratamientos	Imagen	Observación
Testigo		Se observan trofozoítos con el típico aspecto pleomórfico, los cuales tapizan la base del tubo al cuarto día de incubación (100X).
Control (+) Metronidazol [0.111 µg/mL]		Se observan trofozoítos de aspecto pleomórfico, los cuales no alcanzan a tapizar la base del tubo al cuarto día de incubación (100X).
<i>A. kotschoubeyanus</i> A1 [0.01]		Al cuarto día de incubación, se observan escasos trofozoítos redondeados y despegados de la base del tubo (50X).
<i>A. retusus</i> tallo B1 [0.01]		Al cuarto día de incubación, se observa un marcado efecto inhibitorio, escasos trofozoítos redondeados y despegados de la base del tubo (50X).
<i>A. retusus</i> raíz C1 [0.01]		Se observan muy escasos trofozoítos, los cuales han perdido su aspecto pleomórfico, se observan esféricos lo cual indica marcado daño celular al cuarto día de incubación (50X).
<i>F. splendens</i> D4 [0.25]		Se observan muy escasos detritos celulares y ausencia total de trofozoítos típicos al cuarto día de incubación, (50X).

## 8.8 Actividad antiradical

### 8.8.1 Reacción de neutralización del radical DPPH

En la Figura 23 se muestra la presencia de sustancias antioxidantes en los extractos y en el control positivo, con la presencia de manchas de color amarillo sobre un fondo morado.



**Figura 23.** Determinación cualitativa de actividad antirradical de los extractos metanólicos sobre DPPH. a) *A. kotschoubeyanus*, b) *A. retusus* (tallo), c) *A. retusus* (raíz), d) *F. splendens*, Vitamina “C”.

### 8.8.2 Determinación de la CE<sub>50</sub> de los extractos metanólicos

En la Tabla XVII se muestran los resultados obtenidos para la actividad antioxidante de los extractos metanólicos en la reacción con DPPH, en donde se observa que el extracto de *F. splendens* mostró una mejor actividad comparada con los demás extractos teniendo una CE<sub>50</sub> de 130.2 µg/mL.

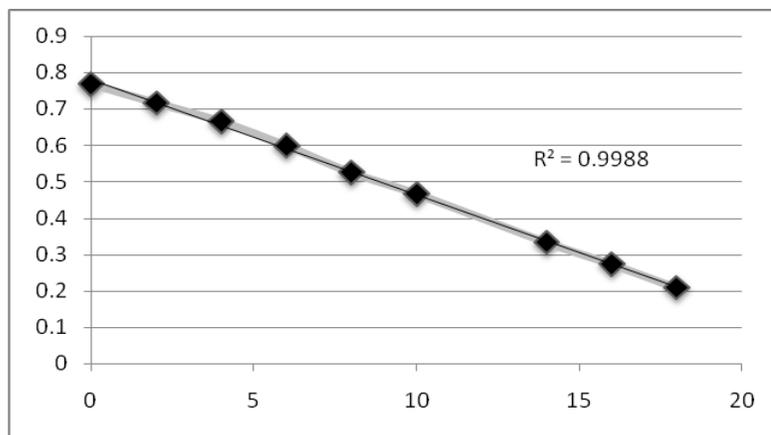
**Tabla XVII**

Actividad antirradical CE<sub>50</sub> de los extractos metanólicos.

Extracto Metanólico	CE <sub>50</sub> (µg/mL)	X <sup>2</sup>	p
<i>A. kotschoubeyanus</i>	335.4	10.50	.311
<i>A. retusus</i> (tallo)	258.2	2.03	.566
<i>A. retusus</i> (raíz)	263.9	.886	1.00
<i>F. splendens</i>	130.2	13.57	.482
Vitamina “C”	12.3	16.83	.032

La Concentración Efectiva (EC<sub>50</sub>) indica la concentración necesaria para reducir el 50% del radical DPPH y se determinó mediante el diseño estadístico Probit, mostrando el valor de la X<sup>2</sup> (Chi-cuadrada) y (P) la significancia de los resultados obtenidos.

En la gráfica 13 se observa el valor  $R^2$  de las lecturas de las concentraciones de la vitamina “C” como control positivo para la determinación de la actividad antirradical.



**Gráfica 13.**  $R^2$  de las concentraciones de la vitamina “C” con respecto al DPPH.

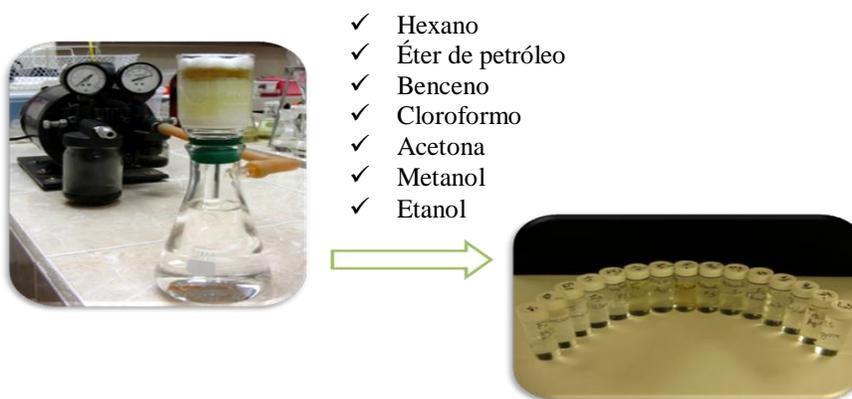
## 8.9 Cromatografía

Se probaron diferentes eluentes para lograr una mejor separación de los compuestos del extracto metanólico de *F. splendens*. Se utilizaron las siguientes combinaciones: Cloruro de metilo-Cloroformo-Acetona (6:3:1), Etanol-Butanol-Hidróxido de amonio (4:4:1), los cuales no resultaron en una buena separación de las fracciones.

### 8.9.1 Separación preliminar de los compuestos por cromatografía en columna al vacío.

Se montó una columna de sílica gel para separar mejor las fracciones de los extractos activos, una para *A. retusus* (tallo) y otra para *F. splendens* (Figura 24). Se recogieron fracciones cada 100 mL. La serie eleutrópica empleada fue: hexano, éter de petróleo, benceno, cloroformo, acetona, metanol y etanol. Se utilizaron 110 g de sílica gel 60 (0.2 – 0.5 mm) marca Merck para empacar la columna en un embudo de vidrio sinterizado.

- Mezcla Eleutrópica 100 mL de cada solvente.



- ✓ Hexano
- ✓ Éter de petróleo
- ✓ Benceno
- ✓ Cloroformo
- ✓ Acetona
- ✓ Metanol
- ✓ Etanol

**Figura 24.** Cromatografía al vacío de los extractos metanólicos de *A. retusus* (tallo) y *F. splendens*.

### 8.9.2. Rendimiento de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna al vacío

En la Tabla XVIII se observan los rendimientos de las fracciones obtenidas de los extractos crudos de *A. retusus* (tallo) y *F. splendens*, la fracción acetónica de *A. retusus* tallo fue la que tuvo el mayor rendimiento con respecto a las demás fracciones de este extracto, para *F. splendens* la fracción metanólica fue la que mostró un mayor rendimiento.

