

00377  
22  
2001

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**COMPUESTOS ACTIVOS DE *Crescentia  
alata* Kunth (BIGNONIACEAE)**

(DGEP-INTERCAMBIO ACADÉMICO NACIONAL)

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

298162

**PRESENTA**

**BIÓL. RICARDO ALBERTO VILLATORO VERA**



**ASESOR: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ**  
**DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM**

COordinación  
**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**Ciudad Universitaria, junio 2001**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 1-4 DEL DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES DEL INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM; EN EL LABORATORIO DE FITOQUÍMICA, DEPARTAMENTO DE FARMACIA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN Y EN EL LABORATORIO DE ALELOPATÍA DEL INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo y las sugerencias al presente trabajo, que brindaron las siguientes Instituciones e investigadores:

Dirección General de Estudios de Posgrado, Subdirección de Becas de Intercambio Académico Nacional de la Universidad Nacional Autónoma de México, (agosto, 1998-enero, 2001).

Universidad de Ciencias y Artes del Estado de Chiapas, (Intercambio Académico).

Departamento de productos Naturales del Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Mariano Martínez Vázquez, Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM.

Dra. Ana Luisa Anaya Lang, Laboratorio de Aleopatía, Instituto de Ecología, UNAM.

Dra. María Cristina Pérez-Amador y Barron, Laboratorio de Química, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.

M. en C. Lourdes Hernández De Jesús, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.

M. en C. Nelly Diego Pérez, Laboratorio de Plantas Vasculares, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.

P.Biól. Aurora Saucedo García, Laboratorio de Aleopatía, Instituto de Ecología , UNAM.

E. Biól. Susana E. Frías González, Unidad de Pruebas Biológicas, Instituto de Química, UNAM.

Técnicos de los Laboratorios de Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas del Instituto de Química, UNAM.

Laboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Dra. Genoveva García, Laboratorio de Fitopatología, Departamento de Micología, Instituto de Biología, UNAM.

Dra. Montserrat Gispert Cruells, Laboratorio de Etnobotánica, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.

Mi excelente jurado de examen de grado.

A mis amigos, Marlene, Mauricio, Benjamín, Ana lilia, Leo, Maestra Florencia y Eva, por su amistad y aprecio. A los compañeros del Laboratorio de Aleopatía del Instituto de Ecología, UNAM, Laboratorio de Fitoquímica, Departamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN y Laboratorio de Plantas Vasculares del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.

#### **FE DE ERRATAS**

Pie de foto

Figura 4. Distribución y áreas de uso de *Crescentia alata* en México. Página 9

*IN MEMORIAN*

DE MI PADRE Y HERMANO

MARIO VILLATORO CRUZ

MARIO DE JESUS VILLATORO VERA

CON MUCHO CARIÑO

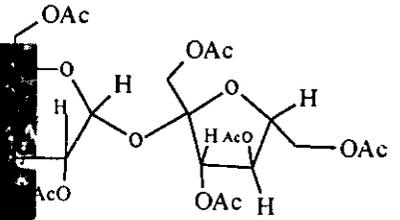
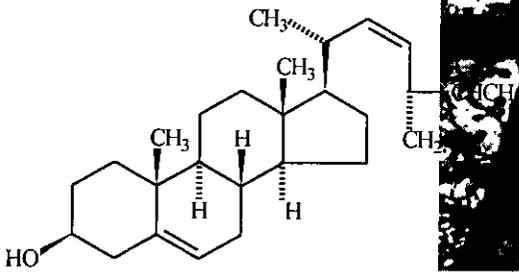
A MATY, BUBU, ANY, MARYCARMEN,

MIGUEL, CARLOS, CHONY, RODRIGO.

MIS SOBRINOS CHICHARITO, WINIE,

ALBERTICO Y MIGUELITO.

!!! A MI ANGEL ESPECIAL !!!



!!! EL VERDADERO CIENTÍFICO ES AQUEL QUE DESCONFÍA  
SISTEMÁTICAMENTE !!!

R.A. VILLATORO-VERA.  
JUNIO, 2001

## CONTENIDO

|   | Páginas |
|---|---------|
| INDICE DE FIGURAS.....  | i       |
| INDICE DE TABLAS.....   | iii     |
| RESUMEN .....   | 1       |
| INTRODUCCIÓN.....   | 3       |
| 1. ANTECEDENTES.....  | 5       |
| 1.1. Botánicos.....   | 5       |
| 1.1.1. Ubicación taxonómica de <i>Crescentia alata</i> Kunth.....   | 5       |
| 1.1.2. Descripción de la familia Bignoniaceae.....  | 5       |
| 1.1.3. Descripción de <i>Crescentia alata</i> Kunth.....  | 5       |
| 1.1.4. Distribución de <i>Crescentia alata</i> .....  | 6       |
| 1.1.3. Sinonimias y nombres vernáculos.....   | 9       |
| 1.2. MEDICINALES.....   | 10      |
| 1.3. ESTUDIOS QUÍMICOS Y DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....  | 12      |
| 1.4. ACCIÓN DE LOS FARMACOS ANTIMICROBIANOS.....  | 13      |
| 1.5. AVANCES EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS<br>ANTIBIÓTICOS DE ORIGEN MICROBIANO.....                                 | 14      |
| 2. HIPOTESIS.....   | 16      |
| 3. OBJETIVOS.....   | 16      |
| 4. DISEÑO EXPERIMENTAL.....   | 18      |
| 5. MÉTODO.....  | 19      |
| 5.1. Ubicación del área de recolecta del material vegetal.....  | 19      |
| 5.2. Análisis fitoquímico de las hojas, semillas y pulpa<br>del fruto de <i>Crescentia alata</i> .....                | 20      |
| 5.3. Pruebas de actividad antimicrobiana de las hojas,<br>semillas y pulpa del fruto de <i>Crescentia alata</i> ..... | 24      |
| 5.3.1. Reactivación bacteriana.....   | 25      |
| 5.3.2. Difusión en disco por el método reportado por<br>Rojas y col., (1992).....                                     | 25      |
| 5.4. Análisis de hongos asociados con las hojas y raíz<br>de <i>Crescentia alata</i> .....                            | 26      |

|  |    |
|--|----|
| 5.4.1. Recolecta del material vegetal.....   | 26 |
| 5.4.2. Aislamiento de hongos asociados.....  | 26 |
| 5.4.3. Bioensayo de fitotoxicidad de extractos de hojas,<br>semillas y pulpa del fruto de <i>Crescentia alata</i><br>sobre hongos aislados de tejidos y órganos..... | 26 |
| 5.5. Pruebas de toxicidad en <i>Artemia salina</i> .....   | 27 |
| 6. RESULTADOS.....   | 28 |
| 7. DISCUSIÓN.....  | 38 |
| 8. CONCLUSIONES.....   | 40 |
| 9. PROPUESTAS BASADAS EN LOS DATOS EXPERIMENTALES.....   | 41 |
| 10. ESPECTROS.....   | 42 |
| 11. BIBLIOGRAFIA.....  | 48 |

## INDICE DE FIGURAS

|   | <b>Páginas</b> |
|---|----------------|
| Figura 1. Individuo de <i>Crescentia alata</i> en el área de recolecta en Sacacoyucan, Guerrero.....                  | 7              |
| Figura 2. Disposición de las hojas y flores de <i>C. alata</i> .....  | 8              |
| Figura 3. Forma y crecimiento del fruto de <i>C. alata</i> .....  | 8              |
| Figura 4. Distribución y áreas de uso de <i>C. alata</i> .....  | 9              |
| Figura 5. Pentacétido (CR 377) aislado de <i>Fusarium</i> sp.....   | 15             |
| Figura 6. Hojas, flores y fruto de <i>C. alata</i> .....  | 19             |
| Figura 7. Estructura del estigmasterol, fracción del aceite y sacarosa peracetilada aislados de <i>C. alata</i> ..... | 29             |
| Figura 8. <i>Curvularia</i> sp. Hongo aislado de las hojas y raíces de <i>Crescentia alata</i> .....                  | 32             |
| Figura 9. <i>Fusarium</i> sp. Hongo aislado de las hojas de <i>C.alata</i> .....                                      | 32             |
| Figura 10. <i>Fusarium</i> sp. Hongo aislado de las hojas de <i>C. alata</i> .....                                    | 33             |
| Figura 11. <i>Fusarium</i> sp. Hongo aislado de las hojas de <i>C. alata</i> .....                                    | 33             |
| Figura 12. <i>Stagonospora</i> sp. Hongo aislado de las hojas de <i>C. alata</i> .....                                | 34             |

|   |    |
|---|----|
| Figura 13. <i>Alternaria</i> sp. Hongo aislado de las hojas de<br><i>C. alata</i> .....   | 34 |
| Figura 14. <i>Gilmaniella</i> sp. Hongo aislado de las hojas de<br><i>C. alata</i> .....  | 35 |
| Figura 15. Efecto del extracto metanólico de las hojas, semillas y<br>pulpa del fruto de <i>C. alata</i> sobre el porcentaje (%) de<br>crecimiento radial de <i>Alternaria</i> sp. a 3 y 6 días de<br>crecimiento a una concentración de 250 ppm..... | 36 |
| Figura 16. Efecto del aceite obtenido del extracto hexánico de<br>semillas de <i>C. alata</i> sobre el porcentaje (%) de<br>crecimiento radial de <i>Alternaria</i> sp. a 3 y 6 días de<br>crecimiento a una concentración de 250 ppm.....            | 37 |

## INDICE DE TABLAS

### Páginas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Usos medicinales de <i>Crescentia alata</i><br>en la herbolaria mexicana.....  | 11 |
| Tabla 2. Concentración de 10 y 20 µg/ml, usada para las<br>pruebas de actividad antimicrobiana.....   | 24 |
| Tabla 3. Concentración de 2.5 y 5.0 µg/ml, usada para las<br>pruebas de actividad antimicrobiana.....   | 25 |
| Tabla 4. Actividad antimicrobiana de extractos de hojas,<br>semillas y pulpa del fruto de <i>C. alata</i> a<br>10 y 20 µg/ml.....                 | 30 |
| Tabla 5. Actividad antimicrobiana de los compuestos<br>aislados de hojas, semillas y pulpa del fruto<br>de <i>C. alata</i> a 10 y 20 µg/ml.....   | 30 |
| Tabla 6. Actividad antimicrobiana de extractos de hojas,<br>semillas y pulpa del fruto de <i>C. alata</i> a<br>2.5 y 5.0 µg/ml.....               | 30 |
| Tabla 7. Actividad antimicrobiana de los compuestos<br>aislados de hojas, semillas y pulpa del fruto<br>de <i>C. alata</i> a 2.5 y 5.0 µg/ml..... | 31 |
|   | 31 |
| Tabla 8. Hongos asociados a hojas y raíz de <i>C. alata</i> .....   |    |
| Tabla 9. Efecto de diferentes extractos obtenidos de hojas,<br>semillas y pulpa del fruto de <i>C. alata</i> .....                                | 36 |

|   |    |
|---|----|
| Tabla 10. Toxicidad de los extractos de hojas, semillas y<br>pulpa del fruto de <i>C. alata</i> sobre <i>Artemia salina</i> ..... | 37 |
|---|----|

## RESUMEN

La valoración de la etnoflora mexicana, ha aportado nuevas técnicas fitoterapéuticas y moléculas bioactivas que se manifiestan en diferentes mecanismos de acción como antimicrobianos. Los países en vías de desarrollo, como lo es México, se enfrentan a problemas de salud asociados a la pobreza; las enfermedades gastrointestinales y respiratorias representan los casos con más alta incidencia (INEGI, 1996). Por lo tanto, es indispensable el estudio químico y biológico de las plantas, que por tradición o estudios previos, se han utilizado para curar dichos males.

El cuatecomate (*Crescentia alata* Kunth) es una planta de uso prehispánico, sin embargo en la literatura correspondiente no se han encontrado estudios que valoren el uso tradicional de esta especie para el alivio de enfermedades gastrointestinales y respiratorias. Estas enfermedades son las principales causas de morbilidad en la población indígena y mestiza de México.

El presente trabajo (apoyo DGEP-Intercambio Académico Nacional) tuvo como objetivo la valoración de las hojas, semillas y pulpa del fruto del cuatecomate para el alivio de enfermedades gastrointestinales y respiratorias. Los resultados indican que aunque en la medicina tradicional, se emplean las hojas, semillas y pulpa del fruto de *Crescentia alata* en forma de infusión, cocimiento y fermentación, respectivamente, para el alivio de enfermedades gastrointestinales y respiratorias, las evidencias obtenidas de los bioensayos de actividad antimicrobiana indican que los diferentes extractos y productos obtenidos de esta planta no son activos sobre bacterias responsables de dichas enfermedades y en hongos patógenos al hombre. La investigación complementaria sobre el estudio de los hongos asociados a la planta, muestra la presencia de 5 géneros de hongos filamentosos, *Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria* sp., *Stagonospora* sp. y *Gilmaniella* sp., distribuidos en hojas y raíz. Los bioensayos de fitotoxicidad de los extractos sobre el hongo *Alternaria* sp. aislado de las hojas del cuatecomate indican que el extracto metanólico de hojas y semillas tienen una actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento radial del hongo a los 3 días de incubación, no así a los 6 días, en donde se observó una estimulación del crecimiento notoria. El extracto metanólico de pulpa del fruto y, el aceite obtenido

de las semillas no presentan una actividad inhibitoria significativa ( $P < 0.05$ ). El modelo biológico alternativo para corroborar la nula actividad de los extractos y productos se llevó a cabo en *Artemia salina*. Los bioensayos de letalidad de los diferentes extractos y productos sobre *Artemia salina* muestran, que estos no son activos sobre dicho crustáceo a diferentes concentraciones y supone que la  $LC_{50}$  es mayor a  $1000 \mu\text{g/ml}$ .

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el estudio de la medicina tradicional abarca dos vertientes principales: una dirigida hacia la descripción y comprensión de sus conceptos y prácticas, y la otra interesada en los recursos, en especial de las plantas medicinales. Esta última se analiza desde diferentes áreas del conocimiento entre los que se incluyen estudios etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos. No obstante, según Huerta (1997), en México solamente se han valorado química y farmacológicamente el 5% de las 4000 especies de plantas vasculares con atributos medicinales que se han reportado e identificado en el país. En 1984, Farnsworth y colaboradores identificaron 119 productos naturales que son usados globalmente como drogas. A escala mundial, se estima que del 14-28% de las especies vegetales de plantas superiores usadas medicinalmente, solamente el 15% de todas las angiospermas han sido valoradas químicamente y el 74% de compuestos activos derivados de las plantas, fueron descubiertos después de realizar un seguimiento del uso etnomedicinal de la planta. La valoración de la etnoflora mexicana, ha aportado nuevas técnicas fitoterapéuticas y moléculas bioactivas que se manifiestan en diferentes mecanismos de acción como antimicrobianos. Los países en vías de desarrollo, como lo es México, se enfrentan a problemas de salud asociados a la pobreza, siendo las enfermedades gastrointestinales y respiratorias los casos con más alta incidencia (INEGI, 1996). Por lo tanto, es indispensable el estudio químico y biológico de las plantas, que por tradición o estudios previos, se han utilizado para curar dichos males.

En la literatura correspondiente, se han reportado estudios químicos y biológicos de individuos de la familia Bignoniaceae, tal es el caso del género *Crescentia* L. De este género se han aislado moléculas como naftoquinonas, monoterpenos, esteroides, ácidos grasos y una gran cantidad de azúcares en forma de oligosacáridos y sacarosa.

