

218



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS DE LA
LAMINA FOLIAR DE *Phyllonoma laticuspis* (Phyllonomaceae)
UNA ESPECIE EMPLEADA EN LA MEDICINA
TRADICIONAL.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A ;
C L A U D I A V E G A C A S T R O

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARIA CRISTINA PEREZ-AMADOR

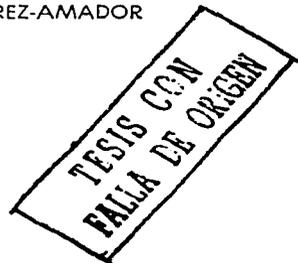


FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



ESTADO NACIONAL
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Análisis de los extractos orgánicos de la lámina foliar de Phyllonoma laticuspis
(Phyllonomaceae) una especie empleada en la medicina tradicional.

realizado por Claudia Vega Castro

con número de cuenta 8832443-8 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. María Cristina Pérez-Amador

Propietario

M. en C. Armando Gómez Campos

Propietario

M. en C. Raúl Contreras Medina

Suplente

M. en C. Josefina Herrera Santoyo

Suplente

M. en C. Marisa Osuna Fernández

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.



Dra. Patricia Ramos Morales

DEPARTAMENTO
DE BIOLÓGICA

Agradezco a todas las personas que con su valiosa ayuda y asesoramiento hicieron que el presente trabajo fuera posible:

Dra. María Cristina Pérez-Amador.

M. en C. Armando Gómez Campos.

Q. A. Verónica Muñoz Ocotero.

Q. F. B. Norma Trejo Medina.

M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan.

M. en C. Raúl Contreras Medina.

M. en C. Marisa Osuna Fernández.

M. en C. Josefina Herrera Santoyo.

Claudia Vega Castro

“Análisis de los extractos orgánicos de la lámina foliar de *Phyllonoma laticuspis* (Phyllonomaceae) una especie empleada en la medicina tradicional”

ÍNDICE

Abreviaturas y fórmulas químicas	3
Introducción	4
Antecedentes	6
I. Características generales de <i>Phyllonoma laticuspis</i>	
-Etonobotánica	6
-Ubicación taxonómica	8
-Descripción botánica	9
-Descripción química	13
II. Generalidades de las pruebas biológicas realizadas	
-Inflamación	15
-Bacterias	17
Hipótesis	21
Objetivos	22
Método	
-Recolecta y procesado de la muestra	23
-Extractos	23
-Pruebas de solubilidad	24
-Pruebas antiinflamatorias	25
-Pruebas antibacterianas	27
-Placas cromatográficas en capa fina	29
-Pruebas cromogénicas en placa	29
-Pruebas cromogénica y de precipitación en tubo	30

Resultados y discusión	
-Extractos	36
-Pruebas de solubilidad	40
-Pruebas antiinflamatorias	41
-Pruebas antibacterianas	43
-Perfiles cromatográficos en capa fina	47
-Pruebas cromogénicas en placa cromatográfica	55
-Pruebas cromogénicas en tubo	55
Conclusiones	58
Anexos	
-Preparación de reveladores y reactivos utilizados	61
- Método de tinción Gram y de esporas	66
-Preparación de colorantes para tinción Gram y de esporas	68
-Preparación de medios de cultivo	71
Bibliografía	72

ABREVIATURAS Y FÓRMULAS QUÍMICAS

AcOEt	Acetato de etilo
AlCl ₃	Cloruro de aluminio
AM	Aguas madres
BuOH:acético:H ₂ O	Butanol:acético:agua
CHCl ₃	Cloroformo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EMB	Agar cosina de metileno lactosa
EtOH	Etanol
FeCl ₃	Cloruro férrico
HCl	Ácido clorhídrico
H ₂ O	Agua
LPS	Lipopolisacárido
MeOH	Metanol
P.c.	Placa cromatográfica
P.f.	Punto de fusión
Pp.	Precipitado
Rf.	Valor relativo al frente
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetato
UV	Ultravioleta
ZnCl ₂	Cloruro de zinc

INTRODUCCIÓN

México es uno de los lugares geográficos donde existe una gran diversidad biológica (Arellano, 2000), tan solo para el reino vegetal se estima que en nuestro país existen aproximadamente 35 000 especies de plantas superiores (Moore *et al.*, 1995).

El ser humano a través del tiempo ha recurrido a las plantas en busca de curación para sus enfermedades, esa búsqueda lo ha hecho profundizar en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales para ampliar su experiencia en el empleo de los productos que de ellas se extraen (Reader's Digest, 1987).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud se calcula que el 80% de la población del mundo hace uso en alguna medida de plantas medicinales ya sea como único medio curativo o como un medio alternativo (Espinoza, 2000).