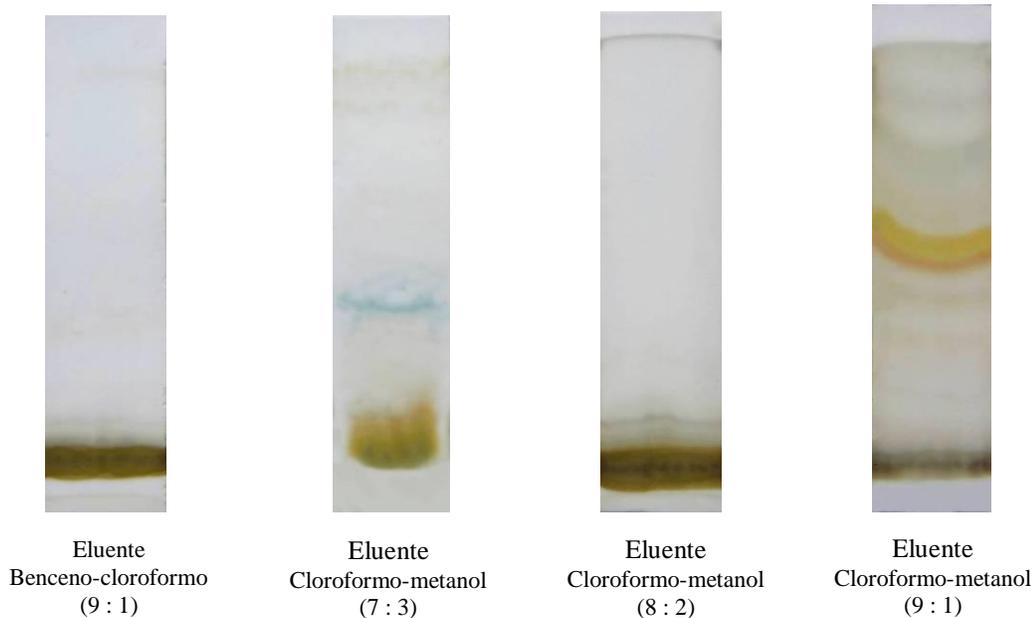
**Tabla XVIII**

Rendimiento de las fracciones obtenidas por VCL de los extractos metanólicos de *A. retusus* (tallo) y *F. splendens*

<i>A. retusus</i> (tallo) (2.4696 g)		<i>F. Splendens</i> (5.9880 g)	
Solvente	%	Solvente	%
Hexano	0.55	Hexano	0.39
Éter de petróleo	9.45	Éter de petróleo	0.026
Benceno	14.53	Benceno	6.45
Cloroformo	0.96	Cloroformo	0.84
Acetona	55.69	Acetona	12.27
Metanol	13.60	Metanol	22.44
Etanol	1.59	Etanol	7.29

### 8.9.3. Cromatografía en capa fina *F. splendens* fracción acetónica obtenida por la separación de columna al vacío.

Se tomó la fracción acetónica para hacer cromatografías y observar si esta fracción estaba pura o mostraba otras fracciones, encontrándose que el mejor eluyente fue cloroformo-metanol (9:1). (Figura 25).



**Figura 25.** Separación cromatográfica de la fracción acetónica de *F. splendens* obtenida por cromatografía al vacío.

En la Tabla XIX se observan las bandas obtenidas de la fracción acetónica *F. splendens* y su respuesta a la luz UV y Cloruro de cobalto, las cuales se separaron mejor con el eluyente cloroformo-metanol (9:1).

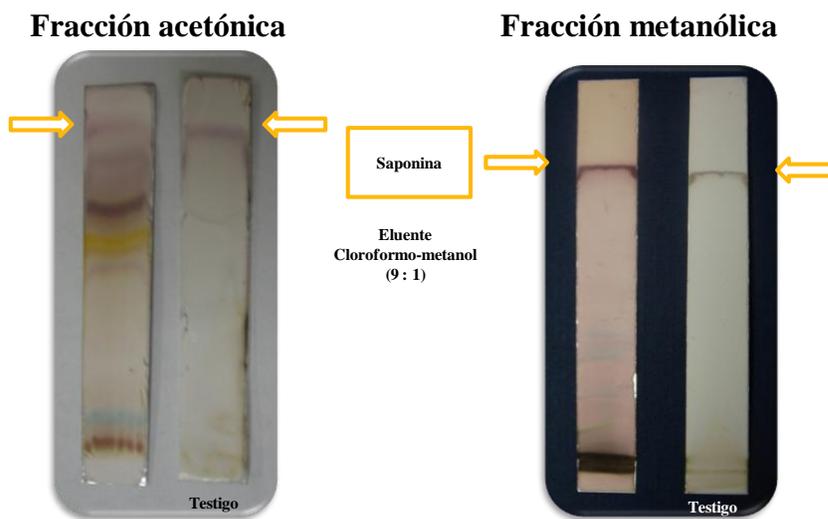
**Tabla XIX**

Bandas obtenidas de la fracción acetónica *F. splendens* y su respuesta a la luz UV y  $\text{CoCl}_2$  eluente cloroformo-metanol (9:1)

Fracciones (Rf)	Luz UV	Cloruro de Cobalto
1.- (0.125)	Amarilla	-
2.- (0.275)	Amarilla	-
3.- (0.425)	-	Verde
4.- (0.5)	-	Roja
5.- (0.55)	-	Amarilla
6.- (0.75)	-	Verde
7.- (0.825)	-	Gris
8.- (0.9)	Gris	-
9.- (1.0)	Gris	-

#### 8.9.4. Comprobación de la presencia de saponinas mediante una cromatografía capa fina de las fracciones acetónica y metanólica de *F. splendens*

Usando un control positivo de una saponina comercial (marca JT. Baker Chemical Co. Phillipsburg. N. J. saponina purificada polvo Lote N° 24.112) se comparó la banda de la saponina control positivo con respecto a la banda que está presente en la fracción acetónica y metanólica (Figura 26).

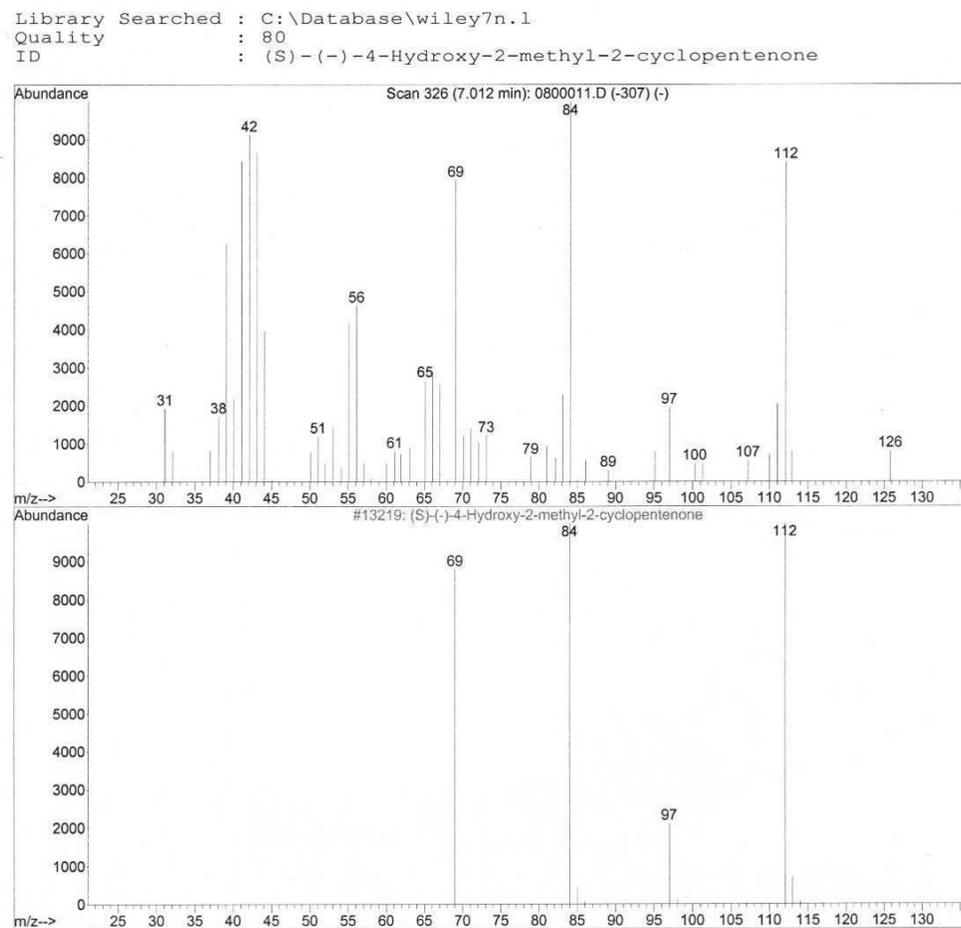


**Figura 26.** Cromatografía comparativa de la fracción acetónica y metanólica del extracto de *F. splendens* (presencia de una saponina).