Una de las especies con un intenso uso popular en la herbolaria mexicana es *Crescentia alata* Kunth, conocida con el nombre común de cuatecomate. Esta especie se localiza en diferentes tipos de vegetación de México, presentando una amplia distribución desde el estado de Sonora hasta el estado de Chiapas (INI, 1994). La población indígena y mestiza del país emplea la pulpa del fruto,

semillas y hojas de esta planta para el alivio de diarreas, disenterías y tos (INI, 1994).

El cuatecomate es una planta medicinal de uso prehispánico; sin embargo, en la literatura correspondiente, no se han reportado trabajos químicos y biológicos que validen el uso tradicional de esta planta para el alivio de enfermedades gastrointestinales y respiratorias.

Bajo este marco, el presente trabajo tuvo como objetivo la valoración de las hojas, pulpa del fruto y semillas del cuatecomate a través del análisis químico-biológico sobre bacterias responsables de enfermedades gastrointestinales y respiratorias, así también sobre hongos patógenos al ser humano.

# 1. ANTECEDENTES

## 1.1. BOTÁNICOS.

### 1.1.1. Ubicación taxonómica de *Crescentia alata* Kunth.

En el reino vegetal se calcula que existen cerca de 250, 000 especies de plantas vasculares. La división Antophyta ocupa el 90% de la superficie vegetal terrestre e incluye a las 235,000 especies de angiospermas existentes. La clase Dicotyledoneas comprende 170,000 especies de árboles, arbustos y hierbas. La especie en estudio pertenece al orden Bignoniales y a la familia Bignoniaceae que abarca 500 especies que son plantas leñosas que alcanzan tallas arbóreas raramente son hierbas. El género *Crescentia* con 120 especies, entre ellas *Crescentia alata* Kunth, (Curtis, 1995).

### 1.1.2. Descripción de la familia Bignoniaceae.

En su mayoría comprende árboles, arbustos y enredaderas. Las flores son perfectas, zigomorfas con cinco sépalos unidos y corola con cinco pétalos; el androceo es tetrámero con uno o tres estaminodios; estambres didinamos, gineceo con ovario bilocular con las placentas disepimentales y numerosos rudimentos seminales. El fruto es una baya grande con pericarpio duro, aparece directamente unido al tronco y a las ramas más gruesas. Las hojas tienen tres folíolos y un largo peciolo lo que les da el aspecto de una cruz. Las semillas están comprimidas, aladas y sin tejido nutricional, (Cano, 1994). Las bignoniáceas comprende aproximadamente 39 géneros, que en su mayoría se encuentran en América, los más importantes son: *Bignonia*, *Catalpa*, *Crescentia*, *Jacaranda*, *Kigelia*, *Parmentiera* y *Tecoma*, (Font Quert, 1982).

### 1.1.3. Descripción de *Crescentia alata* Kunth.

Arbol pequeño de hasta 25 cm de diámetro y 8 m de altura; ramas torcidas, la corola abierta; ramas secundarias ausentes, las más pequeñas gruesas, subteretes, con proyecciones de brotes alternos, condensados, cada uno llevando un fascículo de hojas en el centro (figura 1). Hojas tanto compuestas como simples en cada fascículo, las hojas compuestas 3-folioladas (raramente 5-

folioladas en algunas partes) con foliolos sésiles oblanceolados de 1-4.5 cm de largo y 0.3-1.2 cm de ancho, con el ápice redondo o levemente emarginado, lepidotos o sin otro tipo de pubescencia, rígidamente cartáceos, el pecíolo alado, 2.7-11.5 cm de largo, 3-15 mm de ancho, lepidoto, oblanceolado, rígidamente cartáceo como los foliolos, las hojas simples mucho más pequeñas, 1.9-3.2 cm de largo y 0.5-1 cm de ancho, similares a cada foliolo individual o al pecíolo de las hojas compuestas. Inflorescencia cauliflora con una o 2 flores nacidas en ramas más largas o en el tronco; pedicelos 0.5-0.8 cm de largo, lepidotos; flores con un olor a almizcle; cáliz dividido casi en la base en dos lóbulos subyúgales, cada uno 1.4-1.9 cm de largo y 0.7-1.4 cm de ancho, generalmente glabros, levemente lepidotos en la base, frecuentemente con glándulas de forma aplanada y hundidas; corola más o menos de color canela, tubular campanulada con un pliegue horizontal en la mitad del lado basal de la garganta, carnosa, 4.0-6.5 cm de largo, 1.8-2.5 cm de ancho en la garganta del tubo, el tubo 2.8-4.2 cm de largo, los lóbulos 1-1.5 cm de largo, más o menos triangulares y fusionados en las bases, generalmente glabros, la superficie externa esparcidamente glandular-lepidota; estambres subexsertos, insertos 1.1-1.5 cm de la base del tubo, 5-7 mm de largo, los filamentos anteriores 2.1-3.4 cm de largo, insertos 0.8-1.7 cm de la base del tubo, los filamentos posteriores 2.3-3.8 cm de largo, las tecas ca. 2 mm de grueso, sólo parcialmente divergentes; pistilo 4.3-5.8 cm de largo, el ovario redondeado-cónico, lepidoto, 5-6 mm de largo, 4-5 mm de ancho, los óvulos multiseriados en 4 placentas aprietales; disco pulvinado, 2-3 mm de largo, 0.9-1.4 mm de ancho (figura 2). Fruto un pepo o calabaza, más o menos esférico, 7-10 cm de diámetro; semillas pequeñas, delgadas, no aladas, 6-7 mm de largo, 7-9 mm de ancho, repartidas en la pulpa del fruto (figura 3), (Gentry, 1982).

#### **1.1.4. Distribución de *Crescentia alata*.**

Se distribuye en regiones cálidas sobre terrenos planos o escasamente inclinados. Se desarrolla con precipitaciones entre los 1,000 y los 2,500 mm anuales. Se adapta a suelos profundos, arcillosos y arenosos con un pH de 4.0 y 5.5. En América se extiende en pastizales que van del sur de Florida en Estados Unidos hasta la parte meridional de Argentina, (Gómez, 1966). En México, se encuentra en zonas con clima cálido Am y Aw, según la clasificación climática de

Koeppen (1948) modificada por García (1988), donde la temperatura nunca baja a los 0°C. *C. alata*, habita en la vertiente del Pacífico desde Baja California y Sonora hasta Chiapas. También abarca Colima, Durango, Morelos, San Luis Potosí y Zacatecas. En la vertiente del Golfo desde Veracruz hasta Tabasco, aunque cuya distribución es más extensa hacia la vertiente del Pacífico, (figura 4). Se caracteriza por estar en altitudes de 100 metros snm, aunque se ha encontrado hasta los 900 metros con precipitaciones de 1200 mm anuales, (INI, 1994; Miranda, 1975).



**Figura 1. Individuo de *Crescentia alata* en el área de recolecta en Sacacoyucan, Estado de Guerrero.**



**Figura 2. Disposición de las hojas y flores de *Crescentia alata*.**



**Figura 3. Forma y crecimiento del fruto de *Crescentia alata*.**



#### 1.1.5. Sinonímias y nombres vernáculos.

De acuerdo con la recopilación realizada por el Instituto Nacional Indigenista sobre las plantas medicinales de México, *C. alata* presenta diversas sinonimias como *C. trifolia* Blanco; *Otophora paradoxa* Blanco; *Parmentiera alata* Kunth; *Crescentia ternata* Sessé and Moc.; *Pteromischus alatus* (Kunth) Pichón, (INI, 1994). Son diversos los nombres vernáculos con los que se conoce a *C. alata* en el país. De los 36 nombres encontrados en diversos documentos, 24 son de origen indígena escritos en lengua cuicatleca, chinanteca, chontal, huasteca, maya, mixteca, náhuatl, tarasca y zapoteca; 12 son castellanizados o derivados de la lengua náhuatl. Los más comunes son cuatecomate (Colima y Morelos), cirial (Michoacán), guaje cirial (Guerrero, Michoacán), güiro (Sinaloa, Sonora), jícara (Oaxaca), morro (Chiapas, Oaxaca, Guerrero), tecomate (Chihuahua, Sinaloa, Sonora) y ayal (Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Sonora), (Aguilar y col., 1994; Martínez, 1979; INI, 1994).

## 1.2. MEDICINALES.

La diversidad florística de México, ha permitido que la herbolaria sea una fuente capaz de proveer plantas que beneficien al sector salud; en éste sentido es importante la valoración de los recursos herbolarios mediante una metodología científica que apruebe alternativas confiables en beneficio de la población.

El cuatecomate es una planta de uso medicinal desde la época prehispánica, la referencia más antigua la proporciona Francisco Hernández en su obra "**Historia Natural de la Nueva España**" (Hernández, 1856), escrita en el siglo XVI, en donde menciona a *C. alata* como una planta medicinal que... "tiene la propiedad de **contener las diarreas**, detiene la caída de cabello y el fruto cura las hernias inguinales". A finales del siglo XVIII, Vicente Cervantes refiere... "las hojas son astringentes, glutinosas y **alivian las diarreas**; es recomendada la pulpa del fruto para hacer un jarabe apreciado por ser **pectoral**, (Cervantes, 1889).

Actualmente, se emplea ampliamente en regiones indígenas y mestizas para el tratamiento de infecciones gastrointestinales y respiratorias (tabla 1). El fruto de esta especie, se usa para aliviar diferentes **afecciones respiratorias principalmente la tos**. Con la pulpa del fruto se prepara un jarabe, agregándole agua, azúcar y alcohol. Con sus semillas, tostadas y molidas, a las que se les añade canela (*Cinnamomum zeylanicum*), se elabora una mezcla a manera de chocolate, que se ingiere cuando hay molestias; o se bebe una infusión preparada con la flor y el fruto o bien, vino tinto en el que se ha dejado reposar el fruto, (INI, 1994). Para tratar el asma, se cuece la pulpa junto con gordolobo (*Gnaphalium spp.*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), saúco (*Sambucus mexicana*), flor de obelisco o tulipan (*Hibiscus rosa-sinensis*), bugambilia (*Bougainvillea spectabilis*), tejocote (*Crataegus mexicana*), arrayán (*Psidium sartorium*) y corteza de capulín (*Prunus serotina subsp. capulli*) y se toma antes de las comidas. De la misma forma sirve para la **bronquitis**, tuberculosis y diversas dolencias como dolor y desgarró de sangre del pecho y pulmón, **rinofaringitis**, **catarro**, flemas y **afecciones respiratorias en general**. Cuando hay dolor de pecho, éste se frota con alcohol en donde se han dejado reposar las semillas, (INI, 1994). Asimismo, el uso del fruto es importante para tratar lesiones traumáticas. Se aplica partido y mezclado con miel de abeja sobre los apostemas y golpes. Su pulpa se pone a manera de

cataplasma para desinflamar golpes externos; o se toma el cocimiento con piloncillo antes de los alimentos y antes de ir a dormir. También con el fruto, se prepara un vino con azúcar y alcohol que se ingiere para aliviar golpes internos. Para problemas de la piel, caída de pelo, edemas y usado como antiescabiático, se bebe el jugo caliente del fruto. También, se ocupa para algunos **problemas gastrointestinales: diarrea, disentería**, indigestión y úlcera; en enfermedades del riñón, várices, dolor de oído e insomnio, (INI, 1994).

**Tabla 1. Usos medicinales de *C. alata* en la herbolaria mexicana.**

| Uso medicinal         | Parte vegetal                                     | Preparación  | Vía de admón                     | Fuente   |
|-----------------------|---|--|----------------------------------|--|
| Antidiarreico         | Pulpa del fruto<br>Partes aéreas                  | Infusión con<br>agua y alcohol   | Oral                             | INI, 1994  |
| Antidisentérico       | Pulpa del fruto                                   | Infusión con<br>alcohol  | Oral                             | INI, 1994  |
| Tos                   | Pulpa del fruto<br>Semillas<br><br>Flor           | Jarabe<br>Tostadas y<br>molidas<br>Infusión junto<br>con el fruto          | Oral<br>Oral<br>Oral             | INI, 1994  |
| Asma                  | Pulpa del fruto                                   | Cocimiento   | Oral                             | INI, 1994  |
| Bronquitis            | Pulpa del fruto                                   | Cocimiento   | Cutáneo                          | INI, 1994  |
| Tuberculosis          | Pulpa del fruto                                   | Cocimiento   | Oral                             | INI, 1994  |
| Rinofaringitis        | Pulpa del fruto                                   | Cocimiento   | Oral                             | INI, 1994  |
| Catarro con<br>flemas | Pulpa del fruto                                   | Cocimiento   | Oral                             | INI, 1994  |
| Dolor de pecho        | Semillas  | Reposado en<br>alcohol   | Externa                          | INI, 1994  |
| Antiinflamatorio      | Pulpa del fruto<br><br>Hojas<br>Corteza<br>Medula | Reposado con<br>azúcar y alcohol<br>Cocimiento<br>Cocimiento<br>Cocimiento | Cutáneo<br>Local<br>Oral<br>Oral | Aguilar y<br>col., 1994<br>INI, 1994<br>INI, 1994<br>INI, 1994 |
| Úlcera                | Pulpa del fruto                                   | Infusión con<br>alcohol  | Oral                             | INI, 1994  |
| Riñón                 | Pulpa del fruto                                   | Infusión con<br>alcohol  | Oral                             | INI, 1994  |
| Sedante<br>nervioso   | Pulpa del fruto                                   | Infusión con<br>alcohol  | Oral                             | INI, 1994  |
| Dermatitis            | Jugo del fruto<br>Hoja                            | Cocimiento   | Oral                             | INI, 1994  |
| Dolor de hígado       | Pulpa del fruto                                   | Hervido  | Oral                             | Aguilar y col.,<br>1994  |
| Dolor muscular        | Semilla<br>Pulpa del fruto                        | Cocimiento<br>Fermentación   | Cutáneo<br>Cutáneo               | INI, 1994; Aguilar<br>y col., 1994                             |

### 1.3. ESTUDIOS QUÍMICOS Y DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

En la literatura especializada al respecto, no existen hasta el momento estudios de la valoración de esta planta para el alivio de enfermedades gastrointestinales y respiratorias. Sin embargo, se han encontrado trabajos a nivel de familia y género, los cuales reportan el aislamiento de naftoquinonas, glicósidos iridoides,  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, aceite parecido al de olivo y una gran cantidad de azúcares en la pulpa del fruto, hojas y semillas (Hetzl y col., 1993; Gafner y col., 1998; Gafner y col., 1997; Guiso y col., 1997; Steinert y col., 1995; Bianco y col., 1992; Gómez y col., 1973; Kanchan y Popli, 1992).

En 1997, Tetsuo y colaboradores, informan sobre el aislamiento de nuevos iridoides y glicósidos de iridoides del fruto de *Crescentia cujete*.

En 1997, Gafner y colaboradores, informan sobre el aislamiento de glicósidos, fenilpropanoides, varbascósido, ratinósido y newbouldiósido de la raíz de *Newbouldia laevis*.

En 1997, Guiso y colaboradores, dan a conocer el aislamiento de glicósidos fenilpropanoides e iridoides de hojas y flores de *Tecoma capensis*.

En 1996, Gafner y colaboradores, informan sobre la actividad antifúngica y antibacteriana de naftoquinonas obtenidas de las raíces de *Newbouldia laevis*.

En 1995, Steinert y colaboradores, mencionan la separación por HPLC y determinación de la nafto[2,3-b]furan-4,9-dionas y compuestos relacionados de extractos de la corteza interna de *Tabebuia avellanadae*.