La fitoterapia, nombre que se aplica al uso medicinal de las plantas, nunca ha dejado de tener vigencia, los mismos árboles, arbustos y hierbas que por siglos sirvieron a herbolarios y curanderos para preparar infusiones, bálsamos y emplastos curativos proporcionan hoy en día materia prima a la moderna industria farmacéutica. Casi la mitad de los medicamentos que se prescriben actualmente proceden del reino vegetal (Reader's Digest, 1987).

Una de las familias que presenta propiedades medicinales es la Phyllonomaceae en la cuál se encuentra la especie *Phyllonoma laticuspis* (Turcz.) Engl. 1890 (Pérez-Cálix, 1999), sobre la cuál enfocamos este estudio, ya que pese a su pequeña distribución dentro de la República Mexicana, es utilizada generosamente por grupos étnicos para curar principalmente lesiones de la piel como heridas y viruela (Pérez-Cálix, 1999).

Dado que no se ha registrado para esta especie algún análisis químico, con este trabajo se pretende evaluar su actividad biológica y aportar una alternativa más en la medicina tradicional enriqueciendo así, el conocimiento que se tiene sobre la especie y

como consecuencia favorecer el uso racional de nuestros recursos naturales y la conservación de los mismos.

El estudio de *Phyllonoma laticuspis* se llevó a cabo en el Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias de la UNAM por medio de técnicas fitoquímicas previamente probadas en plantas medicinales a partir de extractos orgánicos que constituyen las fuentes principales de sustancias de interés terapéutico, así como la evaluación de éstos en pruebas antiinflamatorias y antibacterianas para determinar su potencial activo.

ANTECEDENTES

I.- CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Phyllonoma laticuspis*:

- **Etnobotánica:**

En el estado de Guerrero se encuentra la localidad denominada Carrizal de Bravo, ubicada a 2350 msnm sobre la carretera Filo de caballos-Atoyac de Alvarez, sitio en donde se recopiló la siguiente información etnobotánica con personas de la comunidad sobre la especie *Phyllonoma laticuspis* una planta de hábito arbóreo perteneciente a la familia Phyllonomaceae:

“La práctica del uso de esta especie medicinal en la región, data desde hace más de 25 años a partir de que los habitantes de la región observan que los animales heridos principalmente los venados, ingerían y se echaban sobre las hojas que se desprendían de un árbol recuperándose en un corto período, entonces comenzaron a utilizarla nombrándola “la medicina del venado”, también es conocida por el nombre de “mil hojas”, “sana todo”, “la hierba de la viruela” y “encarnadora”, algunos de estos nombres le han sido atribuidos debido a sus propiedades curativas como sanar heridas, úlceras, diabetes y riñón” (recolector de la comunidad).

“La “encarnadora” recién recolectada (hojas y ramas), es extendida en un sitio sombreado para llevar a cabo el secado, ya que según los pobladores si se expone al sol “se pierde la sabia de la hoja” y no funciona igual, del mismo modo evitan que se exponga a la intemperie durante la noche, guardándola en un lugar seco y fresco después del secado”.

“La única parte aprovechable de la “encarnadora” son las hojas, el modo de empleo es a través de infusión, hirviéndolas y dejándolas hasta el día siguiente ya que el agua a adquirido un color café caramelo, esta infusión es ingerida o empleada para lavar las heridas en el caso de lesiones graves y operaciones; en aproximadamente tres días el paciente esta completamente recuperado. Esporádicamente esta infusión es utilizada como agua fresca ya que no tiene un sabor desagradable” (recolector de la comunidad).

“Debido a que esta especie con propiedades medicinales no se encuentra disponible en el mercado, los consumidores no sólo de la región sino de diferentes partes de la República Mexicana y Estados Unidos, encargan la cantidad necesaria a los recolectores que la venden a un costo de \$5.00 y \$10.00 los 100 gramos de hojas y ramas”.

“Aunque los pobladores encuentran en esta actividad una fuente más de ingresos, no hay un control sobre la recolecta. En ocasiones algunos recolectores cortan únicamente las ramas dejando el fuste del árbol esperando a que vuelva a adquirir más follaje y poder de esta forma seguir explotando el recurso, mientras que otros dañan el eje principal del árbol evitando el nacimiento de retoños, y disminuyendo el número de individuos” (recolector de la comunidad).

De acuerdo con los habitantes de la región, la población de *Phyllonoma laticuspis* ha disminuido, y a pesar de que han intentado cultivarla en invernadero no han obtenido resultados positivos por lo que prefieren seguir practicando la recolecta de dicha planta.