## 8.9.5. Resultados de métodos espectroscópicos

### 8.9.5.1 Análisis por cromatografía de gases con detector de espectrómetro de masas (GC-MS) del extracto metanólico de tallo de *F. splendens*.

En el espectro de masas (Figura 27), se observa el ión molecular en 112 m/z que corresponde a la fórmula  $C_6H_8O_2$ , el pico base a 84 m/z corresponde a  $M^+ - 28$  ( $M^+ - CO$ ), característico de las cetonas, el pico 97 m/z  $M^+ - 15$  ( $M^+ - CH_3$ ), indica la pérdida de un metilo, por lo que se propone que el compuesto corresponde a 4-hidroxi-2-metil-2-ciclopentenona, la cual se identificó con un 80 % de certeza de acuerdo a la librería Wiley 7n.1 de la base de datos del equipo (HP19091J-433 Hewelwt Packard, Abonadle, PA).



**Figura 27.** Espectro de masas, del extracto metanólico de *F. splendens* (parte superior) y 4-hidroxi-2-metil-2-ciclopentenona (parte inferior) de acuerdo a la biblioteca Wiley 7n.1.

## 9. DISCUSIÓN

Las plantas evaluadas en este estudio fueron seleccionadas en base a varios criterios: 1) por sus características etnofarmacológicas; 2) por su distribución en el estado de Nuevo León y 3) por consideración a reportes previos de actividad antimicrobiana y antifúngica de otras especies de la familia cactáceas (Maldonado, 2008 y Morales *et al.*, 2004) y los reportes de usos en medicina tradicional para la familia Fouquieriaceae (Moore, 1989).

Los extractos metanólicos de *A. kotschobeyanus*, *A. retusus* y *F. splendens*, presentaron diversos compuestos de los tres grupos principales en donde Kuklinski, (2000), clasifica a los metabolitos secundarios, isoprenoides: terpenos, saponinas; derivados fenólicos: fenoles y ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas y alcaloides.

La prueba de cloruro férrico para la determinación de oxidrilos fenólicos fue positiva para todos los extractos, pudiendo significar la presencia de algún tanino vegetal, según (Pérez, 2000). Los taninos son un grupo heterogéneo de compuestos polihidroxifenólicos; el estudio químico preliminar de 31 cactáceas mexicanas dio positivo para taninos en las especies, *Lophophora williamsii*, *Epithelantha micromeris* y *Ariocarpus retusus* (Domínguez *et al.*, 1969).

Álvarez, (1976) en un estudio químico de la raíz de *F. splendens* reporta la presencia de una mezcla de triterpenos: ocotillo, fouquierol e isofouquierol. Lo cual concuerda con nuestros resultados ya que la coloración rojo-naranja de la prueba de Salkowski en todos los extractos determinó la presencia de esteroides y metilesteroides en los cuatro extractos (Pérez, 2000).

Kuklinski, (2000), menciona que la prueba de Salkowski para saponinas puede diferenciar entre saponinas triterpénicas y esteroideas, cuando las primeras dan una coloración rosa-púrpura y las segundas azul-verde; en este ensayo resultó positiva la presencia de saponinas triterpénicas para los extractos de *A. retusus* (tallo) y *F. splendens*. Domínguez y Domínguez, (1976), mencionan que no se han encontrado mono, sesqui y diterpenoides en las cactáceas, pero si tritepenoides, como alcoholes y ácidos triterpénicos, también unidos a carbohidratos formando saponinas.

Mediante la prueba de hemólisis en agar sangre se observó la presencia de saponinas en los extractos de *A. retusus* (tallo) y *F. splendens* y usando un control positivo de una saponina purificada se comparó la fracción acetónica y metanólica del extracto de *F. splendens* por cromatografía en capa fina y se vio que correspondían a la misma fracción de la saponina control. Entre los efectos biológicos que presentan las saponinas se encuentran la capacidad de reducir la tensión superficial y alterar la permeabilidad de las membranas celulares. Su actividad antimicrobiana se pudo apreciar al encontrar que el extracto con mayor cantidad de saponinas fue del de *F. splendens* el cual tuvo mayor actividad antimicrobiana y antifúngica. Entre las propiedades químicas de las saponinas su polaridad, hidrofobicidad y naturaleza de los grupos reactivos constituyen determinantes importantes de sus propiedades biológicas (Dominicis *et al.*, 1995). Yoshikoshi *et al.*, (1996) menciona que en el caso de las saponinas triterpenoidales, tanto las saponinas crudas como las purificadas tienen acción estimulante sobre el sistema nervioso central, antipirética, sedante, expectorante, antitusiva, previenen las úlceras provocadas por el estrés, aceleran la movilidad intestinal y muestran actividad antiinflamatoria, promueven la síntesis de RNA y de proteínas, lo cual concuerda con (Moore, 1989), quien menciona que la tintura del tallo fresco de *Fouquieria splendens* comúnmente llamado ocotillo es usado en casos de circulación pobre en el área pélvica.

La prueba de ácido sulfúrico para la determinación de flavonoides fue positiva para todos los extractos, según Molinas, 2001 la coloración de la reacción puede determinar la clasificación de los flavonoides presentes en el extracto. Domínguez *et al.*,

(1969), obtuvieron pruebas positivas de flavonoides en las siguientes especies: *Ariocarpus retusus*, *Echinocereus grandis*, *Ferrocactus pringlei*, *Echinocereus merkeri* y *Cephalocereus hoppenstedtii*. Lomeli, 1976 reporta en un estudio químico de *A. retusus* la presencia de un flavonoide con un grupo aromático la retusina, lo que se pudo confirmar al encontrar flavonoides en esta especie, así como la presencia de un grupo aromático por la prueba del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-formaldehído solo para esta especie (Lomeli Uribe S., 1976).

Los alcaloides se encontraron solamente en los extractos metanólicos de *A. kotschoubeyanus* y *A. retusus*, lo cual coincide con lo citado por (Domínguez, 1973), al mencionar que debido a su propiedad alcalina, los alcaloides son fácilmente extraídos con disolventes neutros, tales como algunos alcoholes, además de que se asocia su presencia exclusiva como una forma de protección de la planta ante actos predatorios de insectos y animales herbívoros.