En 1994, Alvarez y colaboradores, aislaron de las hojas de *Astianthus viminialis* el ácido cinámico,  $\rho$ -metoxicinámico, los glicósidos iridoides: campenosido y 5-hidroxicampenosido. Estos productos fueron probados sobre bacterias y hongos patógenos.

En 1993, Heltzel y colaboradores, reportan el aislamiento de furanonaftoquinonas de la médula del tallo de *Crescentia cujete*, de las cuales 1-3 son nuevos compuestos y fueron activos sobre líneas celulares Vero (figura 7).

En 1992, Kanchan y Popli, informan el aislamiento de stigmasterol,  $\beta$ -sitosterol, entre otros de las hojas de *Crescentia cujete*.

En 1992, Bianco y colaboradores, mencionan el aislamiento del glicósido bis-iridoides: argyliosido, catalpol, 8-epideoxylogánico y, dos nuevos iridoides diméricos: radiatósido E y radiatósido F, de las raíces de *Argylia radiata*.

En 1991, Tetsuo y colaboradores, reportan el aislamiento de iridoides de la raíz de *Catalpa bignonioides*.

En 1981, Zuñiga-Rojas, informa sobre el contenido de ácidos grasos, proteínas y carbohidratos del fruto de *C. alata*.

En 1980, Gómez y colaboradores, reportan un estudio bromatológico en donde mencionan que el fruto de *C. alata*, contiene un 17% de ácidos grasos, 12.3% de fibra cruda, 20.6% de proteínas y 36.9% de carbohidratos.

En 1973, Gómez y Bressani, obtienen de las semillas de *C. alata*, un 33.4 % de ácidos grasos insaturados, 16.8% de fibra cruda y 25.1 % de proteínas.

Además, en publicaciones se han reportado algunos cernimientos de la actividad antimicrobiana de *C. cujete* y otras especies de la familia Bignoniaceae. En 1987, Verpoorte y Dihal reportan la actividad de la corteza de *C. cujete* sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. En 1994, Alvarez y colaboradores informan sobre la actividad del extracto metanólico de hojas de *Astianthus viminalis* sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*. En 1997, Binutu menciona la actividad de los extractos, hexánico, clorofórmico y metanólico de la corteza de raíz de *C. cujete* sobre *Staphylococcus aureus* NCTC 6571, *Bacillus subtilis* NCTC 8236, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6750 y *Escherichia coli*. Por otro lado, en 1996, Gafner y colaboradores, informan de la actividad de naftoquinonas, aisladas de la raíz de *Newbouldia laevis* sobre *Cladosporium cucumerinum*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*.

#### **1.4. ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIMICROBIANOS.**

Un fármaco antimicrobiano ideal presenta toxicidad selectiva. Este término implica que el medicamento es dañino para los parásitos pero no lo es para el huésped. La toxicidad selectiva puede ser la función de un receptor específico que se requiere para interactuar con el medicamento, o depender de la inhibición de los fenómenos bioquímicos que se llevan a cabo en el parásito o que son esenciales para éste, pero no para el huésped. Aún no se ha comprendido del todo el mecanismo de acción de gran parte de los medicamentos antimicrobianos. Sin embargo, para fines de discusión, es conveniente presentar los mecanismos antimicrobianos bajo cuatro diferentes postulados, según Katzung (1987):

- Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- Alteración de la permeabilidad de la membrana celular o en el transporte activo a través de dicha membrana.
- Inhibición de la síntesis proteínica.
- Inhibición de la síntesis del ácido nucleico.
- Metabolismo competitivo de algún metabolito.

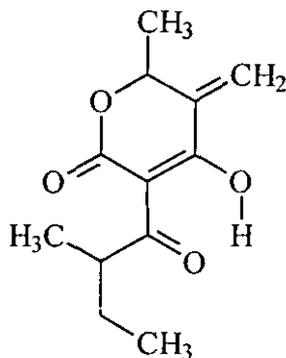
### **1.5. AVANCES EN EL DESCUBRIMIENTO DE NUEVOS ANTIBIÓTICOS DE ORIGEN MICROBIANO.**

Los antibióticos son metabolitos secundarios particularmente de microorganismos. Aunque, están definidos como compuestos cuya función metabólica en los microorganismos no es clara. Se puede designar a un antibiótico como un metabolito secundario microbiano, el cual es capaz de inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos o destruirlos. El descubrimiento de la penicilina y posteriormente de las estreptomicinas, durante la segunda guerra mundial, inicia el área de “microbiología química” y como consecuencia lógica, el desarrollo de nueva tecnología microbiana desde esa época, (Wagner y Wolff, 1977). Tamm (1976) durante el Primer Congreso Internacional en la Investigación de Plantas Medicinales, celebrado en la Universidad de Munich, Alemania, analiza la importancia de los productos naturales de origen microbiano empleados como antibióticos y su química bioorgánica. Los metabolitos secundarios microbianos de acuerdo con Tamm (1976), provienen de bacterias (*Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Nocardia*), hongos imperfectos (*Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*) y hongos basidiomicetos y ascomicetos. Algunos de los numerosos metabolitos secundarios aislados exhiben interesantes actividades biológicas como antibacterianos en bacterias grampositivas y gramnegativas, antifúngicos, citostáticos, antivirales, sobre virus de animales y plantas, entre otros efectos farmacológicos (Wagner y Wolff, 1977). Entre los metabolitos secundarios aislados de microorganismos tenemos al cloramfenicol que inicialmente se obtuvo de cultivos de *Streptomyces venezuelae*, pero actualmente es obtenido por vía de síntesis química. Este fue uno de los primeros antibióticos de amplio espectro desarrollado y su acción antibacteriana es por

inhibición de la síntesis de proteínas, (Dewick, 1997). Además de una cepa de *Penicillium cyclopium*, se han obtenido diversos productos como la compactina que es empleada como agente hipocolestémico y dos metabolitos diferentes, ciclopenina y ciclofenol. De estos, la ciclopenina inhibe significativamente el crecimiento de plántulas etioladas de trigo. Ambos metabolitos, ciclofenina y ciclofenol han sido aislados desde 1963 y comprobado su uso como antibiótico.

Actualmente, se sabe más sobre productos naturales de origen microbiano y su actividad biológica. Los hongos filamentosos presentan un potencial en la industria farmacéutica ya que son una fuente de productos naturales que han sido utilizados como prototipos para agentes farmacéuticos y gran número de nuevas especies de hongos han sido descubiertos en las regiones tropicales, (Hawksworth, 1991).

Los hongos endofíticos, incluyendo a los hongos filamentosos crecen en los tejidos de una gran cantidad de plantas vasculares. Estimaciones recientes sugieren que  $1.3 \times 10^6$  de endofitos, viven en las 270, 000 plantas vasculares existentes. Esta gran diversidad de hongos filamentosos es de gran interés ya que son una fuente invaluable para caracterizar productos naturales biológicamente activos, y más específicamente, nuevos agentes antimicrobianos (Brady y Clardy, 2000). Existen diversos trabajos sobre el estudio de los hongos aislados de plantas vasculares, entre los más recientes tenemos el trabajo de Brady y Clardy (2000), en el cual aislaron el hongo *Fusarium* sp. de la corteza de *Selaginella pallescens* del área de Conservación Guanacaste de Costa Rica e identificaron un pentacétido como un nuevo producto antifúngico (figura 5).



**Figura 5. Pentacétido (CR377) aislado de *Fusarium* sp.**

## **2. HIPÓTESIS**

Tomando en cuenta los antecedentes etnobotánicos de esta especie, se supone que los compuestos químicos aislados del extracto metanólico de las hojas, pulpa del fruto y semillas, pueden tener propiedades antimicrobianas sobre bacterias gramnegativas y grampositivas, responsables de algunas enfermedades gastrointestinales y respiratorias, así como en algunos hongos patógenos. Adicionalmente, se piensa que los hongos asociados en los diferentes tejidos y órganos de la planta, pueden ser punto clave en el uso medicinal de *C. alata*, y la inducción de la producción de defensas químicas que la misma planta posee contra el ataque de este tipo de herbívoros.

## **3. OBJETIVOS**

### **GENERAL.**

Aislar, purificar y evaluar la acción antimicrobiana de los metabolitos secundarios presentes en las hojas, pulpa del fruto y semillas de *Crescentia alata* Kunth.

### **ESPECÍFICOS.**

- 1.- Obtener extractos orgánicos con hexano, acetato de etilo y metanol de hojas, pulpa del fruto y semillas de la especie en estudio.
- 2.- Realizar pruebas de actividad antimicrobiana a los extractos de acetato de etilo y metanólico de los órganos y tejidos de la especie en estudio.
- 3.- Separar y purificar los componentes del extracto que presente actividad.
- 4.- Caracterizar la estructura de los compuestos químicos aislados mediante técnicas espectroscópicas usuales.
- 5.- Realizar pruebas de actividad biológica de los compuestos aislados sobre bacterias responsables de enfermedades gastrointestinales y respiratorias y, hongos patógenos.
- 6.- Determinación de la concentración inhibitoria mínima del compuesto activo.
- 7.- Aislar e identificar algunos hongos asociados con la planta.

## 2. HIPÓTESIS

Tomando en cuenta los antecedentes etnobotánicos de esta especie, se supone que los compuestos químicos aislados del extracto metanólico de las hojas, pulpa del fruto y semillas, pueden tener propiedades antimicrobianas sobre bacterias gramnegativas y grampositivas, responsables de algunas enfermedades gastrointestinales y respiratorias, así como en algunos hongos patógenos. Adicionalmente, se piensa que los hongos asociados en los diferentes tejidos y órganos de la planta, pueden ser punto clave en el uso medicinal de *C. alata*, y la inducción de la producción de defensas químicas que la misma planta posee contra el ataque de este tipo de herbívoros.

## 3. OBJETIVOS

### GENERAL.

Aislar, purificar y evaluar la acción antimicrobiana de los metabolitos secundarios presentes en las hojas, pulpa del fruto y semillas de *Crescentia alata* Kunth.

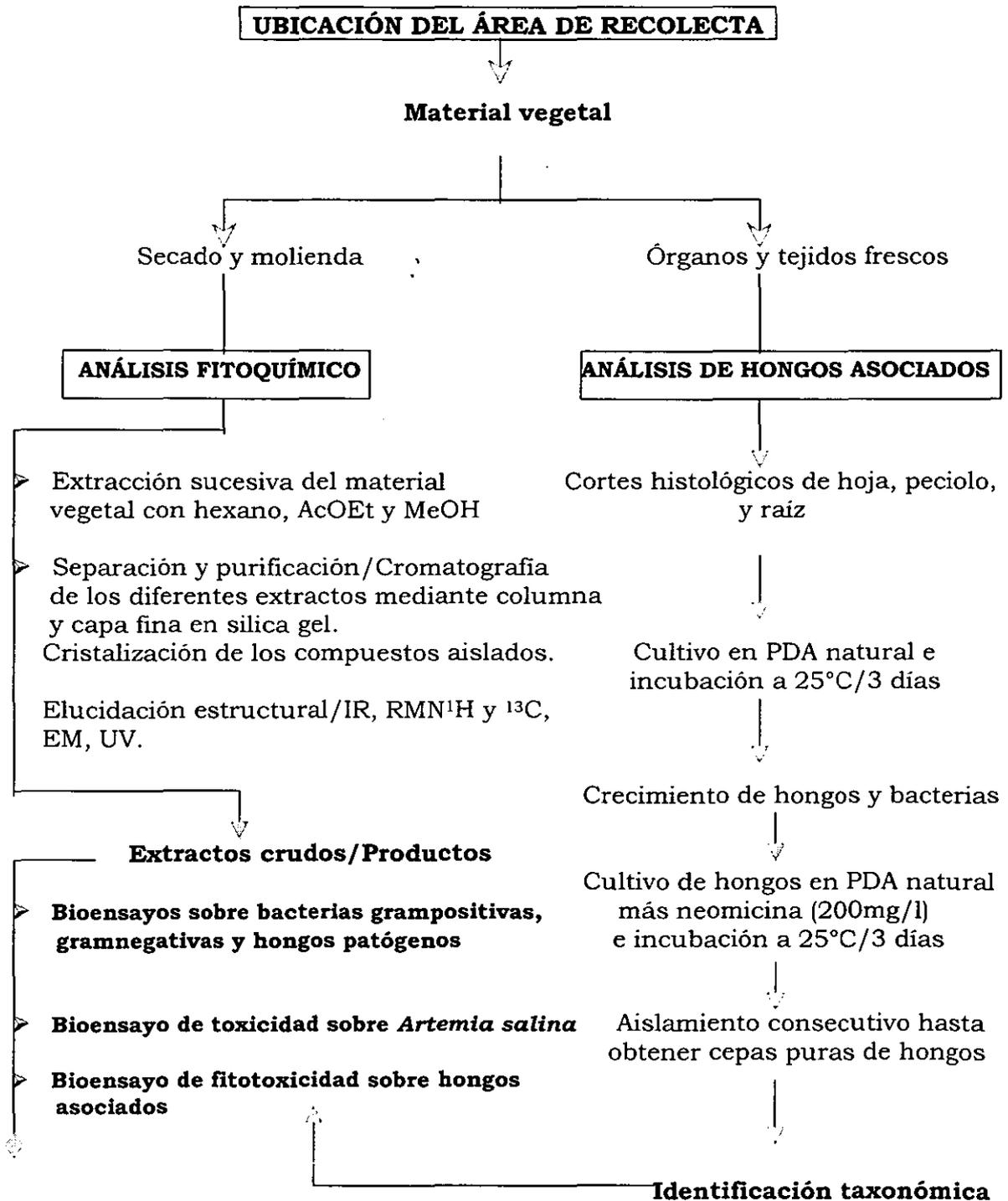
### ESPECÍFICOS.

- 1.- Obtener extractos orgánicos con hexano, acetato de etilo y metanol de hojas, pulpa del fruto y semillas de la especie en estudio.
- 2.- Realizar pruebas de actividad antimicrobiana a los extractos de acetato de etilo y metanólico de los órganos y tejidos de la especie en estudio.
- 3.- Separar y purificar los componentes del extracto que presente actividad.
- 4.- Caracterizar la estructura de los compuestos químicos aislados mediante técnicas espectroscópicas usuales.
- 5.- Realizar pruebas de actividad biológica de los compuestos aislados sobre bacterias responsables de enfermedades gastrointestinales y respiratorias y, hongos patógenos.
- 6.- Determinación de la concentración inhibitoria mínima del compuesto activo.
- 7.- Aislar e identificar algunos hongos asociados con la planta.

**8.-** Probar el efecto de los extractos orgánicos de hojas, semillas y pulpa del fruto sobre el crecimiento de algunos de los hongos asociados con la planta.

**9.-** Determinar el papel que desempeñan algunos compuestos presentes en la planta como defensas químicas contra herbívoros.

## 4. DISEÑO EXPERIMENTAL



## 5. MÉTODO

### 5.1. Ubicación del área y recolecta del material vegetal.

Se realizaron recolectas de hojas y frutos de *Crescentia alata*, en Sacacoyucan, Guerrero durante el mes de abril y septiembre de 1999. La especie fue determinada por la maestra Nelly Diego del Laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias, UNAM. Un ejemplar se encuentra depositado en el herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM (FCME).