- **Ubicación taxonómica:**

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Rosales

Familia: Phyllonomaceae (Cronquist, 1981; Cronquist, 1988; Takhtajan, 1997; Durán-Espinosa, 1998; Pérez-Cálix, 1999).

Género: *Phyllonoma*

Especie: *P. laticuspis* (Turczaninow) Engler, 1890 (Pérez-Cálix, 1999).

Sinonimias: *Dulongia laticuspis* (Turczaninow, 1858) (Durán-Espinosa, 1998).

Phyllonoma coriacea (Riley, 1924) (Durán-Espinosa, 1998).

Nombre (s) común (es): Hierba de la viruela (Martínez, 1996), cuendilla (Durán-Espinosa, 1998); mil hojas, hierba del venado, encarnadora (comunidad Carrizal de Bravo, Guerrero).

El nombre común que se empleó en este trabajo para *Phyllonoma laticuspis* fue el de "encarnadora", debido a que con este nombre es conocida por la comunidad de Carrizal de Bravo, Guerrero en donde se realizó la recolecta del material botánico.

El género *Phyllonoma* ha sido ubicado en varias familias debido a las diversas características que presenta y que comparte con las mismas de acuerdo a el criterio de cada autor:

En 1820 Schutles (Mori *et al.*, 1977), adoptando un nombre propuesto por Willdenow, estableció el género con dos líneas de descripción de *Phyllonoma ruscifolia* basado sobre una colección hecha por Humboldt en Colombia; en 1825 Humboldt describió un nuevo género y especie, *Dulongia acuminata* basado en su propia colección, colocando al género con ciertos cuestionamientos en la familia Celesteraceae por sus inflorescencias epífilas similares a las de *Polycardia*, pero notaron que el género también compartía características con Cornaceae, Araliaceae y Umbelliferae (ovarios inferos) y con las

familias Saxifragaceae, Escalloniaceae y Grossulariaceae (placentación parictal) (Mori *et al.*, 1977).

Agardh en 1858 (Mori *et al.*, 1977) creó para este género una nueva familia, Dulongiaceae, simplemente por que no lo sintió apto dentro de otra familia; en el mismo año Turczaninow describió dos nuevas especies, *Dulongia laticuspis* de Oaxaca, México y *Dulongia interregima* de Colombia (Mori *et al.*, 1977).

D' Candolle en 1873 (Mori *et al.*, 1977) adoptó el nombre correcto para este género y colocó a *Phyllonoma* en la tribu Escalloniaceae de la familia Saxifragaceae. Mientras que en 1891 Engler (Mori *et al.*, 1977) aceptó dos especies, *Phyllonoma ruscifolia* y *Phyllonoma laticuspis* asignando los géneros a la subfamilia Escallonioidae de la Saxifragaceae. En 1905 Rusby nombró a la familia Phyllonomaceae como una familia monogenérica (Mori *et al.*, 1977).

- **Descripción botánica:**

La familia Phyllonomaceae es una pequeña familia monotípica y el género *Phyllonoma* presenta sólo cuatro especies; este género se caracteriza por ser el único de Norteamérica que presenta inflorescencia epífila en la lámina de la hoja cerca del ápice (Durán-Espinosa, 1998) (Figura 1).

Phyllonoma laticuspis es de hábito arbustivo con apariencia arbórea hasta 15 m de altura, sus ramas son delgadas y flexibles, la lámina foliar es lanceolada a ovado-lanceolada de 1.6 a 10.3 cm de largo y 0.5 a 2.3 cm de ancho, membranáceas o coriáceas, los peciolo presentan de 2 a 13 cm de largo; las flores se disponen en inflorescencias racimosas en la base o cerca de la base del acumen de la hoja, llegan a medir de 1 a 8 mm de largo. La flor presenta un color verde blanquecino característico; el fruto es globoso a subgloboso, de 5 a 7 mm de largo y de 4.5 a 9 mm de diámetro, 2 a 9 semillas por fruto de 1.5 a 2.5 mm de largo por 0.9 a 1.7 mm de ancho; florece y fructifica durante la mayor parte del año (Pérez-Cáliz, 1999) (Figura 2).

Habita en las cañadas con vegetación de bosque mixto de pino-encino con elementos de bosque mesófilo de montaña, se encuentra a una altitud de 2300 a 2400 msnm. Se distribuye en el norte de México, Durango, Jalisco, Michoacán en donde se considera en peligro de extinción por su población reducida, Veracruz, Guerrero, Oaxaca, Centro y Sudamérica (Pérez-Cálix, 1999) (Figura 3).