El análisis espectroscópico de masas del extracto metanólico de tallo de *F. splendens* reveló el pico base a 84 m/z corresponde a  $M^+ - 28$  ( $M^+ - CO$ ), característico del grupo carbonilo de las cetonas, lo cual confirma el resultado de la 2,4-dinitrofenilhidracina al ser positiva para este extracto, la presencia de insaturaciones en la molécula, se comprobó con la prueba de KMnO<sub>4</sub>, y con el pico 69 m/z,  $M^+ - 43$  son característicos de una cetona insaturada en este caso la 4-hidroxi-2-metil-2-ciclopentenona, la cual se identificó con un 80 % de certeza obtenida de la librería de la base de datos del equipo Wiley 7n.1. Furuya *et al.*, (patente US 5675031) reporta que la 4-hidroxi-2-ciclopentenona compuesto del mismo grupo al identificado por espectroscopia de masas, es un agente anticancerígeno y un potenciador de la formación de huesos, compuesto que es también intermediario de la formación de prostaglandinas, las cuales son inhibidoras de la aglutinación plaquetaria y actividad vasodilatadora, utilizadas como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades del sistema periférico cardiovascular.

Treviño *et al.*, (2004) menciona la presencia de actividad biológica de los extractos metanólicos de *Ariocarpus kotschoubeyanus* y *Stenocereus pruinosus* contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi* y *Listeria monocitogenes*, lo cual es comparable con los resultados obtenidos en los extractos metanólicos probados los cuales presentaron actividad antimicrobiana a la dosis de 100 mg/mL, en cuanto a la determinación de la actividad antimicrobiana se observó que el extracto de *Fouquieria splendens* fue el que presentó la mejor actividad antimicrobiana al inhibir el crecimiento de *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, ningún extracto mostró actividad contra *Salmonella typhi*. Quizá el efecto bactericida se deba a la presencia de flavonoides, las plantas que viven en hábitats áridos o semiáridos acumulan flavonoides lipofílicos en las hojas resultados similares fueron reportados por (Moore, 1989).

Maldonado, (2008), menciona que el extracto metanólico de *Stenocereus pruinosus* presentó actividad fungicida sobre hongos dermatofitos a una dosis de 125 mg/mL. Las especies *A. retusus* y *F. splendens* tuvieron actividad antifúngica a la dosis más baja de 125 mg/mL en todas las especies de hongos probadas, quizá se deba a la presencia de saponinas, se sabe que estas son precursores de medicamentos esteroidales como hormonas sexuales, anticonceptivos orales, corticoides, diuréticos, también han mostrado diversas actividades biológicas como antimicrobianos, antitumorales, citotóxicos, ictiotóxicos, molusquicidas, antihelmínticos, espermicidas, antiinflamatorios y antihepatotóxicos. Los vegetales sintetizan metabolitos secundarios, como las fitoancipinas y las fitoalexinas, que se utilizan para defenderse de la infección por agentes fitopatógenos, entre ellos, los hongos; por esta razón dichas moléculas pueden ser candidatas para estudios *in vitro* contra agentes micóticos implicados en las infecciones humanas. (Taylor, 1998, Osbourn, 1999).

El análisis estadístico de varianza univariante para la actividad de los hongos dermatofitos reveló que en cuanto a la actividad de los extractos con respecto a las cepas probadas de hongos hay diferencia significativa entre hongos y dosis evaluadas de los extractos con respecto al control positivo de ketoconazol. Se encuentra diferencia

significativa en cuanto a los medios utilizados (AMH y PDA) con respecto a las cepas de hongos probadas, y en cuanto a la relación de extractos contra medios y hongos se vio que solamente *M. nanum* y *T. tonsurans* muestran diferencia significativa entre los medios, los extractos y las cepas probadas.

BIO-RAD (2000), menciona que el medio Agar Papa Dextrosa se usa para el aislamiento, y cultivo de hongos y levaduras, este medio es recomendado particularmente para detectar contaminación en alimentos, en el presente trabajo de investigación el comportamiento del medio Agar Papa Dextrosa se mostró de gran utilidad para las pruebas de sensibilidad ya que es un medio rico en nutrientes para el crecimiento de los hongos dermatofitos. El agar Mueller Hinton es un medio sólido que se usa para estudiar la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos, se encuentra perfectamente estandarizado, basado en las normas de la Organización Mundial de la Salud (estándar número 26 para sustancias biológicas, revisado en 1981), su pH ácido aumenta la actividad de los beta lactámicos, tetraciclinas, noboviocina, y fucidina, el pH alcalino aumenta la actividad de los aminoglucósidos, macrólidos, lincosamidas y estreptograminas. Las diferentes especies de hongos dermatofitos crecieron en este medio en un tiempo menor que en el agar Papa Dextrosa y en el Medio C. Rivas. El medio C. Rivas permite el crecimiento y mantenimiento de las cepas de hongos dermatofitos, pero no fue tan bueno para evaluar la sensibilidad de los hongos dermatofitos con respecto a los extractos.

En cuanto a la actividad toxica sobre *Artemia salina* para cada uno de los extractos, no se observó actividad sobre *A. salina*, ya que los extractos presentaron dosis  $> 1000 \mu\text{g/mL}$ . Maldonado, (2008), menciona que determinó la  $DL_{50}$  del extracto metanólico de *Stenocereus pruinosus* por medio de este bioensayo el cual no mostró un efecto tóxico al observarse una  $DL_{50}$  de  $826.72\text{mg/mL}$  con una diferencia significativa entre las concentraciones probadas. Morales, (2006), obtuvo una  $DL_{50}$  de  $64.57 \mu\text{g/mL}$  del extracto metanólico de *Lophocereus schottii* sobre la letalidad de crustáceo *A. salina*.

En cuanto a la actividad anti*amibiana*, Barrón, (2007) reporta que los extractos metanólicos de *Castela texana* fueron efectivos contra *E. histolytica*, obteniendo una  $CI_{50}$  de 218.5  $\mu\text{g/mL}$ , recientes investigaciones reportan la resistencia de la cepa HM1-IMSS de *E. histolytica* al metronidazol, droga de elección para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, se ha demostrado en estudios efectuados en ratones que el metronidazol es tanto mutagénico como carcinogénico (Samarawickream *et al.*, 1997).

Said *et al.*, (2005) reportan que los extractos acuosos, metanólicos, acetónicos y hexánicos de hojas de plantas adultas de *Artemisia ludoviciana* mostraron efectos contra *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* en condiciones *in vitro*. En base a los resultados obtenidos se observa una marcada inhibición del crecimiento axénico *in vitro* de *E. histolytica* en presencia del extracto metanólico de *Ariocarpus retusus* (tallo) con una  $CI_{50}$  de 0.2  $\mu\text{g/mL}$ , seguida de *A. retusus* (raíz) con una  $CI_{50}$  de 1.9  $\mu\text{g/mL}$ , *A. kotschoubeyanus* 2.6  $\mu\text{g/mL}$  y *F. splendens* 5.4  $\mu\text{g/mL}$ . Estos valores de  $CI_{50}$  son superiores a los del metronidazol ( $CI_{50}=111 \mu\text{g/mL}$ ), pero cabe recalcar que el metronidazol es una sustancia pura, por lo que es necesario hacer una separación y purificación de las sustancias con el fin de determinar si este efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. histolytica* es dado por la sinergia de varias de estas sustancias en el extracto o bien de manera individual.