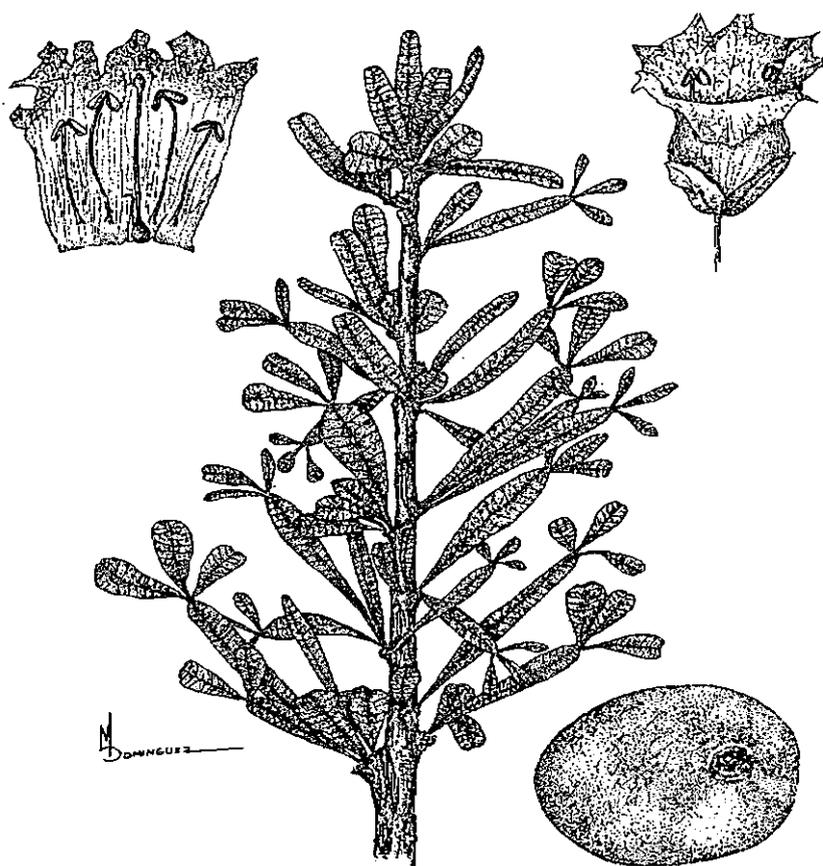
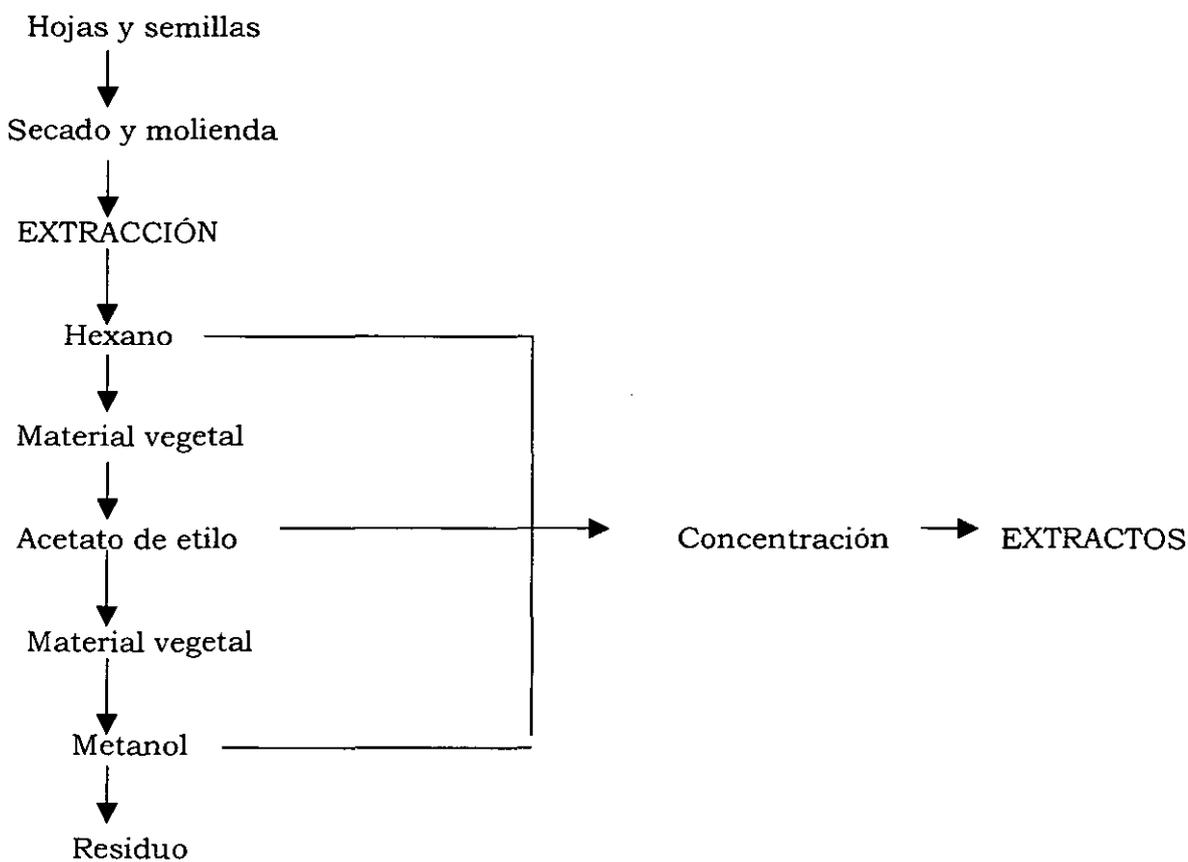


Figura 6. Hojas, flores y fruto de *Crescentia alata*.

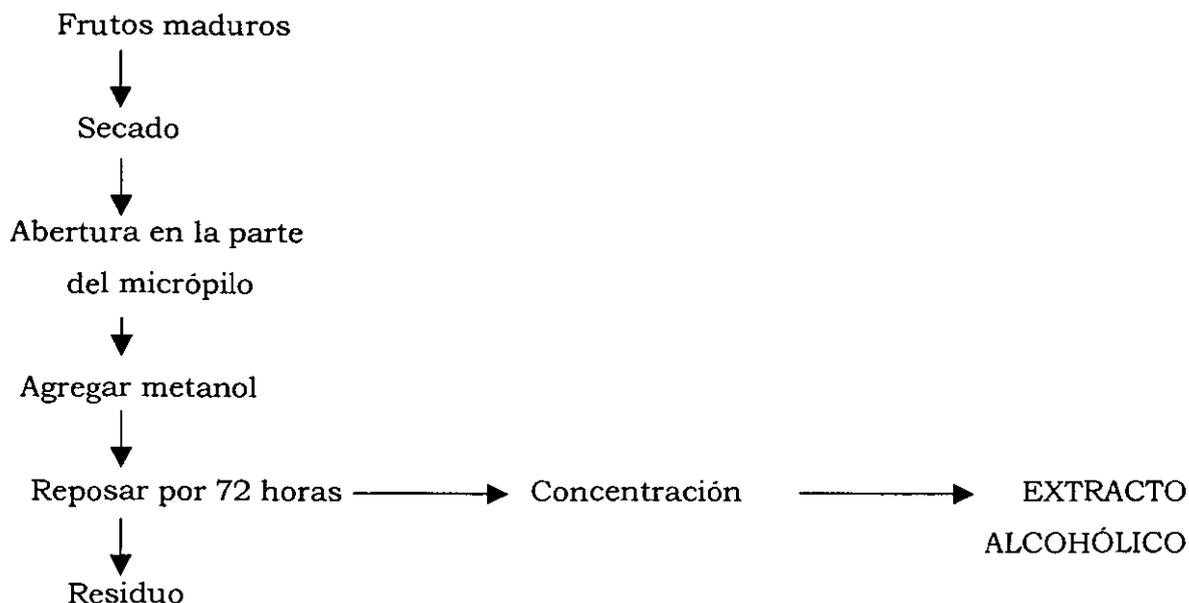
## 5.2. Análisis fitoquímico de las hojas, semillas y pulpa del fruto de *Crescentia alata*.

### Procesado del material.

De los 20 frutos colectados, a 7 se les extrajeron las semillas; éstas se secaron a temperatura ambiente y se molieron. A los 13 frutos restantes se les realizó un orificio en la parte superior del micrópilo y se agregó metanol, dejándolo reposar por 72 horas. Las hojas se secaron a temperatura ambiente, se molieron en un molino a mano y se sometieron a extracción con disolventes de polaridad creciente: hexano, acetato de etilo y metanol (Diagrama 1 y 2).



**Diagrama 1. Obtención de los extractos orgánicos de las hojas y semillas de *Crescentia alata*.**



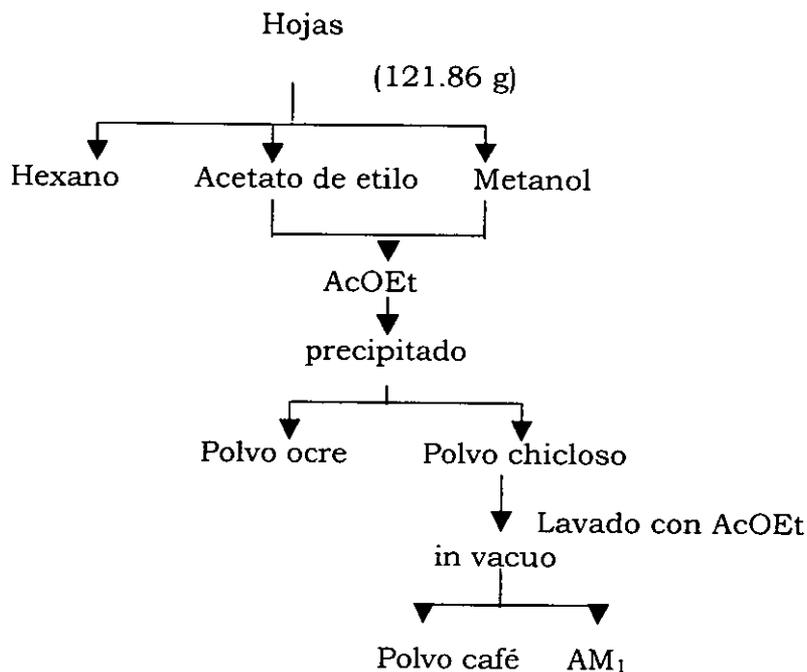
**Diagrama 2. Obtención del extracto alcohólico de la pulpa del fruto de *Crescentia alata*.**

121.86 gramos de hojas fueron maceradas y extraídas con hexano, acetato de etilo y metanol. Los componentes del extracto hexánico fueron separados y purificados por métodos cromatográficos (por placa fina y columna sobre una base de silica gel) y por cristalización. Del extracto de acetato de etilo y metanol se formó un precipitado color café, el cual se purificó por técnicas de cristalización (Diagrama 5).

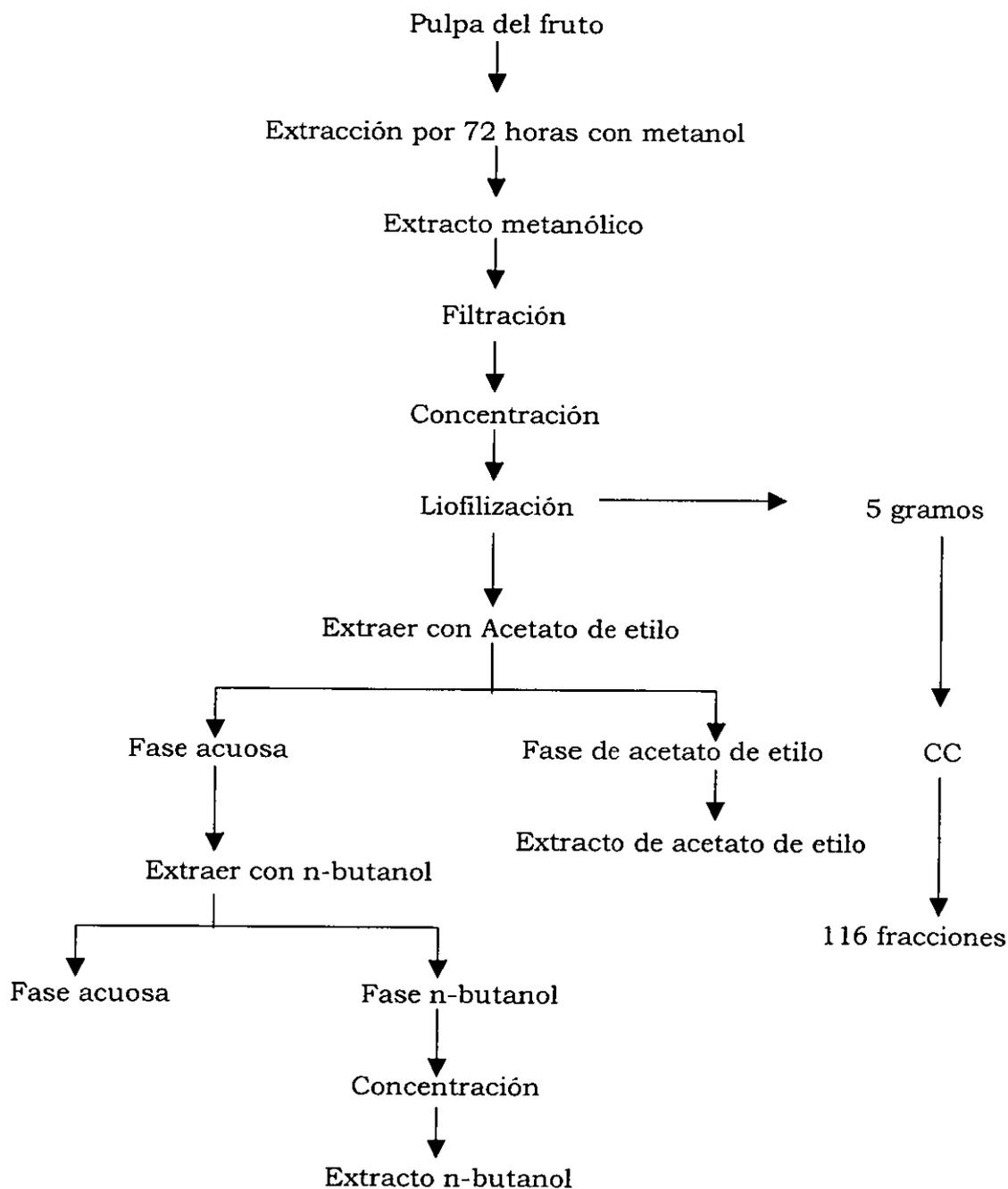
La pulpa del fruto se extrajo con metanol por 72 horas a temperatura ambiente. El extracto se concentró y se liofilizó. Una parte del extracto metanólico se separó con acetato de etilo, n-butanol y agua. Además, se realizó una separación por cromatografía en columna de 5 gramos del extracto metanólico de pulpa del fruto en diferentes proporciones de mezclas de la fase móvil (AcOEt 100, AcOEt:MeOH 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9 y MeOH 100), (diagrama 6).

438.48 g de semillas secas y molidas se sometieron a extracción con hexano y metanol. Del extracto hexánico se obtuvo un aceite. El extracto metanólico se fraccionó en sus diversos componentes por cromatografía en columna con base de silica gel. Los componentes separados se purificaron por

cromatografía en capa fina y recristalización. Las estructuras fueron caracterizadas por los métodos espectroscópicos usuales (IR, EM, RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) (Diagrama 7).



**Diagrama 5. Análisis de los extractos orgánicos de las hojas de *Crescentia alata*.**



CC: Cromatografía en columna.