Fig. 1. Flor epifita de una especie de *Phyllonoma* (*P. ruscifolia*)
(Tomada de <http://mobot.mobot.org/W3T/search/index/mesotp.html>).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

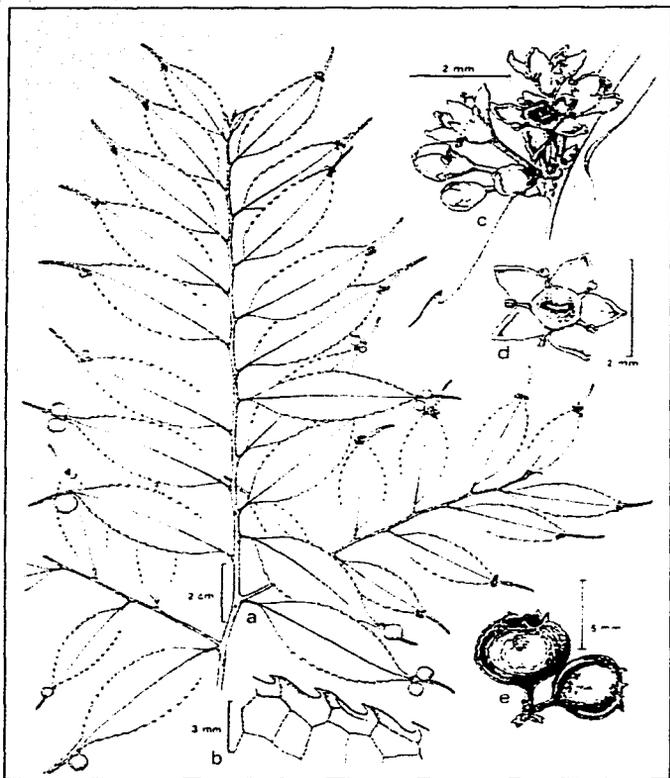


Fig. 2. *Phyllonoma laticuspis*. a. rama terminal con flores y frutos; b. detalle del margen foliar; c. inflorescencia; d. flor, vista apical; e. frutos (Tomada de Durán-Espinosa, 1998).

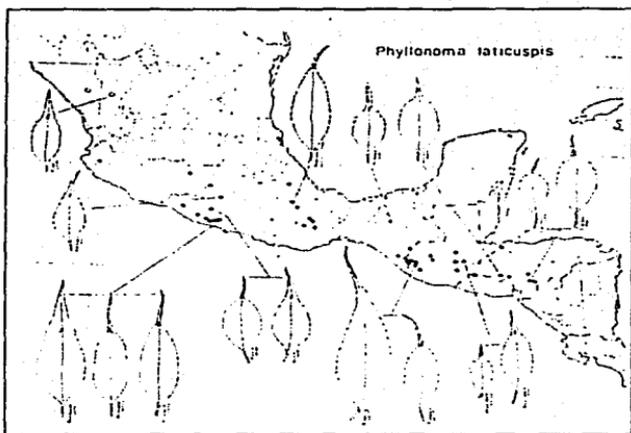


Fig. 3. Distribución geográfica de *Phyllonoma laticuspis* de acuerdo con la forma de la lámina foliar (Tomada de Mori *et al.*, 1977).

- **Descripción química:**

En el estudio de plantas medicinales es de suma importancia conocer los grupos químicos que las componen para poder saber cuáles son los principios activos de las mismas. Dentro de los productos naturales más estudiados en las plantas medicinales se encuentran los alcaloides, los terpenoides, los flavonoides, etc., productos del metabolismo secundario de la planta, sintetizados a partir de los metabolitos primarios de ésta como aminoácidos, monosacáridos, lípidos, etc. (Gros *et al.*, 1985).

Los alcaloides constituyen un grupo heterogéneo de bases nitrogenadas que se encuentran formando anillos heterocíclicos, algunos de estos compuestos presentes en vegetales tienen actividad farmacológica, se les puede encontrar en hojas, semillas, raíces y corteza dependiendo de la familia (Gros *et al.*, 1985), además de relacionarlos con la protección del vegetal ante los depredadores como insectos y herbívoros (Raven *et al.*, 1999).

Los compuestos fenólicos abarcan un amplio rango de sustancias vegetales, tienden a ser solubles en agua y la mayoría se encuentran frecuentemente combinados con un azúcar como glicósidos, usualmente están localizados en la vacuola celular (Harborne, 1984). Dentro de los grupos fenólicos naturales con estructura conocida se encuentran los flavonoides que son pigmentos vegetales con un esqueleto carbonado, los cuales pueden estar libres o como glicósidos, estos últimos contribuyen a darle color a la flor, fruto y hoja; mientras que las agliconas son más frecuentes en tejidos leñosos (Dominguez, 1973).