Con base en el método de Cottele *et al.*, 1996 se evaluaron los extractos metanólicos de las especies para determinar la actividad antioxidante. *Fouquieria splendens* presentó la mejor actividad antioxidante con una  $CE_{50}$  de 130.2  $\mu\text{g/mL}$ , seguido de *A. retusus* (tallo) con 258.2  $\mu\text{g/mL}$ , *A. retusus* (raíz) 263.9  $\mu\text{g/mL}$  y *A. kotschoubeyanus* 335.4  $\mu\text{g/mL}$  estos resultados son comparables con Treviño *et al.*, (2006), que evaluó la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *Echinocereus stramineus*, *A. kotschoubeyanus* y *Stenocereus pruinosus* a diferentes concentraciones utilizando el radical 1,1-difenil-2-picrihidrazil y encontró que *Stenocereus pruinosus* tuvo una  $CE_{50}$  de 50 ppm, *A. kotschoubeyanus*  $CI_{50} > 50$  ppm y *Echinocereus stramineus*  $CI_{50}$  de 25 ppm; los extractos concentrados de esta cactácea, indican la presencia de oxidrilos fenólicos, lo que hace suponer que estos compuestos

pueden ser los responsables de esta actividad. Lee *et al.*, (2002), evaluaron la propiedad antioxidante de un extracto etanólico de *Opuntia ficus-indica* var. Saboten mediante varias técnicas, concluyendo que debido a la alta cantidad de fenoles (180.3 mg/g), puede ser que éstos compuestos sean los responsables de la propiedad antioxidante del extracto probado.

## 10. CONCLUSIONES

- El estudio fitoquímico indicó que los extractos metanólicos de *A. kotschoubeyanus*, *A. retusus* y *F. splendens* presentan: insaturaciones, grupo carbonilo, oxidrilos fenólicos, esteroides y triterpenos, cumarinas, lactonas, sesquiterpenlactonas, flavonoides y alcaloides.
- De los cuatro extractos metanólicos, el extracto de *F. splendens* presentó la mayor actividad antimicrobiana sobre el crecimiento de *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus* a la dosis de 100 mg/mL.
- Los extractos metanólicos de *A. retusus* (tallo) y *F. splendens* presentaron la mejor actividad antifúngica sobre las cepas de hongos dermatofitos probadas hasta en la dosis de 125 mg/mL.
- El análisis estadístico (Probit), para los extractos evaluados sobre nauplios de *Artemia salina* mostró que a las concentraciones probadas (100, 500 y 1000 ppm) no presentan toxicidad.
- El extracto de *A. retusus* (tallo) presentó la mayor actividad amebicida con una  $CI_{50}$  de 0.2  $\mu\text{g/mL}$ .
- Los extractos de *A. kotschoubeyanus*, *A. retusus* y *F. splendens* tuvieron actividad antirradical, la actividad más relevante fue de *F. splendens* con una  $CE_{50}$  de 130.2  $\mu\text{g/mL}$ , al reducir el radical DPPH.
- Se identificó por cromatografía en capa fina una saponina en el extracto de *F. splendens*, también se encontró otro compuesto la 4-hidroxi-2-metil ciclopentenona, el cual no se ha reportado para esta especie.
- En base a los resultados obtenidos, los extractos de *A. retusus* (tallo) y *F. splendens* pueden ser una alternativa para la obtención de fitofármacos como: antimicrobianos, antifúngicos y amebicidas, además de ser una fuente de antioxidantes.
- Se requiere seguir con estudios para la elucidación estructural de los metabolitos activos.

## 11. LITERATURA CITADA

1. Abreu P. J., Miranda M. M., Toledo C. G., Castillo G.O., 2001. Rev. Cubana Farm. 35(1): 56-60.
2. Alluri V. K., Tayi V. N. R., Dodda S., Mulabagal V., Hsin-Sheng T., Gottumukkala V. S., 2005. Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. International Journal of Applied Science and Engineering. 3, 2: 125-134.
3. Álvarez Cortes E., 1976. Contribución al Estudio Químico de *F. splendens* Engelm, *Zea mays* L. *Berberis gracilis* Hartw. Tesis de maestría. ITESM.
4. Aly R., 1994. Ecology and Epidemiology of Dermatophyte Infections. Journal Am Acad Dermatol, Vol. 31 (3 pt 2): 21-22.
5. Arenas R., 1993. Micología Médica Ilustrada Dermatofitosis, México. Interamericana-McGraw-Hill: 57-52.
6. Argolo A. C., Sant´ Ana A. E., Pletsch M., Coelho L. C., 2004. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. Bioresour Technol. 95(2): 229-33.
7. Barrón G. M. P., Villarreal T.L., Reséndez P. D., Mata C. B., Morales V. M., Calzada F., 2007. Inducción *in vitro* del ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* bajo condiciones axénicas e inhibición del enquistamiento. XXIV Congreso Nacional de Investigación Biomédica. Fac de Medicina, UANL.
8. Barrón G. M. P., Villarreal T.L., Reséndez P. D., Mata C. B., Morales V. M., 2008 *Entamoeba histolytica*: cyst-like structures *in vitro* induction. Experimental Parasitology 118: 600-603.
9. Bendich A. 1990. Antioxidant micronutrients and immune responses. Ann N. Y. Acad. Sci. 587:168-80.
10. Benzie L. F., Szeto Y. T., 1999. Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. J. Agric Food Chem. 47, 633-636.
11. Bilbao M., 1971. Estudio Fitoquímico del *Schinus molle*. Tesis ITESM. Monterrey N.L.
12. BIO-RAD, Microbiología Medios de Cultivo. Impresiones Bedolla, México 2000. pp. 29-34.

13. Bonifaz A. 1998. *Micología Médica Básica*, 1era. Edición. Méndez Editores, S.A. de C.V. 31-90, 167-186.
14. Bravo-Hollis H. y M.H. Sánchez. 1978. *Las Cactáceas de México*. Vol. I Universidad Autónoma de México, México D.F. 446-453.
15. Bravo-Hollis H. y M. H. Sánchez. 1991. *Las Cactáceas de México*. Vol. II Universidad Autónoma de México, México D. F. 252-263.
16. Bravo-Hollis H. 1997. *Suculentas mexicanas, "Cactáceas"* CONABIO, SEMARNAP, UNAM, CVS Publicaciones S.A. de C.V. México. 10-12.
17. Bruhn J. G., Lundstrom J. 1976. Alkaloids of *Carnegiea gigantea*. Arizonine, a new tetrahydroisoquinoline alkaloid. *Lloydia*. 39(4). 197-203.
18. Calzada Flores C. C., 2001. Determinación de la actividad de la *Castela texana* (Torr & Gray) Rose en los procesos de enquistamiento y desenquistamiento de *Entamoeba in vitro*. Tesis Doctoral. Fac. de Ciencias Biológicas. UANL. pp. 75
19. Calzada F., Velázquez C., Cedillo-Rivera R., Esquivel B. 2003. Antiprotozoal activity of the constituents of *Teloxys graveolens*. *Phytother Res* 17(7):731-2.
20. Calzada F, Cervantes-Martínez J. A., Yépez-Mulia L., 2005. *In vitro* antiprotozoal activity from the roots of *Geranium mexicanum* and its constituents on *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia*. *J Ethnopharmacol* 98(1-2):191-3.
21. Calzada F., Alanís A. D., 2007. Additional antiprotozoal flavonol glycosides of the aerial parts of *Helianthemum glomeratum*. *Phytother Res* 21(1). 78-80.
22. Cannel, Richard J. P., 1998. *Methods in Biotechnology. Natural Products Isolation*. Glaxo Wellcome & Development, Stevenage, UK. Humana Press Inc. Totowa, N.J. Vol. 4. 1-285.
23. Carrillo Muñoz A. J., Santos P., Del Valle O., Casals y Quindos G., 2004. ¿Es activa la anfotericina B frente a hongos dermatofitos y *Scopulariopsis brevicaulis*? *Revista Esp. Quimioterapia*. Prous Science, S.A. España. Vol. 17 (Nº 3) 244-249.
24. Carson, C. F., Riley, T. V., 2001. Safety efficacy and provenance of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil *Contact Dermatitis*; 45; 65-67
25. Casanova E., García-Mina J. M., Calvo M. I., 2008. Antioxidant and antifungal activity of *Verbena officinalis* L. Leaves. *Plant Foods Hum Nutr*. 63(3). 93-7.