**Diagrama 6. Partición y fraccionamiento del extracto alcohólico de la pulpa del fruto de *Crescentia alata*.**

### 5.3. Pruebas de actividad antimicrobiana de las hojas, pulpa del fruto y semillas de *Crescentia alata*.

Se realizaron las pruebas de actividad antimicrobiana de acuerdo a la técnica reportada por Rojas *et al.*, 1992 y bajo las normas de control de calidad que edita el National Committee for Clinical Laboratory Standards (1984). Se utilizaron cepas de referencia internacional proporcionadas por la Medical Bacter México S.A. de C.V y cepas bacterianas de colección del cepario de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. Las cepas bacterianas de colección usadas fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoneae* ENCB 0094, *Bacillus subtilis* ATCC 9772 y, la cepa fúngica fue *Candida albicans* ATCC 10231. Se preparó una solución madre (I) de 100 mg/ml de cada extracto. A partir de esta concentración se realizaron los cálculos correspondientes para obtener la concentración de 10 y 20 µg/ml. Se preparó una segunda solución madre (II) de 50 mg/ml de cada extracto y polvos obtenidos. A partir de esta solución se obtuvieron concentraciones de 2.5 y 5.0 mg/ml. Se cortaron discos de papel secante de 10 mm de diámetro, se esterilizaron a 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. En condiciones estériles se impregnaron los discos con 25 y 50 µl de la solución madre I equivalentes a las concentraciones de 10 y 20 µg/ml y, 50 y 100 µl de la solución madre II equivalentes a las concentraciones de 2.5 y 5.0 mg/ml. Los antibióticos de referencia fueron estreptomina para las bacterias y nistatina para el hongo probados a las mismas concentraciones que las soluciones madre (Tabla 2 y 3).

**Tabla 2: Concentración usada para las pruebas de actividad antimicrobiana.**

| Disco          | Cantidad de solución madre (µl) | Concentración final (µg/ml) |
|----------------|---------------------------------|-----------------------------|
| 1 antibiótico* | 50                              | 20                          |
| 2*             | 25                              | 10                          |
| 3*             | 50                              | 20                          |

\* Estreptomina: Bacterias gramnegativas y grampositivas; Nistatina: Hongo.

♣ Se colocaron ya sea el caso, extracto o producto.

**Tabla 3: Concentración usada para las pruebas de actividad antimicrobiana.**

| Disco          | Cantidad de solución madre<br>50 mg/ml | Concentración final |
|----------------|--|---------------------|
| 1 antibiótico* | 50 µl                                  | 20 µg/ml            |
| 2*             | 25 µl                                  | 2.5 mg/ ml          |
| 3*             | 50 µl                                  | 5.0 mg/ 2 ml        |

\* Estreptomina: Bacterias gramnegativas y grampositivas; Nistatina: Hongo.

▲ Se colocaron ya sea el caso, extracto o producto.

### 5.3.1. Reactivación bacteriana.

Se reactivaron en caldo nutritivo las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoneae* ENCB 0094 y *Bacillus subtilis* ATCC 9772. El hongo patógeno *Candida albicans* ATCC 10231, se reactivó en caldo de soya tripticaseína. Para mantener la viabilidad de cada cepa microbiana se cultivaron en el caldo correspondiente cada 15 días.

### 5.3.2. Difusión en disco por el método reportado por Rojas *et al.*, 1992.

Se tomaron de cuatro a cinco colonias de las cepas bacterianas y una colonia de la cepa fúngica, con un asa de alambre estéril. Se inocularon en un tubo con 9 ml de caldo nutritivo en el caso de las bacterias y caldo de soya de tripticaseína del hongo, incubando a 37°C durante 24 horas, hasta obtener una turbidez. Después del periodo de incubación se comparó la turbidez con la del estándar 0.5 de McFarland. Si el cultivo presentaba turbidez diferente, se estandarizaba con 1 ml de solución salina fisiológica 0.9%. Se inoculó la superficie, sin vapor de agua, de una placa de agar antibiótico # 1 con 1 ml del cultivo bacteriano o fúngico, distribuyéndose con una varilla de vidrio en forma de espátula para asegurar una distribución homogénea del inóculo. Se colocaron los discos impregnados con el extracto o compuesto de la planta. Se incubaron las placas inoculadas a 37°C por 24 horas. La lectura se realizó mirando al fondo de la placa con luz reflejada contra un fondo negro.

#### **5.4. Análisis de hongos asociados con las hojas y raíz de *Crescentia alata*.**

##### **5.4.1. Recolecta del material vegetal.**

Se recolectaron hojas y raíz del individuo de *Crescentia alata* en la zona de Sacacoyucan, Guerrero en el mes de junio del 2000.

##### **5.4.2. Aislamiento de hongos asociados.**

Se realizaron cortes histológicos de 2 a 3 mm<sup>2</sup> de las hojas y pecíolos en las partes sanas y enfermas por ataque de patógenos, en la raíz se obtuvieron los cortes en la corteza y parte interna. Con una pinza estéril se pasaron los cortes a una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto para eliminar posibles microorganismos no deseados de la parte exterior de los cortes. Posteriormente, se enjuagaron los cortes con agua estéril durante 1 minuto para quitar el exceso de hipoclorito de sodio 1%. Los cortes se secaron en una toallita estéril. Los cortes de cada órgano y tejido vegetal se cultivaron en cajas petri con medio de PDA natural y se incubaron a 25°C durante 3 días. Después de este tiempo de incubación, se inició el aislamiento de los hongos en cajas petri con medio PDA natural y neomicina (200 mg/L); se inocularon los hongos obtenidos y se incubaron a 27°C durante 3 días. Se realizaron aislamientos consecutivos hasta la obtención de la cepa pura.

##### **5.4.3. Bioensayo de toxicidad de extractos de hojas, semillas y pulpa del fruto de *Crescentia alata* sobre hongos aislados de tejidos y órganos.**

Los extractos y compuestos obtenidos de los diferentes tejidos y órganos *C. alata* fueron probados sobre algunos de los hongos que viven en asociación con las hojas y raíces de esta especie vegetal. La técnica utilizada fue la reportada por Anaya y colaboradores (1996), que se describe a continuación.

Los bioensayos fueron realizados con *Alternaria* sp. por su rápido crecimiento y fácil manejo *in vitro*. Este hongo se sembró en cajas petri de 10 cm con medio estéril agar dextrosa y papa (PDA) mezclado con 250 ppm de los extractos obtenidos de las hojas, semillas y pulpa del fruto de la planta disueltos en unas gotas de metanol. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 6 días. A los controles se les aplicaron también unas gotas de metanol donde se solubilizaron los extractos. Se realizó un control con agua para comparar el crecimiento con el control del solvente. Los experimentos se llevaron

a cabo bajo un diseño de bloques completos al azar con 3 repeticiones. Se midió el diámetro de los hongos a los 3 y 6 días de crecimiento. Los datos se analizaron por medio de una ANOVA.

#### **5.4.4. Pruebas de toxicidad en *Artemia salina*.**

La técnica de toxicidad en *Artemia salina* utilizada fue la descrita por Sam (1993). Para obtener las larvas de *A. salina*, se preparó agua de mar artificial (Instant Ocean, 38 g/l). En un recipiente seccionado en dos partes se agregaron 100 ml de la solución de agua de mar preparada y 5 mg de quistes, la mitad del recipiente se cubrió con papel aluminio para proporcionar oscuridad y se incubaron a 28°C durante 48 horas. Luego de este tiempo, las larvas eclosionadas han salido hacia la parte que recibe la luz. Se recolectaron larvas vivas con una pipeta Pasteur, transfiriéndolas a un vial transparente de 10 ml para facilitar su observación. Con una micropipeta Eppendorf se colectaron 10 larvas en 100 µl y se depositaron en los pocillos de una microplaca de 96 pozos.

De los extractos a prueba se preparó una solución stock de 20 mg/ml diluyendo en DMSO. A partir de esta solución se prepara una dilución de 2000 µg/ml en solución de agua de mar, esto con el fin de que al agregar 100µl al pocillo, se diluya al 50% con los 100 µl previamente depositados con las larvas y por lo tanto las concentraciones finales queden 0.1, 10.0, 100 y 1000 µg/ml. Las soluciones para el grupo testigo se preparan a las mismas concentraciones empleando solamente el disolvente (DMSO); el grupo blanco se preparó únicamente con solución de agua de mar. Cada extracto se prueba por triplicado agregando 100 µl de la disolución previamente preparada. Posteriormente se deja incubando a temperatura ambiente por 24 horas, transcurrido este tiempo de incubación, se procedió a contar el número de larvas muertas en cada pocillo empleando la lupa de un esteroscópico. Una vez contadas, se fijan agregando 100µl de metanol en cada pozo empleando una multipipeta; ya que se han muerto todas, se cuentan entonces el total de larvas para confirmar el número de éstas en cada pozo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Análisis fitoquímico.

De las hojas de *Crescentia alata* se aislaron, mediante técnicas cromatográficas, el estigmasterol **I**, una gran cantidad de ceras y azúcares. De las semillas se obtuvo un aceite **II** parecido al aceite de oliva, y una gran cantidad de una mezcla de compuestos polares. Esta mezcla se sometió a una reacción de acetilación con piridina y anhídrido acético. La purificación de esta mezcla permitió el aislamiento de la sacarosa peracetilada **III**. Este resultado permitió establecer que la sacarosa está presente en la mezcla inicial de compuestos polares. Del extracto de n-butanol se detectó la presencia de varios tetrasacáridos y sacarosa **IV**, la cual fue identificada mediante su derivado peracetilado **III**. Del fraccionamiento mediante columna cromatográfica del extracto metanólico, se obtuvieron 116 fracciones, de la fracción 115 y 116 obtenida con MeOH 100%, se obtuvieron precipitados blancos. Estos precipitados se lavaron con MeOH 100% y se filtraron. Se sometieron a una reacción de acetilación con piridina y anhídrido acético. Los productos ARxa y BRxa resultantes de la reacción, se cristalizaron en un sistema MeOH-H<sub>2</sub>O (8:2) obteniéndose cristales blancos en forma de agujas con un punto de fusión de 70°C (ARxa) y 65°C (BRxa). Los datos espectrales permitieron identificar a la sacarosa peracetilada **V**, previamente aislada del extracto n-butanol.

**I.** Estigmasterol C<sub>29</sub>H<sub>48</sub>O, p.f. 145-150°C, PM 412, aislado del extracto hexánico de hojas.

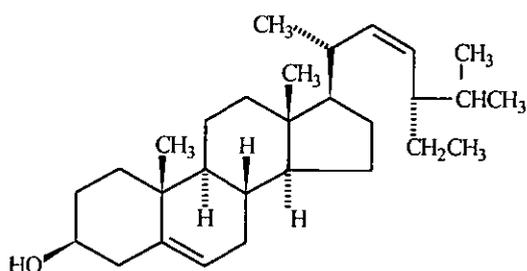
**II.** Aceite (C<sub>5</sub> H<sub>6</sub> O<sub>5</sub>) [(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>CH=CHCH<sub>2</sub>CH=CH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, PM 614, aislado del extracto hexánico de semillas.

**III.** Sacarosa peracetilada, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, p.f. 78-83°C, obtenida mediante una reacción de acetilación del extracto metanólico de semillas.

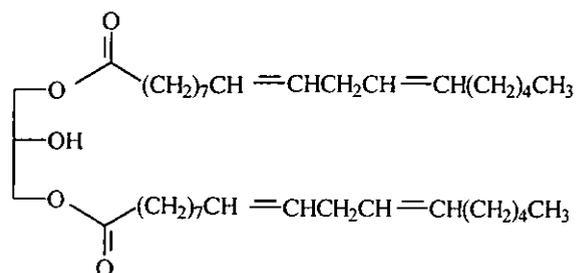
**IV.** Sacarosa peracetilada, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, p.f. 80-83°C, obtenida de la fase n-BuOH del extracto metanólico de la pulpa del fruto.

**V.** Sacarosa peracetilada, C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, fracción 115 y 116 (p.f. 70°C y 65°C), obtenida del fraccionamiento del extracto metanólico de la pulpa del fruto en forma de cristales y polvo blancos.

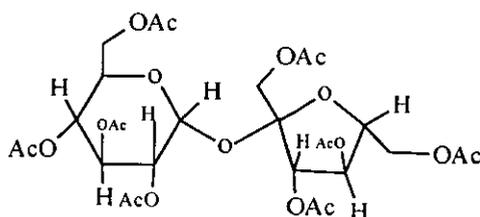
Estos resultados demostraron que esta especie elabora una gran cantidad de azúcares. Siendo la sacarosa, la más abundante; así mismo se detectó una apreciable cantidad de tetrasacáridos.



**Estigmasterol**



**Fracción del aceite**



**Sacarosa peracetilada**

**Figura 7. Estructura del estigmasterol (I) aislado de las hojas; una fracción del aceite obtenido de las semillas (II) y sacarosa peracetilada (III-V) obtenida de las semillas y pulpa del fruto de *Crescentia alata* Kunth. Ver los espectros en anexos.**

## 6.2. Actividad antimicrobiana.

Las pruebas de actividad antimicrobiana son negativas sobre *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8456, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 *Bacillus subtilis* ATCC 9772, *Klebsiella pneumoniae* ENCB 0094 y *Candida albicans* ATCC 10231.

**Tabla 4: Actividad antimicrobiana de extractos de las hojas, semillas y pulpa del fruto de *Crescentia alata* a 10 y 20 µg/ml.**

| Extractos        | <i>Escherichia coli</i> | <i>Ps. Aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Candida albicans</i> |
|------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|
| MeOH Pulpa       | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| AcOEt Hojas      | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| MeOH hojas       | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| MeOH semilla     | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| Estreptomycinina | +                       | +                     | +                            | +                        | +                            | NP                      |
| Nistatina        | NP                      | NP                    | NP                           | NP                       | NP                           | +                       |

Los datos promedios están dados en mm de zona de inhibición (n=3).

NP= no probados; Concentración: 10 µg/ml y 20µg/ml; estreptomycinina y nistatina: 20µg/ml.

**Tabla 5: Actividad antimicrobiana de los compuestos aislados de hojas, semillas y pulpa del fruto de *Crescentia alata* a 10 y 20 µg/ml.**

| Compuestos       | <i>Escherichia coli</i> | <i>Ps. Aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Candida albicans</i> |
|------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|
| ARxa-AM1         | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| Aceite           | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| EMHpca           | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| Estreptomycinina | +                       | +                     | +                            | +                        | +                            | NP                      |
| Nistatina        | NP                      | NP                    | NP                           | NP                       | NP                           | +                       |

Los datos promedios están dados en mm de zona de inhibición (n=3).

NP= no probados; Concentración: 10 µg/ml y 20µg/ml; estreptomycinina y nistatina: 20µg/ml.

ARxa-AM1: Sacarosa peracetilada.

EMHpca: Precipitado del extracto metanólico de las hojas.

**Tabla 6: Actividad antimicrobiana de extractos de las hojas, semillas y pulpa del fruto de *Crescentia alata* a 2.5 y 5.0 mg/ml.**

| Extractos        | <i>Escherichia coli</i> | <i>Ps. Aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Candida albicans</i> |
|------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|
| MeOH Pulpa       | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| AcOEt Hojas      | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| MeOH hojas       | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| MeOH semilla     | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| Estreptomycinina | +                       | +                     | +                            | +                        | +                            | NP                      |
| Nistatina        | NP                      | NP                    | NP                           | NP                       | NP                           | +                       |

Los datos promedios están dados en mm de zona de inhibición (n=3).