Los diferentes tipos de flavonoides se pueden identificar mediante reacciones coloridas y propiedades de solubilidad; los extractos muestran variaciones al adicionarles un álcali, las flavonas y flavonoles se ponen amarillos, las flavonas e isoflavonas viran a diversos tonos de rojo, las chalconas a púrpura rojizo, los flavonoles a café-anaranjado y las antocianinas a azul (Dominguez, 1973). De igual forma varios grupos importantes de materiales poliméricos en las plantas como las ligninas, melaninas y taninos son

polifenólicos y ocasionalmente las unidades fenólicas se encuentran en proteínas, alcaloides y entre los terpenoides (Harborne, 1984).

Por otro lado, los terpenos están entre los grupos químicos más ampliamente distribuidos y diversos de los productos naturales, tienen un rasgo simple que los unifica por el cual están definidos y pueden ser fácilmente clasificados, están formados por unidades de alcohol isopentenílico (Kaufman *et al.*, 1999).

Debido a la difícil ubicación taxonómica y a la escasa información referente a *Phyllonoma laticuspis* se revisaron estudios químicos a nivel de las familias dentro de las cuales es ubicada, encontrando únicamente análisis químicos para la familia Saxifragaceae.

En la familia Saxifragaceae se han hecho evidentes la presencia de polifenoles, cumarinas e isocumarinas así como de saponinas que han sido de gran utilidad para clasificar taxonómicamente algunos géneros, tal es el caso de *Saxifraga*; también han sido aislados triterpenos y glucósidos como la asperulina y loganina (Hegnauer, 1973).

En cuanto a aceites esenciales, se ha descubierto que en la familia Saxifragaceae la producción es casi nula y solo se presenta en algunas especies de la subfamilia Escallonioideae, al igual que los glicósidos cianogénicos que solo se hacen presentes en un número reducido de especies, mientras que los alcaloides solo han sido estudiados en los géneros *Drychroa* e *Hydrangea* (Hegnauer, 1973).

II.- GENERALIDADES DE LAS PRUEBAS BIOLÓGICAS REALIZADAS:

- **Inflamación:**

Los productos de origen natural, presentan estructuras farmacológicas interesantes que pueden proporcionar nuevos agentes antiinflamatorios (Payá *et al.*, 1996), como *Decatropis bicolor* que presenta propiedades antibacterianas y antiinflamatorias que han sido comprobadas químicamente (García-Argáez *et al.*, 2000).

La inflamación es una reacción de defensa del organismo ocasionada por diversos factores como lesiones por golpes, por microorganismos como bacterias, virus o parásitos, que actúan generalmente por sus toxinas (especialmente las bacterias) y los agentes irritantes, sobre todo sustancias químicas, radiaciones térmicas, rayos ultravioleta o emanaciones radiactivas. Los síntomas que se presentan cuando hay inflamación son rubor, calor, dolor y edema (Vane *et al.*, 1998).

Aunque la inflamación es un proceso defensivo, protector y localizador de los factores patógenos, como todo mecanismo de defensa puede dispararse e ir más allá y transformarse en un proceso perjudicial que es necesario frenar, esto se logra con los antiinflamatorios capaces de inhibirla (Vane *et al.*, 1998).

Es posible evaluar sustancias antiinflamatorias sintéticas o provenientes de plantas medicinales de uso tradicional experimentalmente por medio de agentes promotores de la inflamación (Vane *et al.*, 1998).

Entre los diferentes métodos experimentales que permiten un mayor entendimiento sobre el proceso inflamatorio se encuentra el modelo del TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetato), un agente promotor de tumores ampliamente usado como agente de inflamación cutáneo en experimentos con animales (Rao *et al.*, 1993).

La práctica del modelo del TPA en oreja de ratón es ampliamente usado ya que además de su fácil realización, se obtienen resultados eficaces y casi inmediatos; se practica para conocer la actividad antiinflamatoria que presentan los productos de origen natural, este diseño puede proveer alternativas para los agentes comunes terapéuticos o puede ser usado para establecer los mecanismos de control del proceso inflamatorio a nivel celular y molecular (Payá *et al.*, 1996).

Estudios comparativos realizados entre agentes inductores de la inflamación a nivel tópico como el ácido araquidónico y el TPA han demostrado que; el TPA induce una respuesta inflamatoria más potente y de mayor duración (Rao *et al.*, 1993).

Con base en el modelo de TPA en oreja de ratón, se han realizado experimentos de la actividad antiinflamatoria de *Endospermum diadenum*, una planta empleada en la medicina tradicional de Tailandia, encontrando que el TPA aplicado a la oreja de ratón induce la permeabilidad vascular y el flujo celular asociado al edema, mismo que se ve inhibido al aplicar tópicamente dosis de *Endospermum diadenum* (Payá *et al.*, 1996).