26. Cho J. Y., Park S. C., Kim T. W., Kim K. S., Song J. C., Kim S. K., Lee H. M, Sung H. J., Park H. J., Song Y. B., Yoo E. S., Lee C. H., Rhee M. H., 2006. Radical scavenging and anti-inflammatory activity of extracts from *Opuntia humifusa* Raf. Journal Pharm Pharmacol. 58:(1):113-9.
27. Clowan M. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 12:564-582
28. Cottele N., J. L. Bernier, J. P. Catteau, P. Pommery, J. C. Wallet, E. M. Gaydou., 1996. Antioxidants properties of hydroxyl-flavones. Free Radical Biol. Med. 20:35-43.
29. Cronquist Arthur. 1981. Introducción a la Botánica. Compañía Editorial Continental. Cuarta Edición. México. 664.
30. Desmarchelier C., Ciccía G., 1998. Antioxidantes de Origen Vegetal. Ciencia Hoy, Vol. 8, N°. 44.
31. Domínguez S., X. A., P. Rojas, M. Gutiérrez, N. Armenia G. de Lara., 1969. Estudio químico preliminar de 31 cactáceas. Rev. Soc. Quim. Méx. 13:8-12.
32. Domínguez X. A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México D.F. 39-44, 211-228, 246.
33. Domínguez S. Xorge. A. y Domínguez S., Jr. Xorge A. 1976. Aspectos químicos de las Cactáceas. Cact. Suc. Mex. XXI. 39-47.
34. Domínguez X. A., 1979. Fitoquímica. 1ª Edición, Editorial Limusa. México D. F. pp. 94.
35. Domínguez, X. A., 1982. Química orgánica experimental. Ed. Limusa, México. 79-106.
36. Dominicis María Elena; Oquendo, Marledys; Batista, Mayda; Herrera, Pedro. 1995 Tamizaje de alcaloides y saponinas de plantas que crecen Cuba II. Península de Guanahacaibes. Revista Cubana de Farmacia. 29 (1):52-57
37. Eisner T. y Niemeyer H. M. 1996. Fármacos Naturales. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy. Volumen 6 – N°33.
38. Ferrán, Aranaz M., 2001. SPSS para Windows. Análisis Estadístico. Editorial Mcgraw-Hill Interamericana de España. Impreso en España. 255-264.
39. Ferrigni N. R., Nichols D. E., McLaughlin J. L., Bye R. A., 1982. Cactus alkaloids. XLVII. N alpha-dimethylhistamine, a hypotensive component of *Echinocereus triglochidiatus*. Journal Ethnopharmacology. 5(3):359-64.

40. Fimbres P. Y, García R., 1998. Evaluación del efecto fungicida y bactericida de la mezcla de cactáceas *Pachycereus pecten-aboriginum* (cardón) y *Lophocereus schottii* (músaro). XXX Congreso Nacional de Microbiología. México. Abril 2-4.
41. Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA y Katz S. 1999: Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine. Chapter McGraw-Hill. Washington DC.
42. Furuya, M., Sugiura, S., Hazato, A., 1997. 4-hydroxy-2-cyclopentenone derivatives and anticancer agent and bone formation accelerator containing the same. US Patent 5675031.
43. González B. M. A. y Estrada C. A. E., 2001. Cactáceas del Norte del Estado de Nuevo León, México. XV Congreso Mexicano de Botánica. Querétaro, Querétaro, 14 al 19 de Octubre.
44. Henrickson, J., 1969. Anatomy of periderm and cortex of Fouquieriaceae. Aliso, 7:97-126.
45. Henrickson, J., 1972. A taxonomic revision of the Fouquieriaceae. Aliso, 7:439-537.
46. Hernández D. L. y M. Rodríguez. 2001. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. Rev. Cubana Plant Med. (2): 44-7.
47. Huacuja E. R. 1995. Contribución al estudio Fitoquímico y determinación de la acción antimicrobiana de *Senecio candidissimus*. Tesis Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. San Nicolás de los Garza N. L.
48. Koneman W., S. D. Allen, V. R. Dowell, M. Sommers. 1989. Diagnóstico microbiológico. 1ª edición. Ed. Médica Panamericana. 380-402.
49. Kuklinski, C. 2000. Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega S.A. 106-183
50. Ledezma, E. Marcano, K. Jorquera y cols. 2000. Efficacy of ajoene in the treatment of tinea pedis: A double-blind and comparative study with terbinafine. Journal Am Acad Dermatol 43:829-832
51. Lee J. C., Kim H. R., Kim J., Jang Y. S., 2002. Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. Journal Agriculture Food Chemistry. 50(22):6490-6.

52. Lernsten, N. R. y K. A. Carrey, 1974. Leaf anatomy of ocotillo (*Fouquieria splendens*: Fouquieriaceae) specially vein endings and associated veinlet elements. *Can. J. Bot.*, 52:2017-2021.
53. Levy S. B., 2002. The Garrod lecture. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother.* 49 (1): 25-30.
54. Livermore D. M., Woodford N., 2000. Carbapenemases: a problem in waiting?. *Curr Opin Microbiol.* 3 (5): 489-95.
55. Lloret Caballería A., Segarra M. C., Bosque V. M., 2002. *Microsporium canis*; Características y Diagnóstico, Control de Calidad SEIMC. Unidad de Microbiología del Hospital Arnau de Villanova, Valencia.
56. Lomeli Uribe S., 1976. Contribución al estudio químico del *Ariocarpus retusus* y estudio químico de la flor de yoloxochitl (*Talauma mexicana*). Informe. ITESM.
57. Maldonado V. Ma. de los Ángeles., 2008. Actividad fungicida y análisis fitoquímico de tres especies de cactáceas: *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire ex K. Schumann), *Echinocereus stramineus* (Engelmann) y *Stenocereus pruinosus*. (Otto)". Tesis de licenciatura. Fac. de Ciencias Biológicas. UANL.
58. Martínez P. I., 2000. Las plantas medicinales. *Revista Cubana de Oncología.* 16(1):66
59. Mata R. McLaughlin J. L. 1980. Cactus alkaloids XLII: 3,4-dimethoxy-beta-phenethylamine and heliamine from the Mexican cereoid *Backebergia militaris*. *Journal Pharm Sci.* 69(1):94-5.
60. McLaughlin JL, Chang Ch, Smith DL. 1988. Simple bioassay for the detection and isolation of bioactive natural products. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA.
61. Mercado-Hernández, R. y Santoyo-Stephano, M., 1998. Apuntes de Estadística II. Capítulo III-VI. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas.
62. Mesa Arango A. C., J. G. Bueno Sánchez y L. A. Betancur Galvis., 2004. Productos Naturales con actividad antimicótica. *Rev. Esp. Quimioterap. Prous Science, S. A. Sociedad Española de Quimioterapia.* Vol. 17 (Nº 4): 325-331.