NP= no probados; Concentración: 2.5 mg/2 ml y 5.0 mg/2 ml; estreptomycinina y nistatina: 20 µg/ml.

**Tabla 7: Actividad antimicrobiana de los compuestos aislados de hojas, semillas y pulpa del fruto de *Crescentia alata* a 2.5 y 5.0 mg/ml.**

| Compuestos     | <i>Escherichia coli</i> | <i>Ps. Aeruginosa</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Candida albicans</i> |
|----------------|-------------------------|-----------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|
| Arxa-AM1       | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| Aceite         | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| EMHpca         | -                       | -                     | -                            | -                        | -                            | -                       |
| Estreptomicina | +                       | +                     | +                            | +                        | +                            | NP                      |
| Nistatina      | NP                      | NP                    | NP                           | NP                       | NP                           | +                       |

Los datos promedios están dados en mm de zona de inhibición (n=3).

NP= no probados; Concentración: 2.5 mg/2 ml y 5.0 mg/2 ml; estreptomicina y nistatina: 20 µg/ml

### 6.3. Aislamiento e identificación de hongos asociados.

De las hojas se obtuvieron un total de 17 cepas, identificándose los géneros *Fusarium* sp, *Curvularia* sp, *Stagonospora* sp. y *Alternaria* sp., (figura 8-13). De *Fusarium* sp, posiblemente sean dos especies de acuerdo a las diferencias morfológicas que presenta (figura 9-11). De la raíz se realizaron cortes en la corteza y médula, obteniéndose 5 cepas e identificándose 2 géneros *Gilmaniella* sp y *Curvularia* sp., (figura 8 y 14). Los hongos identificados se presentan en la tabla 8. Además, las fotografías permiten observar las estructuras morfológicas distintiva para cada género.

**Tabla 8. Hongos asociados a hojas y raíz de *Crescentia alata* Kunth.**

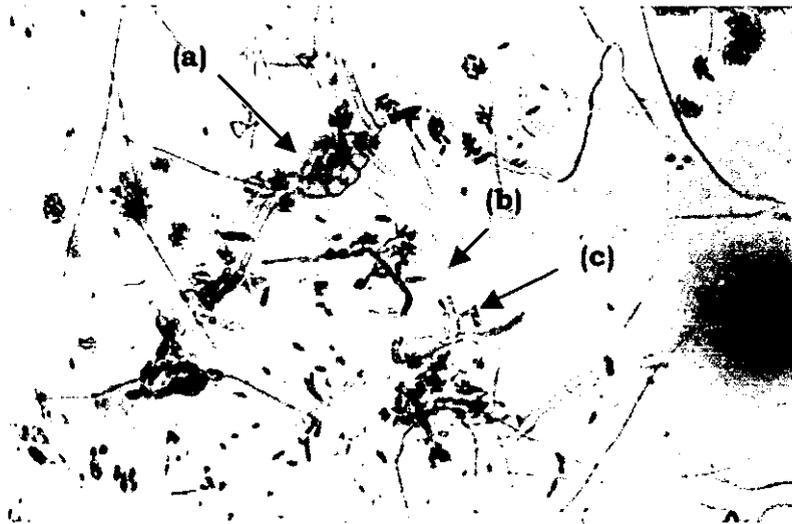
| PARTE VEGETAL | CEPAS OBTENIDAS | HONGOS IDENTIFICADOS   |
|---------------|-----------------|--|
| Raíz          | 5               | <i>Gilmaniella</i> sp.<br><i>Curvularia</i> sp.                                      |
| Hoja          | 7               | <i>Fusarium</i> sp. (2 especies)<br><i>Curvularia</i> sp.<br><i>Stagonospora</i> sp. |
| Pecíolo       | 10              | <i>Alternaria</i> sp.  |



**Figura 8. *Curvularia* sp. a) Conidióforo, 40X; b) Conidio, 100X, aislados de las hojas y raíz, tinción: fucsina. (Micrografía tomada en microscópio de luz, Reichert-Jung Polyvar. Laboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM).**



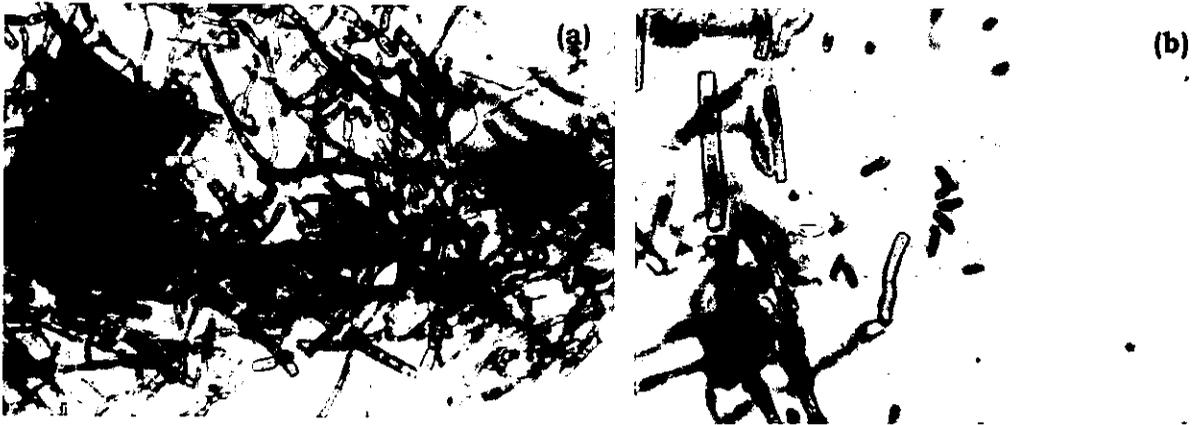
**Figura 9. *Fusarium* sp. (100X), a) Fiálide con microconidios; b) Macroconidios, aislados de las hojas, tinción: fucsina. (Micrografía tomada en microscópio de luz, Reichert-Jung Polyvar. Laboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM).**



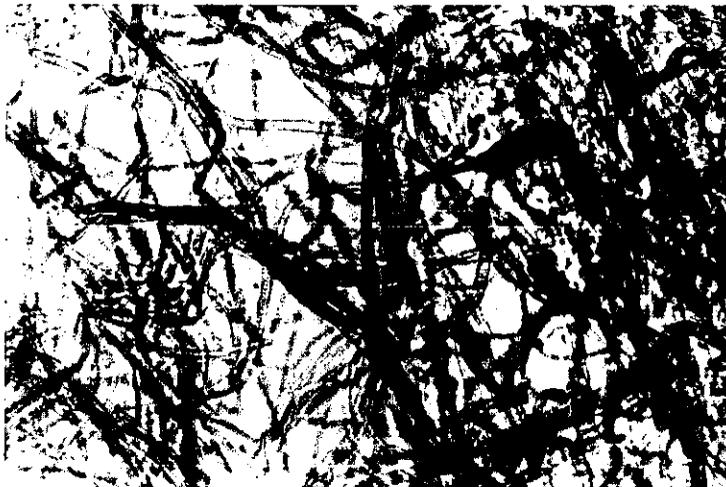
**Figura 10. *Fusarium* sp. a) Clamidosporas (40X); b) Fiálide simple (40X); c) Fiálide ramificada (40X), aislados de las hojas, tinción: fucsina. (Micrografía tomada en microscópio de luz, Reichert-Jung Polyvar. Laboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM).**



**Figura 11. *Fusarium* sp. a) Clamidosporas (40X); b) Fiálide simple con microconidios, (100X); c) Microconicio y macroconidio, (100X), aislados de las hojas, tinción: fucsina. (Micrografía tomada en microscópio de luz, Reichert-Jung Polyvar. Laboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM).**



**Figura 12. *Stagonospora* sp. a) Acérvulo, (40X); b) Conidios, (100X), aislados de las hojas, tinción: fucsina. (Micrografía tomada en microscópio de luz, Reichert-Jung Polyvar. Laboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM).**



**Figura 13. *Alternaria* sp. (40X), a) Conidióforo, b) conidios, aislados de peciolo de las hojas, tinción: fucsina. (Micrografía tomada en microscópio de luz, Reichert-Jung Polyvar. Laboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM).**



**Figura 14. *Gilmaniella* sp. a) Codios, (40X); b) Microporo del conidio, (40X), aislados de la raíz, tinción: fucsina. (Micrografía tomada en microscópio de luz, Reichert-Jung Polyvar. Laboratorio de Microscopía Electrónica, Instituto de Fisiología Celular, UNAM).**

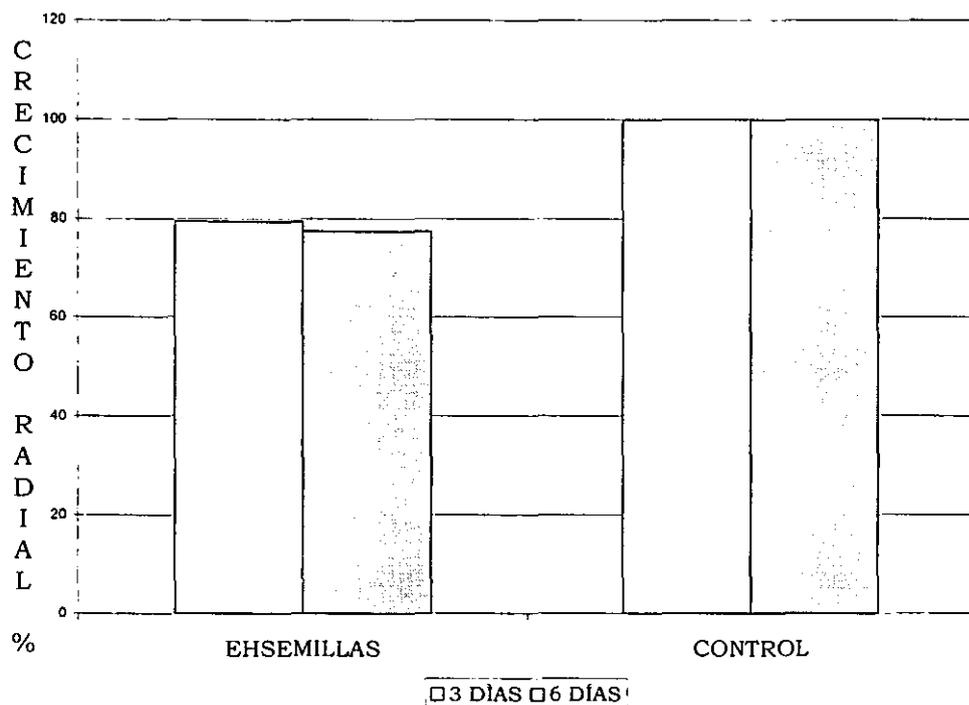


Figura 16. Efecto del aceite obtenido del extracto hexánico de semillas del fruto de *Crescentia alata*, sobre el crecimiento radial (%) del hongo *Alternaria sp.* a 3 y 6 días de crecimiento a una concentración de 250 ppm.

Tabla 10: Porcentaje de mortalidad de *Artemia salina* bajo el efecto de los extractos de hojas, semillas y pulpa del fruto de *Crescentia alata*.

| Extractos                           | Concentración $\mu\text{g/ml}$ |     |       |     | Control 1000 $\mu\text{g/ml}$ |      |      |
|-------------------------------------|--------------------------------|-----|-------|-----|-------------------------------|------|------|
|                                     | 0.1                            | 1.0 | 10    | 100 | 1000                          | MeOH | DMSO |
| <b>Porcentaje de mortalidad (%)</b> |                                |     |       |     |                               |      |      |
| Extracto MeOH Hojas                 | 0                              | 0   | 1.41  | 0   | 0                             | 0    | N    |
| Extracto AcOEt Hojas                | 0                              | 0   | 1.76  | 0   | 0                             | 0    | N    |
| Extracto MeOH Semillas              | 0                              | 0   | 2.40  | 0   | 0                             | 0    | N    |
| Extracto MeOH Pulpa                 | 0                              | 0   | 8.92  | 0   | 0                             | N    | 40   |
| Extracto hexánico semillas          | 3.33                           | 17  | 31.42 | 40  | 0                             | N    | 0    |

N: No utilizado para este caso.

## 7. DISCUSIÓN

La desnutrición y las condiciones pobres de salud que existen en el país, son las principales causas de la alta incidencia de diversas enfermedades, como son las respiratorias y gastrointestinales que afectan fuertemente a la población mexicana. Frecuentemente, los grupos indígenas y mestizos emplean las hojas, semillas y pulpa del fruto del cuatecomate (*Crescentia alata* Kunth) en forma de té, infusión y fermentación para curar dichos males.

Muy poco se sabe de la química de *Crescentia alata*. Los trabajos publicados al respecto, reportan el estudio de esta planta como potencial alimentario por sus grandes cantidades de azúcares; siendo la sacarosa, el producto mayoritario.

En el presente trabajo, el análisis fitoquímico mediante métodos convencionales, muestra la presencia de azúcares; siendo el producto mayoritario, la sacarosa. En los bioensayos de actividad antimicrobiana, los diferentes extractos y productos obtenidos de esta planta no son activos sobre bacterias responsables de enfermedades gastrointestinales y respiratorias, ni sobre hongos patógenos empleando concentraciones de 10, 20  $\mu\text{g/ml}$  y 2.5, 5.0  $\text{mg/ml}$ .

Al observar que el efecto antimicrobiano de la planta fue negativo, se realizó un estudio de algunos hongos asociados a la misma. Se obtuvieron de la raíz y hojas de la planta cepas de *Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Stagonospora* sp., *Gilmaniella* sp. y *Alternaria* sp. Es bien sabido que los hongos filamentosos viven en un rango diverso de habitats, por ejemplo, como saprobios o patógenos. Tienen una considerable importancia económica en la industria como a) sistemas de biotransformación (e.g. transformación de progesterona), b) producción de enzima (e.g. amilasas, pectinasas, celulosas), c) producción de ácido orgánico (e.g. ácido cítrico, ácido glucónico, ácido itaconico), d) producción de aminoácidos (e.g. tryptofano), e) **producción de antibióticos** (e.g. *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. ). Otros juegan un papel importante como hongos fitopatógenos productores de metabolitos fitotóxicos que intervienen en los procesos de infección (e.g. *Alternaria* sp., *Curvularia* sp.).