Aunque hay una gran cantidad de investigaciones sobre el TPA como estimulante inflamatorio, no hay consenso en la literatura sobre la naturaleza de los mediadores responsables de la inflamación inducida por el mismo (Rao *et al.*, 1993).

De acuerdo con las propiedades medicinales que se le atribuyen a *Phyllonoma laticuspis*, esperamos tener resultados positivos en cuanto a la inhibición del proceso inflamatorio al ser evaluada frente al modelo del TPA en oreja de ratón.

- **Bacterias:**

Las bacterias son organismos procariontes de vida libre, con una variedad de tamaños, formas y arreglos que ayudan a su identificación y clasificación (Lim, 1998).

De acuerdo a la estructura de la pared celular que presentan las bacterias pueden ser Gram negativas o Gram positivas (Ingraham *et al.*, 2000).

La clasificación Gram se debe a Christian Gram, que desarrolló en 1884, un tipo de tinción para distinguir a los diferentes grupos de bacterias, posteriormente se determinó que dicha clasificación se basa en la composición de la pared celular, es decir; las Gram negativas presentan una pared celular más delgada que contiene poco péptidoglicano (5-10 %) que le confiere forma a la pared bacteriana (Tortora *et al.*, 1998). Su membrana externa contiene en el interior una capa bilipídica compuesta principalmente de lipopolisacáridos (LPS); un 40 % de la superficie total de la célula está conformada por LPS y por fosfolípidos (Ingraham *et al.*, 2000).

En tanto que las Gram positivas cuya pared es relativamente gruesa, tiene un mayor contenido de péptidoglicano (20-28 %) de tal forma que al aplicar la tinción Gram la pared se tiñe de diferente manera, dando una coloración rosa o rojo a las llamadas Gram negativas (*Escherichia coli*) y violeta a las Gram positivas (*Bacillus subtilis*) (Tortora *et al.*, 1998).

Durante la decoloración con alcohol en tinción Gram, la capa gruesa de péptidoglicano en las bacterias Gram positivas se deshidrata; esta deshidratación causa que el complejo cristal violeta-iodina formado durante los pasos iniciales de la tinción Gram permanezca atrapado dentro de la célula: el resultado es una célula teñida de violeta (*Bacillus subtilis*) (Lim, 1998).

Por otro lado la capa delgada de péptidoglicano de las Gram negativas no retiene tan efectivamente el complejo cristal violeta-iodina durante la decoloración (Lim, 1998). Se ha sugerido que los lípidos de la pared celular son extraídos durante el paso de

decoloración, incrementando la permeabilidad de la pared, en ambos casos la célula Gram negativa la cuál no ha retenido la tinción primaria, es contrateñida con el colorante rojo safranina (*Escherichia coli*) (Lim, 1998).

Para realizar mejor el estudio e identificación rápida y precisa de los microorganismos, se efectúa su aislamiento en cultivos puros que se basan en el conocimiento de los requerimientos de crecimiento, los rasgos de crecimiento visibles (colonias), morfología microscópica, reacciones tintoriales, características bioquímicas, patogenicidad, etc. (Joklik *et al.*, 1986).

Por esta razón, se emplean técnicas de cultivo selectivo con el objeto de establecer un medio ambiente en el que el microorganismo patógeno tenga una ventaja de supervivencia, estos medios selectivos son de pH, fuerza iónica o composición química específicos, que contengan inhibidores, o que carezcan de nutrientes para todos los microorganismos, excepto el que se quiere estudiar (Joklik *et al.*, 1986).

El agar azul de metileno eosina de Levine (EMB) es un medio selectivo diferencial usado para distinguir entre los organismos fermentadores de lactosa y los no fermentadores de lactosa, contiene el colorante eosina y el azul de metileno, el cual inhibe a la mayoría de las bacterias Gram positivas.

Las bacterias que vigorosamente fermentan lactosa producen colonias con un característico color verde metálico brillante como *E. coli*, causado por la acumulación de eosina y azul de metileno en las colonias a pH ácido (Lim, 1998).

Escherichia coli: es una bacteria Gram negativa que habita en el ambiente y en el colon de mamíferos; causa enfermedades en el humano como diarrea e infecciones en el tracto urinario, es mesófila, es decir, prefiere las temperaturas moderadas creciendo favorablemente a temperaturas de 37 ° C, por ser un organismo anaeróbico facultativo puede desarrollarse en medios con la presencia o ausencia de O₂; tiene la habilidad de usar la lactosa (azúcar de la leche) para mantener su crecimiento, creciendo favorablemente en

medios nutritivos como el EMB formando colonias lisas de color verde metálico, es el organismo unicelular usado con mayor frecuencia en laboratorio debido a su rápido crecimiento en un simple medio nutritivo y a la vasta información que se tiene acerca del mismo es fácil de estudiar y aprender más sobre él (Ingraham *et al.*, 2000).