63. Meyer B. N., Ferrigni N. R., Putman J. E., Jacobsen L. B., Nichols D. E., McLaughlin J. L., 1982. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica* 45:31-34.
64. Molina-Salinas, G. M., 2001. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y hexánico del clavo (*Eugenia caryophyllata*). UANL. Fac. de Medicina. Escuela de Graduados.
65. Molina-Salinas G. M., 2004. Aislamiento y caracterización de compuestos con actividad bactericida y/o bacteriostática de plantas del noreste de México sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* sensibles y multidrogoresistentes. Tesis, Facultad de Medicina. UANL.
66. Monzón A., Rodríguez J. L., 2002. *Trichophyton tonsurans*. Control de Calidad SEIMC. Unidad de Microbiología.
67. Moo-Puc R. E, Mena-Rejon G. J., Quijano L., Cedillo-Rivera R., 2007. Antiprotozoal activity of *Senna racemosa*. *Journal Ethnopharmacol* 112(2):415-6.
68. Moore, Michael, 1989. *Medicinal Plants of the Desert and Canyon West*. Published by Museum of New México Press. 81-83.
69. Morales, R. M. E., 2006. Extractos de *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton and Rose y *Stenocereus gummosus* (Engelmann) Gibson y Horak con actividad antibacteriana y antineoplásica sobre líneas celulares humanas. Tesis Doctoral. UANL.
70. Murphy C. M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 564-582.
71. Nordmann P., Poirel L., 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*. 8 (6): 321-31.
72. Osbourn, A. E. 1999. Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens; A comentary. *Fungal Genet Biol* 25:163-168.
73. Padilla-Raygoza N., 1999. Amibiasis en edad pediátrica, Cuarta Reunión de Expertos en amibiasis. SEARLE, Primera Edición. 47-55.
74. Paladín, Alejandro. 1996. ¿Como se Descubre o Inventa un Medicamento? *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy*. Vol. 6, N° 34.
75. Pérez-Cepeda, B.2000. Estudio fitoquímico de algas marinas con actividad biológica en larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus). Tesis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la

Universidad Autónoma de Nuevo León. Diciembre-2000.

76. Phillipson J. D., 1994. Natural's products as drugs. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 88, supplement 1. 17-19.
77. Pimienta-Barrios, E., 1999. El pitayo en Jalisco y especies afines en México. Universidad de Guadalajara. Fundación Produce Jalisco, A. C. Primera edición. 17-115.
78. Pummangura S, Nichols D. E., McLaughlin J. L., 1977. Cactus alkaloids XXXIII: beta-phenethylamines from the Guatemalan cactus *Pilosocereus maxonii*. Journal Pharm Sci. 66(10):1485-7.
79. Reyna G. A. L. y Thomas R., V. D., 2001. Usos etnobotánicos de las cactáceas en Sonora, México. XV Congreso Mexicano de Botánica. Querétaro, Querétaro, 14 al 19 de Octubre.
80. Rico-Bobadilla A. C., Gassós O. L. E., Félix F. A., 2001. Efecto antimicrobiano del extracto liofilizado de músaro (*Lophocereus schottii*). XXXII Congreso Nacional de Microbiología. Guanajuato, Guanajuato. Abril 3-5.
81. Ríos J. L., M. C. Recio and Villar. 1988. Screening methods for natural products UIT antimicrobial activity a review of literature. Journal of Ethnopharmacology. 23: 127-149.
82. Rivas C., 1998. Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 a escala piloto para la obtención de proteasas caseinolíticas. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina. UANL. Monterrey N. L.
83. Rivas M. C., Salinas-Carmona M. C., Galán Wong L., Medrano-Roldán H. Operación unitaria para la propagación de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 para la producción de proteasas con potencial biotecnológico. Patente IMPI MX/10892.2007.
84. Rojas-Aréchiga, M. & Vázquez-Yanes, C., 2000. Cactus seed germination: a review. Journal of Arid Environments. Vol. 44. 85-104.
85. Said F. S., Ramos G. M. C., Mata C. B. D., Vargas V. J., Villarreal T. L., 2005. In vitro antiprotozoal activity of the leaves of *Artemisia ludoviciana*. Fitoterapia. 76(5):466-8.
86. Saleem M., Kim H. J., Han C. K., Jin C., Lee Y. S., 2006. Secondary metabolites from *Opuntia ficus-indica* var. saboten. Phytochemistry. 67(13):1390-4.
87. Samarawickream N. A., Brown D. M., Upcroft J. A., Thammapalerd N. and Upcroft P., 1997. Involvement of superoxide dismutase and pyruvate: ferredoxin oxidoreductase in

- mechanisms of metronidazole resistance in *Entamoeba histolytica*. *Journal Antimicrob. Hemother.* 40:833-40
88. Sharma P., Sharma J. D., 2001. A review of plant species assessed *in vitro* for antiamoebic activity or both antiamoebic and antiplasmodial properties. *Phytother Res.* 15(1):1-17.
89. Silva S. Y., 1999. Análisis fitoquímico y efecto antimicrobiano de 2 especies de plantas tóxicas *Schinus molle* y *N. oleander*. Tesis. Licenciatura. FCB UANL. San Nicolás de los Garza N. L.
90. Silva, B. Y., 2005. Identificación de los componentes que presentan actividad antimicrobiana y citotóxica de *Euphorbia pulcherrima*, *E. trigona*, *Jatropha dioica*, *Ricinus communis* y *Schinus molle*. Tesis Doctoral. UANL.
91. Solís P. N., Wright C. W., Anderson M. M., Gupta M. P., Phillipson J. D., 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Médica.* 59:250-252.
92. Soto, Sousa M., 1995. Plantas Medicinales de la Cuenca del río Balsas. México, Instituto de Biología: UNAM, 55.
93. Summerbell R, (1996) Identifying Filamentous Fungi, Belmont California USA. 140-154.
94. Tamil S. A., G. S. Joseph, G. K. Jayaprakasha., 2003. Inhibition of growth and aflatoxins production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* extract and antioxidant activity. *Food Microbiol.* 20:455-460.
95. Taylor, C. B., 1998. Defense responses in plants and animals –More of the some. *Plant Cell.* 10:873-876.
96. Treviño Neávez, J. F., 2000. Estudio comparativo de los componentes químicos de callo y plántula de *Stenocereus griseus* (Hawworth) Buxabaum. Tesis de Maestría en Botánica. Fac. de Ciencias Biológicas. U.A.N.L.
97. Treviño Tamez, R., 2001. Estudio fitoquímico de *Piper amalago*. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. Marzo-2001.
98. Valencia C. O. 1995. Fundamentos de fitoquímica. Editorial Trillas. México. D. F. 11-31.

99. Velásquez, C. C., 1997. Estudio Fitoquímico y actividad antimicrobiana de *Tiquilia canescens*. Tesis licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL.
100. Verástegui Montemayor, M., 2000. Evaluación de la actividad antimicrobiana de compuestos de Agaves y su acción sobre el tigmotropismo y dimorfismo de *Candida albicans*. Tesis de postgrado. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL.
101. Wang H., J. L. Dzink F., M. Chen, S. B. Levy., 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* 45 (5): 1515-21.
102. Yeon H. B., Sub K. H., Hyeong L. J., Soo H. Y., Seup R. J., Soon L. K., Joon L. J., 2001. Antioxidant Benzoylated Flavan-3-ol Glycoside From *Celastrus orbiculatus*. *Journal Nat. Prod.* 64, 82-84.
103. Yoshikoshi, Masaki; Yoshiki, Yumiko; Okubo, Kazuyoski; Seto, Jiro; Sasaki; Yasuyuki. 1996. Prevention of hydrogen peroxide damage by soybean saponins to mouse fibroblast. *Planta Médica*; 62(3):252-256.