Los extractos de *Crescentia alata* fueron probados sobre *Alternaria* sp. (hongo aislado de hojas) a una concentración de 250 ppm. Se escogió la cepa de

*Alternaria* sp., por su rápido crecimiento *in vitro*. Los resultados indican que a los 3 días de incubación, los extractos metanólicos de hojas y semillas presentan una actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento radial de *Alternaria* sp., aunque a los 6 días de incubación existe una estimulación del crecimiento radial del hongo. De acuerdo con el análisis de varianza y las comparaciones de contrastes múltiples, no existe una actividad inhibitoria significativa del extracto metanólico de pulpa del fruto ni del aceite aislado de semillas sobre el crecimiento radial de *Alternaria* sp., a 3 y 6 días de incubación, respecto al control ( $P < 0.05$ ). Como un modelo biológico complementario, se escogió a *Artemia salina* para corroborar la actividad de los extractos. Se realizaron bioensayos de toxicidad sobre *Artemia salina*, de los diferentes extractos y productos de la planta. El porcentaje de mortalidad de este crustáceo en presencia de los extractos crudos y productos obtenidos, esta por debajo del 50% a concentraciones de 0.1, 1.0, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ , lo cual indica que la actividad no es significativa y sugiere que la  $\text{LC}_{50}$  es mayor a 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

## 8. CONCLUSIONES

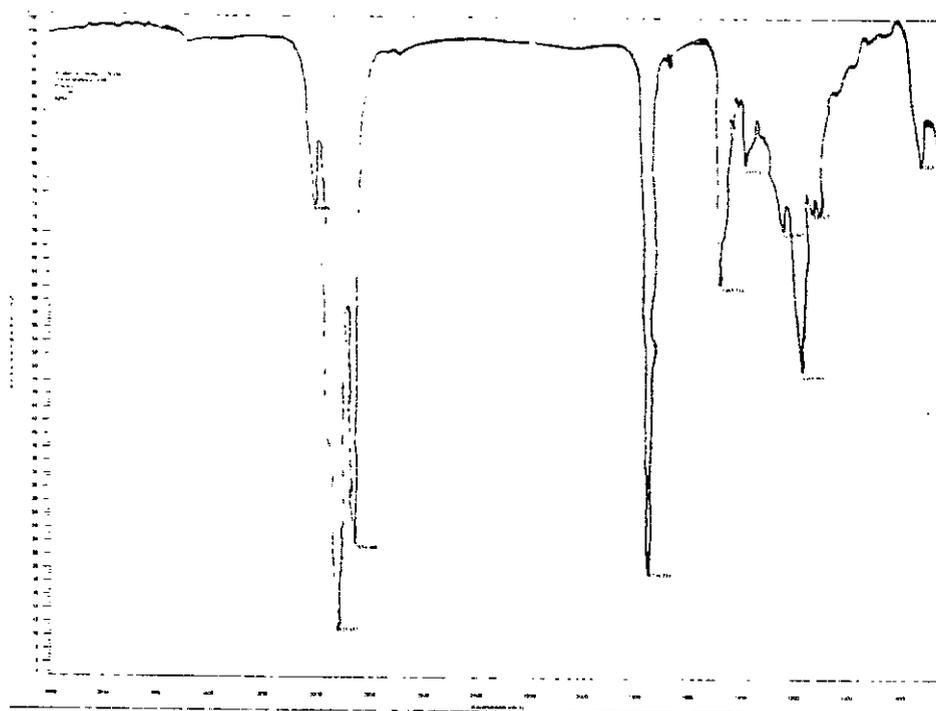
1. Aunque en la medicina tradicional, se emplean las hojas, semillas y pulpa del fruto de *Crescentia alata* Kunth para el alivio de enfermedades gastrointestinales y respiratorias, ni los diferentes extractos ni los productos obtenidos, presentan actividad antimicrobiana sobre bacterias grampositivas y gramnegativas y, hongos patógenos.
2. El análisis fitoquímico de la pulpa y semillas, muestra una gran cantidad de azúcares; siendo la sacarosa, el producto mayoritario.
3. En el estudio de hongos asociados a *Crescentia alata*, se identificaron los géneros *Fusarium* sp., *Stagonospora* sp., *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp. de las hojas. De la raíz, se identificaron los géneros *Gilmaniella* sp. y *Curvularia* sp.
4. Los bioensayos de toxicidad indican que el extracto metanólico de pulpa del fruto y el aceite obtenido de semillas, a una concentración de 250 ppm, no presentan una actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento radial del hongo *Alternaria* sp., aislado de la planta en estudio. Los extractos metanólicos de hojas y semillas a los 3 días de incubación, presentaron una actividad inhibitoria significativa sobre *Alternaria* sp., la cual desaparece a los 6 días de incubación ( $P < 0.05$ ). Esto sugiere que los metabolitos contenidos en estos extractos pueden estar involucrados en las reacciones de defensa química de la planta, al ataque de este tipo de herbívoros.
5. Los extractos metanólico de hojas, semillas y pulpa del fruto y, el aceite obtenido de semillas, no son activos sobre *Artemia salina* a concentraciones de 0.1, 1.0, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/ml}$ .

## 9. PROPUESTAS BASADAS EN LOS DATOS EXPERIMENTALES

### PROBABLES CAUSAS DEL ALIVIO DE ENFERMEDADES GASTROINTESTINALES Y RESPIRATORIAS CON EL USO DE *Crescentia alata* EN LA MEDICINA POPULAR MEXICANA

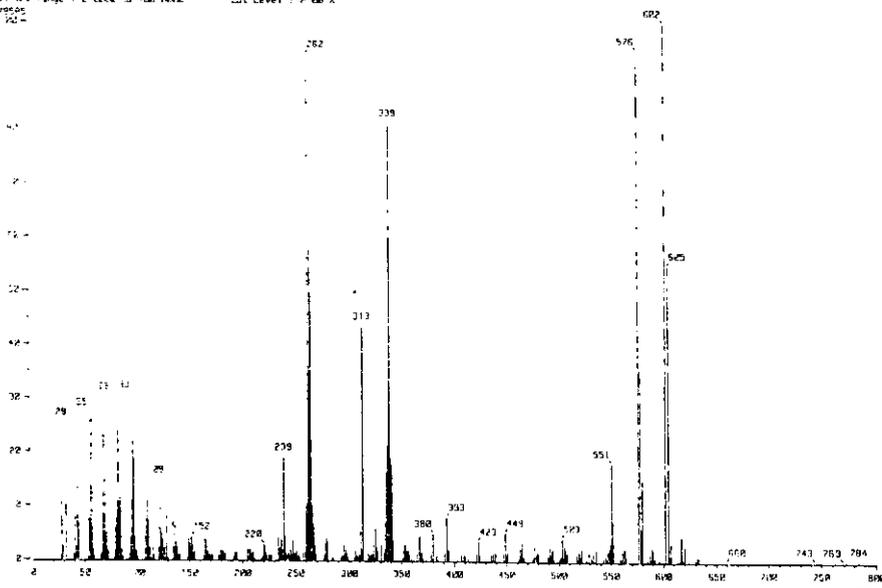
- Recubrimiento del tracto digestivo y faringe mediante una capa de mucina por sus grandes contenidos de azúcares; siendo más abundante, la sacarosa; no permitiendo la adherencia de los microorganismos a las paredes del tracto intestinal y faringe, como consecuencia disminuye la virulencia microbiana. Este efecto se denomina “inhibición de los fenómenos de adherencia bacteriana” (comunicación personal del Dr. Eslava).
- Efectos de otras plantas medicinales acompañantes con actividad antimicrobiana comprobada [Gordolobo, *Gnaphalium* sp.; Eucalipto, *Eucalyptus globulus*; Sauco, *Sambucus mexicana*; Bugambilia, *Bougainvillea spectabilis* y Arnica, *Heterotheca inuloides* (INI, 1994; informante: Sr Rafael Salinas Portillo, Sacacoyuca, Guerrero)] y la combinación con miel de abeja.

## **10. ESPECTROS**



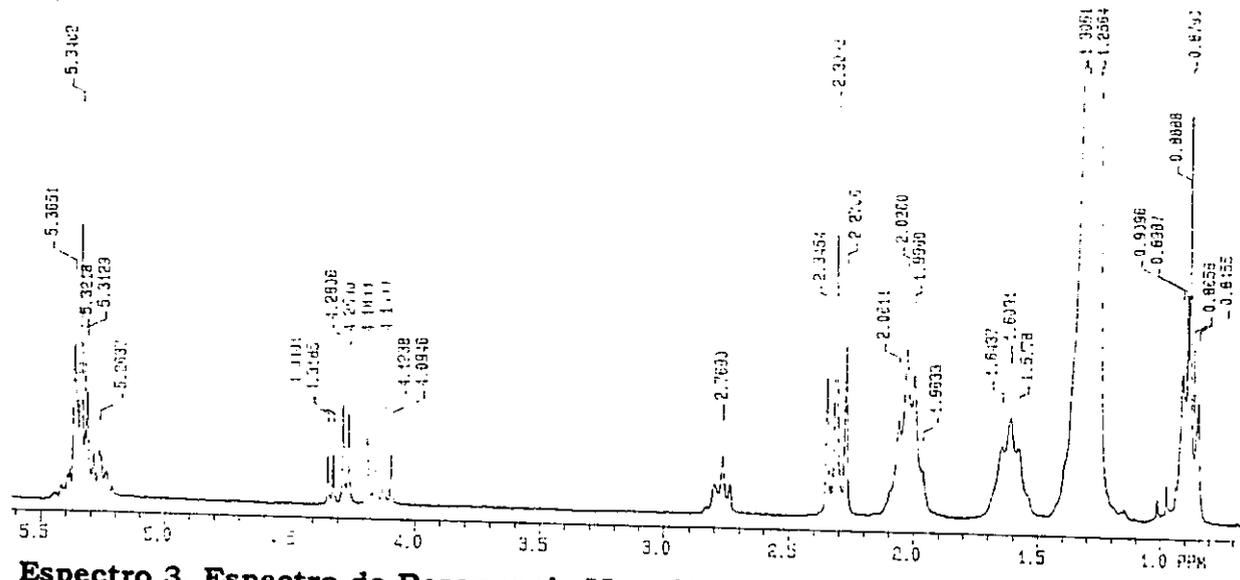
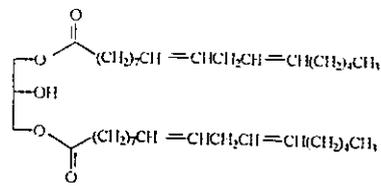
**Espectro 1. Espectro de Infrarrojo (IR) de la fracción del aceite.**

Mass Spectrum 1  
 Date: 21-Aug-98 13:43  
 Sample: C-10-04  
 Note: -  
 Inlet: 1 - Inlet Ion Flow: EI+  
 Substrate Type: Normal Ion: [M+]  
 RT: 2.35 min Scan: 50, 101-29, 500  
 SR: 4.00, 200, 20000 -1.20  
 Output File Name: 2-2048 to 400, 10000  
 100000  
 200 -

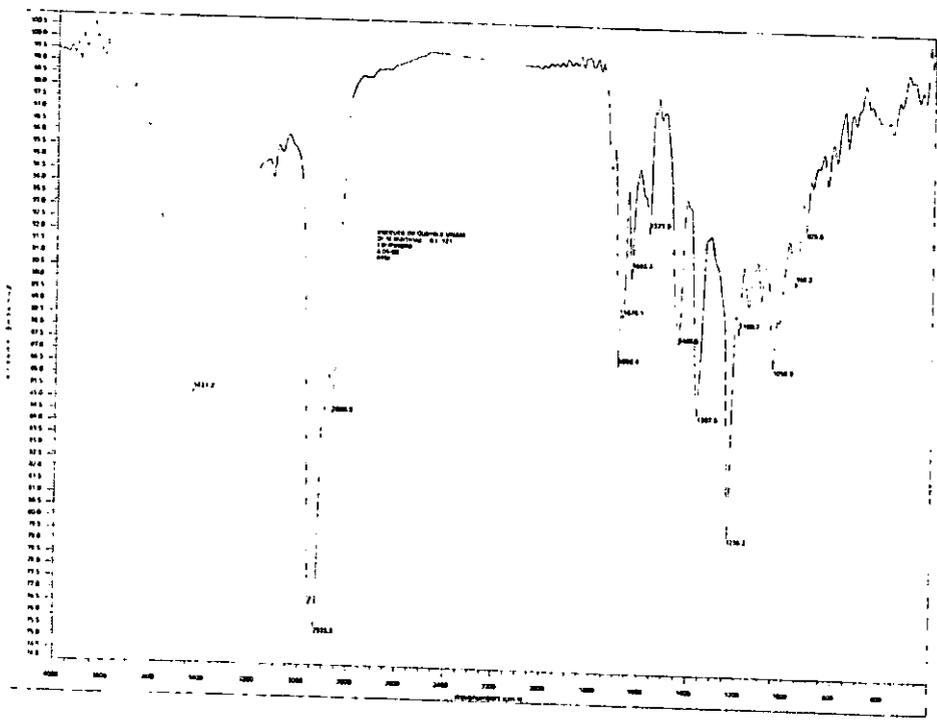


**Espectro 2. Espectrometría de masas (EI+) de la fracción del aceite.**

MARINO KATZMAN JACOBS  
 INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM  
 LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA

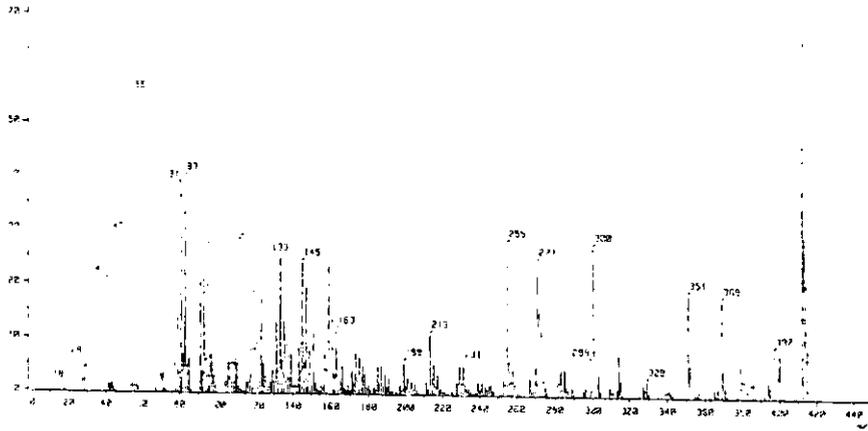


**Espectro 3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protones (RMN <sup>1</sup>H) de 200 MHz (CDCl<sub>3</sub>) de la fracción del aceite.**