En un estudio realizado a veintinueve plantas medicinales de Trinidad y Tobago frente a seis tipos de bacterias, entre ellas *E. coli*, se obtuvieron resultados positivos al emplear el método de dilución por estría, ya que cinco de las especies de plantas presentaron un efecto inhibitor frente a *E. coli* (Chariandy *et al.*, 1999).

Bacillus subtilis: es una bacteria quimiolitotrófica que habita en el suelo, este tipo de bacterias necesitan de sustratos ricos en hidrógeno, azufre y nitrógeno (Joklik *et al.* 1986). Estos organismos pueden crecer en medios de cultivo complejos, hechos de extractos de materias naturales, carne, caseína, levaduras, etc., uno de los medios complejos específicos es el caldo nutritivo, probablemente el medio complejo más frecuentemente usado que cuando es solidificado con agar es llamado agar nutritivo, este medio mantiene el rápido crecimiento de la mayoría de los microorganismos (Ingraham *et al.*, 2000).

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva que bien puede crecer en agar nutritivo formando colonias rugosas de color blanquecino, sin embargo, al ser privada de nutrientes es capaz de formar endosporas en un lapso de 8 horas; la endospora es una estructura de protección resistente al estrés ambiental como calor, radiación ultravioleta, desinfectantes químicos, desecación, etc. (Murray *et al.*, 1999). *B. Subtilis* es una bacteria aeróbica, la temperatura óptima para su crecimiento es de 40 ° C; produce enfermedades en las vías respiratorias como neumonía, cáncer de pecho, infecciones ventriculares, etc (Murray *et al.*, 1999).

Antibióticos: los antibióticos o agentes terapéuticos tienen como propiedad fundamental la toxicidad selectiva ya que estos deben inhibir o destruir al patógeno sin dañar al huésped.

El quimioterapéutico ideal es aquel que tiene efecto bactericida más que bacteriostático; los agentes bactericidas dan muerte a los microorganismos contra los cuales se emplean, mientras que los agentes bacteriostáticos no matan pero previenen el crecimiento, es decir, ejercen solamente un efecto inhibitorio y se apoyan en el mecanismo de defensa celulares y humorales del huésped con objeto de obtener la erradicación final de la infección (Joklik *et al.*, 1986).

Algunas especies de *Bacillus* son de considerable importancia debido a que producen antibióticos como la bacitracina o la gramicidina (Prescott *et al.*, 1999).

Las sustancias naturales también pueden inhibir directamente el crecimiento microbiano en ambientes bajos en nutrientes. Esos agentes incluyen compuestos fenólicos, taninos, amonio, etileno, etc.; la presencia de tales compuestos pueden generar el fenómeno de bacteriostasis que afecta a las bacterias (Prescott *et al.*, 1999).

HIPÓTESIS

* Si en la comunidad Carrizal de Bravo el consumo de *Phyllonoma laticuspis* por medio de infusión se utiliza en la desinfección y cicatrización de heridas, entonces se esperaría que en las pruebas biológicas presenten actividad los extractos de mayor polaridad.

OBJETIVO GENERAL

* Realizar un análisis químico y biológico de la parte foliar de *Phyllonoma laticuspis* ("encamadora"), con la finalidad de evaluar las propiedades que se le confieren en la medicina tradicional en la localidad de Carrizal de Bravo, Guerrero.

OBJETIVOS PARTICULARES

* Conocer el hábitat en donde se desarrolla esta especie así como recolectar muestras y recopilar datos etnobotánicos con personas de la comunidad.

* Realizar extractos selectivos de hoja seca y molida de *Phyllonoma laticuspis*.

* Realizar pruebas antiinflamatorias de los extractos en base al modelo del TPA en oreja de ratón para determinar el potencial de los mismos ante una respuesta inflamatoria.

* Valorar la respuesta de los extractos frente a una bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis*, y una Gram negativa *Escherichia coli*.

* Evaluar el perfil de cada extracto por medio de cromatografía en capa fina probando eluyentes de diferentes polaridades.

* Llevar a cabo pruebas cromogénicas y de precipitación para determinar la presencia de grupos de metabolitos secundarios en los extractos.

* Fraccionamiento de los extractos obtenidos para la separación de compuestos.

* Contribuir al conocimiento que se tiene de *Phyllonoma laticuspis* para que exista un mejor aprovechamiento de este recurso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MÉTODO

- **Recolecta y procesado de la muestra:**

En la localidad Carrizal de Bravo en el estado de Guerrero, México, se realizó la recolecta del material botánico (ramas y hojas) de *Phyllonoma laticuspis*, éste se conservó en una prensa botánica con papel secante para favorecer la pérdida de agua y evitar la contaminación por parte de hongos; posteriormente se llevó a cabo el secado de la muestra durante 48 h en una cámara de desecación a 34 ° C.