### Material Electrónico

1. *ARIOCARPUS* LIVING ROCKS OF MEXICO. © 1999-2008 *Living Rocks of Mexico*. Editores: Geoff Bailey, John Miller. Disponible en el sitio de red:  
<http://www.living-rocks.com/>.  
<http://www.living-rocks.com/distribution/kotsmap.htm>.  
<http://www.living-rocks.com/distribution/retmap.htm>.  
[Revisado el 20 de Agosto del 2008]
2. Garza Padrón R. A., M. E. Morales Rubio, A. Oranday, J. F. Treviño Neávez., 2004. Preliminares fitoquímicos del "bajinco" ó "nopal estrella", *Acanthocereus occidentalis* Britton and Rose. Revista electrónica RESPYN (Revista Salud Pública y Nutrición). Edición Especial No. 1-2004. Disponible en el sitio de red:  
<http://www.respyn.uanl.mx/>. [Revisado el 20 de Agosto del 2008]

3. González Garza M. T., Castro S. T., Cruz Vega D. E., (2000), Actividad amebicida de extractos acuosos y etanólicos de dos especies de *Acacia (Leguminosae)*. Revista electrónica RESPYN (Revista Salud Pública y Nutrición). Edición Especial No. 1. Disponible en el sitio de red: <http://www.respyn.uanl.mx/>. [Revisado el 20 de Agosto del 2008]
4. Martínez M. A. 2001. Trabajo Saponinas esteroides. Universidad de Antioquia. Medellin. Disponible en el sitio de red: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/saponinas2001.pdf>. [Revisado el 15 de Septiembre del 2007]
5. Morales Rubio M. E., J. Verde Star, A Oranday Cárdenas, Rivas Morales C., J. F. Treviño Neávez, 2004. Estudio fitoquímico de tallos y frutos de la pitaya agria de Baja California. Revista electrónica RESPYN (Revista salud pública y nutrición). Edición Especial No. 1. Disponible en el sitio de red: <http://www.respyn.uanl.mx/>. [Revisado el 20 de Agosto del 2008]
6. Oranday C. A., Rivas M. C., Morales V. M. R., Mata C. B. D., Gutiérrez G. J. J. 2004. Determinación de la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) del extracto etanólico obtenido del *Agave lophantha* sobre el crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis* y *Giardia lamblia*. Revista electrónica RESPYN (Revista Salud Pública y Nutrición). Edición Especial No. 3. Disponible en el sitio de red: <http://www.respyn.uanl.mx/>. [Revisado el 20 de Agosto del 2008]
7. Ramos Casillas F, Oranday Cárdenas A, Rivas Morales C, Castro Garza J, Carranza Rosales P y Cruz Vega DE. 2005. Actividad citotóxica de plantas del noreste utilizando el ensayo de letalidad de *Artemia salina* L. Revista electrónica RESPYN (Revista Salud Pública y Nutrición). Edición Especial No 8. Disponible en el sitio de red: <http://www.respyn.uanl.mx/>. [Revisado el 15 de Octubre del 2006]

8. Treviño Neávez J. F., Oranday Cárdenas A., Verde Star J., Rivas Morales C., Morales Rubio M.E., Rodríguez Garza R.G. 2004. Uso de Extractos de *Ariocarpus kotschoubeyanus*, *Equinocereus stramineus* y *Stenocereus pruinosus* como agentes antibacteriales. Revista electrónica RESPYN (Revista Salud Pública y Nutrición). Edición Especial No. 1. Disponible en el sitio de red: <http://www.respyn.uanl.mx/>. [Revisado el 15 de Octubre del 2006]
9. Treviño N. J. F., Oranday C. A., Rivas M. C., Verde S. M. J., Núñez G. M. A., Morales R. M. E., 2006. Potencial antioxidante en cactáceas. Revista electrónica RESPYN (Revista Salud Pública y Nutrición). Edición Especial No. 14. Disponible en el sitio de red: <http://www.respyn.uanl.mx/>. [Revisado el 20 de Agosto del 2008]

## 12. RESUMEN CURRICULAR

Candidato para el Grado de  
**Doctor en Ciencias**  
con Acentuación en Química de Productos Naturales

**Ramón Gerardo Rodríguez Garza**

**Tesis: TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Fouquieria splendens* (Engelmann), *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) y *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire)**

**Campo de Estudio:** Productos Naturales.

**Datos personales:** Nacido en Monterrey, Nuevo León el 28 de Febrero de 1981.

**Educación:** Egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, de la Carrera de Químico Bacteriólogo Parasitólogo, fecha: 31 Enero 2003.

**Experiencia Profesional:**

- Actividad laboral: General Nutrition Center S.A. de C.V. Auxiliar Químico en el área de microbiología, estableciendo procedimientos de análisis, higiene y seguridad. Desde Abril de 2004 a Octubre de 2004.
- Becario del Laboratorio de Micropropagación del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Desde Enero del 2000 a Noviembre 2003.
- Servicio social Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas UANL. Febrero – Agosto 2002.
- Veranos PROVERICYT. III Verano de la Investigación Científica y Tecnológica de la UANL. Julio – Agosto 2001. IV Verano de la Investigación Científica y Tecnológica de la UANL. Julio – Agosto 2002.

# PRODUCCIÓN



**Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.**  
Nicolás San Juan No. 1511 Colonia del Valle  
Delegación Benito Juárez C.P. 03100  
México, D.F.  
Tel: 9183-2060 Fax: 5688-4564  
[www.afmac.org.mx](http://www.afmac.org.mx)

**Expediente: 304**

México, D.F. a 17 de Marzo de 2010

QBP. Ramón Gerardo Rodríguez Garza  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
P r e s e n t e

**Estimado QBP. Rodríguez:**

Le comunico que el artículo intitulado:

**"Actividad antimicrobiana y antifúngica de las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) (Cactácea)"**

de los autores **Ramón Gerardo Rodríguez G., Ma. Eufemia Morales R., Ma. Julia Verde S., Azucena Oranday C., Catalina Rivas M., Ma. Adriana Núñez G., Gloria Ma. González G., Jaime Fco. Treviño N.**, ha sido ACEPTADO –solo si se hace una reestructuración-, para su publicación en la Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas (RMCF).

Adjunto encontrará las observaciones y comentarios producto de la evaluación. Le pido tenga a bien revisarlas y realice las modificaciones pertinentes.

Le solicito envíe la versión modificada del artículo en un período no mayor de 15 días, adjuntando versión en disco compacto o bien por vía electrónica ([rmcf@afmac.org.mx](mailto:rmcf@afmac.org.mx)). Así mismo, se le solicita adjunte carta firmada por el autor responsable, en donde se indiquen claramente las modificaciones efectuadas, y en caso de no coincidir con alguna(s) de la(s) observaciones de los revisores, argumente al respecto.

En espera de su pronta respuesta, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e  
Por la Superación Técnica y Científica

Dra. Dea Herrera Ruiz  
Editora



Xalapa, Ver., a 29 de septiembre de 2009

Jaime Fco Treviño Neávez, Ma. Julia Verde Star, Ma. Eufemia Morales Rubio, R. Rodríguez Garza, M.A. Maldonado Vallejo, Catalina Rivas Morales Catalina, Azucena Oranday Cárdenas  
Facultad de Ciencias Biológicas, UANL  
Gloria Ma. González González,  
Facultad de Medicina, UANL

Estimados Colegas:

Por este medio les comunico que el Comité Editorial de la Revista Mexicana de Micología ha recibido su trabajo titulado: **Actividad fungicida de *Echinocereus stramineus* y *Stenocereus pruinosus* (2 archivos Word)**.

Dicho manuscrito ha sido registrado con el número TR-200. Les mantendremos informados de los avances en el proceso de revisión del mismo.

Con un atento saludo,

Una firma manuscrita en tinta que parece ser "DS" o similar, con un trazo horizontal que cruza por debajo.

Dra. Dulce Salmones  
Editora asociada  
Revista Mexicana de Micología