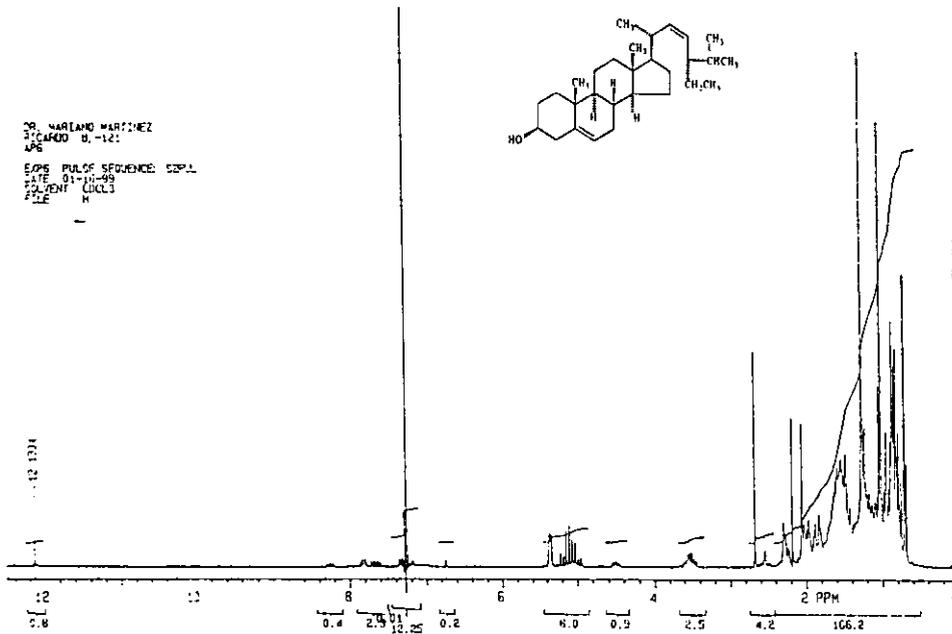


**Espectro 4. Infrarrojo (IR, KBr/pastilla) del stigmasterol.**

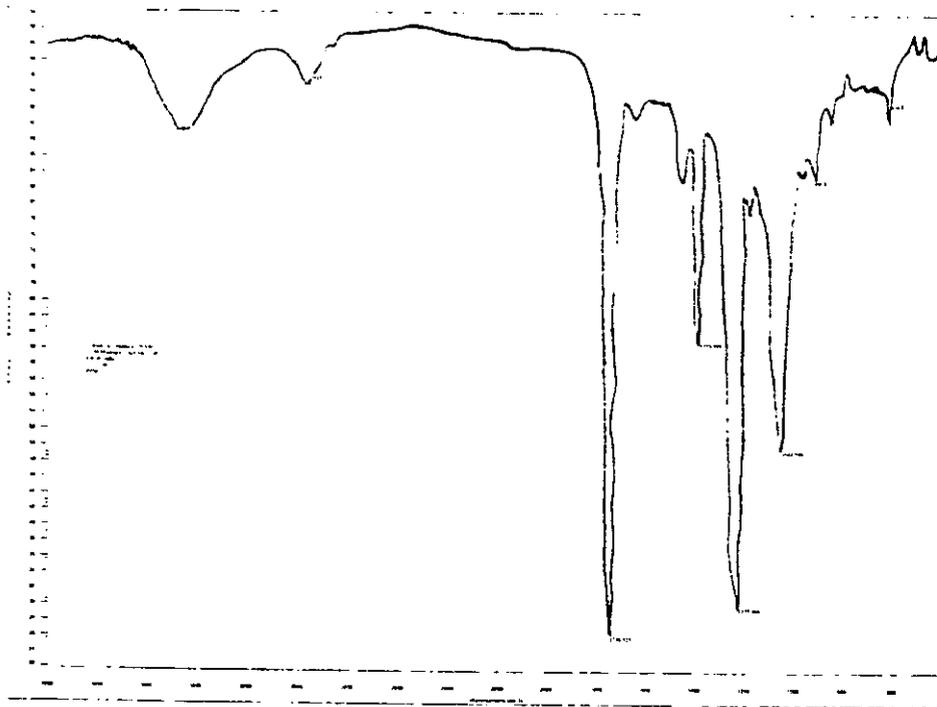
Mass Spectrometry  
 Date: 04/28/98 22:41  
 File: 04289801  
 Sample: STIGMASTEROL  
 Concentration: 10000  
 Temperature: 223.8 deg C  
 Method: EI+  
 Scan: 100



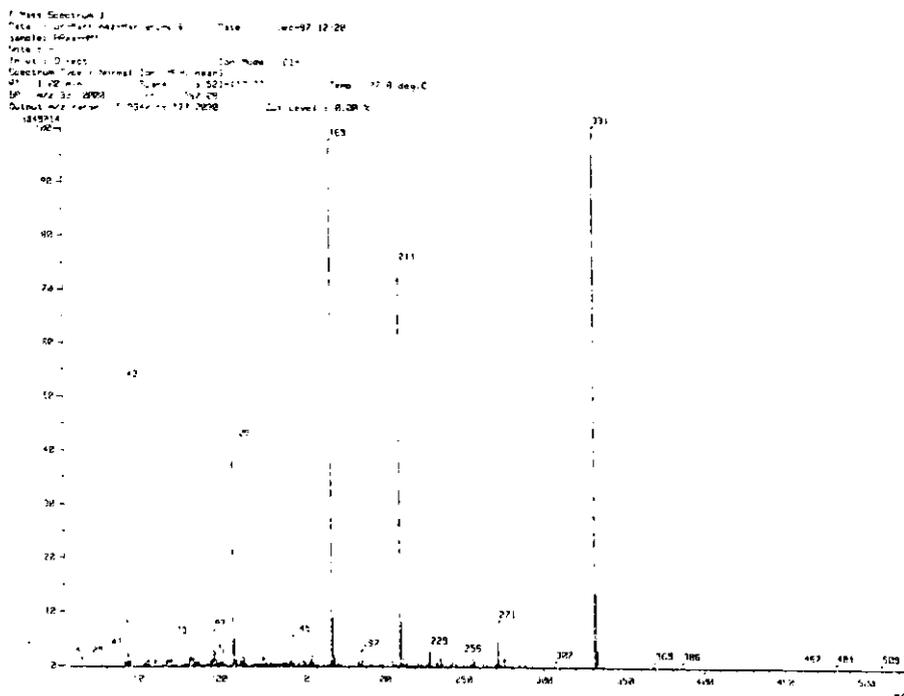
**Espectro 5. Espectrometría de masas (EI+) del stigmasterol.**



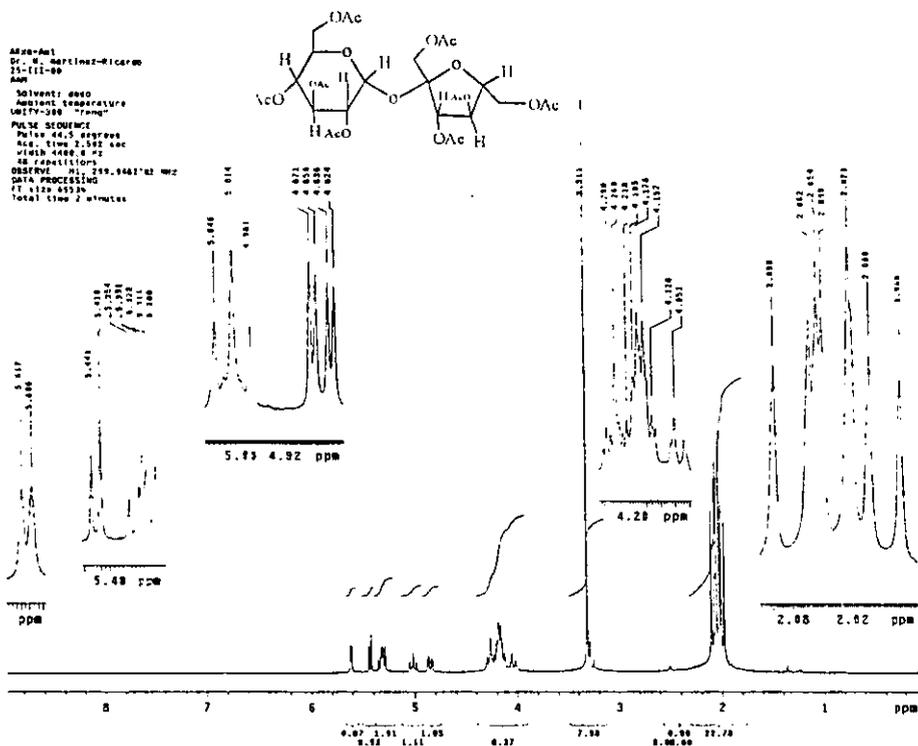
**Espectro 6. Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN <sup>1</sup>H) 200 MHz (CDCL<sub>3</sub>) del stigmasterol.**



**Espectro 7. Infrarrojo (IR, KBr/pastilla) de la sacarosa peracetilada.**



**Espectro 8. Espectrometría de masas (EI+) de la sacarosa peracetilada.**



**Espectro 9. Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN <sup>1</sup>H) 300 MHz (DMSO) de la sacarosa peracetilada.**

## 11. BIBLIOGRAFÍA.

- 1) Aguilar, A.; J.R. Camacho; S. Chino; P. Jácquez y M. E. López, (1994). **Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social, información etnobotánica.** 1ª. Edición. Instituto Mexicano del Seguro Social, México, D.F. Páginas: 62.
- 2) Anaya, A.L.; B. H. Bautista; A. T. Barragán; J. L. Cantera y M. J. Estrada. **Phytotoxicity of cacalol and some derivatives obtained from the roots of *Psacalium decompositum* (A. Gray) H. Rob & Brettell (Asteraceae), Matarique or Maturin.** *J. Of Chem. Ecology*, **22**, 3:393-403, (1996).
- 3) Alvarez, L.; M. Núñez; M. C. Pérez; M. L. Villarreal y G. Delgado. **Chemical and Biological Study of *Astianthus viminalis*.** *Planta Med.* 60: 98, (1994).
- 4) Bianco, A.; E. Marini; M. Nicoletti; S. Foddai; J. A. Garbarino; M. Piovano y M. T. Chamy. **Bis-iridoid glucosides from the roots of *Argyria radiata*.** *Phytochemistry*, **31** (12) 4203-4206, (1992).
- 5) Binutu, O.A. **Phytochemical and antimicrobial studies on *Crescentia Cujete*.** *Fitoterapia*, LXVIII, 2, (1997).
- 6) Brady, S. F. y J. Clardy. **CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus.** *J. Nat. Prod.* 63, 1447-1448, (2000).
- 7) Cano y Cano G. (1994). **Taxonomía de plantas superiores.** 1ª. Edición. Editorial Trillas, México, D.F. Páginas: 330-301.
- 8) Cervantes, V. (1889). Edición "Del Estudio" Ensayo para la Materia Médica Mexicana, México. Oficina Tipográfica de la Secretaria de Fomento. Página: 54.

- 9) Curtis, H. y Barnés, N. S. (1995). **Invitación a la Biología**. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana, México, D.F. páginas: 80, 401-411, 442-444.
- 10) Dewick, P.M. (1997). **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 1ª. Edición. Editorial John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England. Páginas: 32-264.
- 11) Farnsworth, N.O. (1984). **The role of medicinal plants in drug development**. In: Krogsgaard-Larsen, P., Christensen, S.B., Kofod, H. (Eds.), *Natural Products and Drug Development*. Balliere, Tindall and Cov, London. Páginas: 8-98.
- 12) Font, Quert P. (1982). **Dirección de Botánica**. 1ª. Edición. Editorial Labor. Páginas: 134-135.
- 13) Gafner, S.; J. L. Wolfender; M. Nianga; H. S. Evans y K. Hostettman. **Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots**. *Phytochemistry*, **42**, (5) 1315-1320, (1996).
- 14) Gafner, S.; J. L. Wolfender; M. Nianga y K. Hostettmann. **A naphthoquinone from *Newbouldia laevis* roots**. *Phytochemistry*, **48**, (1) 215-216, (1998).
- 15) Gafner, S.; J.L. Wolfender; M. Nianga y K. Hostettmann. **Phenylpropanoid glycosides from *Newbouldia laevis* roots**. *Phytochemistry*, **44**, (4) 687-690, (1997).
- 16) Gentry, A.H. (1982). **Flora de Veracruz: Bignoniaceae**. Fascículo 24, Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Xalapa, Veracruz. pp. 1-3, 88-90.
- 17) Gómez, B. R. y Bressani, R. **Nutritional evaluation of the oil and meal of the jicara or morro (*Crescentia alata*) seed**. *Arch. Latinoamer. Nutr.* **23**, (2), 225-242, (1973).

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

- 18)Gómez, B. R.; Contreras I.; Braham J. E.; Bressani R. **Chemical evaluation of morro or jicaro (*Crescentia alata*) meals prepared by ensilaging and/or by dehydration.** *Arch. Latinoamer. Nutr.* **30**, (2), 236-253, (1980).
- 19)Gómez, P. A. (1966). **Estudios botánicos de la región Misantla, Veracruz.** 1ª. Edición. Ediciones del Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. Editorial Cultural. Páginas: 100-101.
- 20)Guiso, M.; C. Marra; F. Piccioni y M. Nicotetti. **Iridoid and phenylpropanoid glucosides from *Tecoma capensis*.** *Phytochemistry* **45**, (1), 193-194, (1997).
- 21)Hawksworth, D.L.**The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation.** *Mycol. Res.***95**, 641-655, (1991).
- 22)Heltzel, C.E.;L. Gunatilaka; T.E. Glass y G. I. Kingston. **Furofuranonaphthoquinones: Bioactive compounds with a novel fused ring system from *Crescentia cujete*.** *Tetrahedron* **49**, (31), 6757-6762, (1993).
- 23)Heltzel, C. E.; L. Gunatilaka; T.E. Glass y G.I. Kingston. **Bioactive furanonaphthoquinones from *Crescentia cujete*.** *J. Nat. Prod.*, **56**, (9), 1500-1505, (1993).
- 24)Hernández, F. (1959). **Historia Natural de la Nueva España.** Obras completas, México, D.F. UNAM. s/p.
- 25)Huerta, C. **La herbolaria: mito o realidad.** *Biodiversitas*, año 3, (12), 1-7, (1997).
- 26)INEGI.(1996). **Agenda Estadística.** Edición 1996. Secretaría de Hacienda, México. Páginas, 165-172.

- 27)INI. (1994). **Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana**. 1ª edición. Instituto Nacional Indigenista. Tomo I. Colección completa. México, D.F. Páginas: 455-456.
- 28)Kanchan, A. y S.P. Popli. **The constituents of *Crescentia cujete* leaves**. *Fitoterapia*, LXIII, (5), 476, (1992).
- 29)Katzung, B. G. (1987). **Farmacología básica y clínica**. 3ª. Edición. Editorial El Manual Moderno. México, D.F. Páginas: 527-533.
- 30)García, E. (1988). **Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen**. 4ª. Edición. Instituto de Geografía, UNAM. Ciudad Universitaria. México, D.F. Páginas: 204-217.
- 31)Martínez, M. (1979). **Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas**. 1ª. Edición. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. Página: 99.
- 32)Miranda, F. (1975). **La vegetación de Chiapas**. 2ª. Edición. Ediciones del Gobierno del Estado de Chiapas. México, D.F. Páginas: 116-120.
- 33)National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1984). **Approved standard: M2-A3. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests**. 3rd. Edition. NCCLS, Villanova, Pa.
- 34)Rojas, A.; Hernández, L.; Pereda-Miranda, R. and Mata, R. **Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from mexican medicinal plants**. *Journal of Ethnopharmacology*, (35), 275-283, (1992).
- 35)Sam, T. W. (1993). **Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina***. Editores Colegate, S.M. y Molyneux R.J.: Bioactive Natural Products. CRC Press, Florida, Usa. Páginas: 441-456.

- 36) Steinert, J. ; H. Khalati ; M. Rimpler. **HPLC separation and determination of naphtho[2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae* (Bignoniaceae).** *J. Cromatogr. A.* 693: 281-287, (1995).
- 37) Tamm, Ch. (1976). **Recent Advances in the Field of Antibiotics.** Proceedings of the First International Congress on Medicinal Plant Research, Section A, held at the University of Munich, Germany, September 6-10, 1976.
- 38) Tetsuo, I.; T. Hamada; S. Kurogi; T. Hase; T. Okubo y M. Kim. **Iridoids from *Catalpa bignonioides*.** *Phytochemistry*, **30**, (12), 4057-4060, (1991).
- 39) Tetsuo, K.; K. Ohtani; R. Kasai; K. Yamasaki y N. Minh. **Iridoids and iridoid glucosides from fruits of *Crescentia cujete*.** *Phytochemistry*, **46**, (5), 907-910, (1997).
- 40) Verpoorte, R. y P.P. Dihal. **Medicinal plants of Surinam IV. Antimicrobial activity of some medicinal plants.** *Journal of Ethnopharmacology*, (21) 315-318, (1987).
- 41) Wagner, H. y P. Wolff. (1977). **New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or therapeutical activity.** Ssprinter-Verlag, Berlin Heidelberg, New York. Paginación: 82-107.
- 42) Zúñiga, R. J. **Oil seeds from American tropics.** *Arch. Latinoamer. Nutr.*, **31**, (2), 350-370, (1981).