Debido a que la hoja es la única parte de *Phyllonoma laticuspis* empleada en tratamientos medicinales en la localidad antes mencionada, se realizó la separación de hojas y ramas, se pesaron en una balanza analítica (OHAUS AS120) 322 g peso seco de hojas, enseguida se molieron para someterlos a extracción selectiva, extracción directa e infusión, y llevar a cabo las pruebas biológicas y químicas correspondientes (Diagrama I).

- **Extractos:**

Las extracciones selectivas se efectuaron con 300 g de hoja seca molida en una aparato de soxhlet empleando disolventes de diferente polaridad: hexano, AcOEt, MeOH y H₂O, tres veces durante ocho horas continuas (Diagrama II-V). El disolvente se eliminó al vacío en un rotaevaporador Büchi No. 137884, para obtener los extractos secos.

A 20 g de hoja seca molida se le realizó directamente una extracción acuosa, tres veces durante ocho horas continuas, en un aparato soxhlet. Por otro lado se obtuvo una infusión que se preparó siguiendo el método tradicional de la comunidad; a 250 ml de agua hirviendo se le adicionaron 2 gramos de hoja seca entera y se retiraron después de un período de tres minutos dentro de el agua (Diagrama V). En el caso de los extractos acuosos e infusión, el agua se eliminó en una liofilizadora Heto Type FD3 No. 467552-E, para obtener el extracto seco.

A cada uno de los extractos obtenidos se les realizaron pruebas biológicas para fraccionar en sus componentes a aquellos que presentaran actividad y evaluar a éstos en un análisis químico.

El fraccionamiento se realizó de la siguiente manera, de los extractos de AcOEt y MeOH se tomaron dos terceras partes del peso total del extracto para fraccionar por solubilidad. El extracto hexánico no se sometió a este proceso debido a que formaba un precipitado durante la extracción y enfriamiento. Debido a que el consumo tradicional de la encarnadora es a base de agua, a los extractos acuosos e infusión tampoco se les fraccionó.

En algunos casos se recrystalizó para obtener compuestos puros y a las muestras de consistencia sólida se les tomó el punto de fusión en un aparato Fisher-Johns.

Pese a que primero se obtuvieron los extractos y posteriormente las fracciones, en metodología y en resultados se reportaron juntos para una mejor visualización de datos.

- **Pruebas de solubilidad:**

Se efectuaron pruebas de solubilidad a los extractos y sus fracciones con disolventes de diversas polaridades iniciando de menor a mayor polaridad :hexano, AcOEt, MeOH, CHCl₃ y H₂O. Se probó la solubilidad de cada muestra a temperatura ambiente y en ebullición para conocer el disolvente que sería empleado en posteriores pruebas y obtener una completa disolución de la muestra.

- **Pruebas antiinflamatorias:**

En el Instituto de Química de la UNAM(1), se realizaron las pruebas antiinflamatorias siguiendo el modelo del TPA en oreja de ratón a todos los extractos obtenidos para conocer su respuesta ante la presencia de una inflamación.

Estas pruebas se hicieron en serie de cinco para cada extracto utilizando ratones machos albinos de la cepa CD-1, con pesos que oscilaban entre los 20 y los 25 g.

Los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico se disolvieron en DMSO al 10 % + Tween 80-Metilcelulosa al 40 % como vehículos en una proporción 1:3, mientras que los extractos acuosos selectivo y directo, e infusión fueron disueltos en agua.

La cantidad empleada por extracto fue de 31 mg / kg; como controles se usaron DMSO 14.63 mg / kg para los extractos orgánicos, y solución salina 14.43 mg / kg para los extractos a base de agua.

A los ratones anestesiados, se les suministró la muestra vía intraperitoneal, se esperó 30 minutos para que la absorción se llevara a cabo; posteriormente se aplicaron 10 µl de TPA + EtOH como vehículo distribuidos en la cara interna y externa de una de las orejas (oreja tratada), mientras que a la oreja contraria se le administraron 10 µl de EtOH (oreja control) distribuidos en ambas caras de la misma, en ambos casos se realizó vía tópica con la ayuda de una microjeringa.

La inflamación se presenta en un período aproximado de 4 h, pasado este tiempo los ratones fueron sacrificados por dislocación, enseguida se obtuvo la muestra de la oreja tratada y la oreja control con la ayuda de un sacabocados de 9 mm de diámetro, se tomó el peso de dichas porciones y por diferencia de peso se determinó la respuesta antiinflamatoria de los extractos.

El porcentaje de inhibición del edema se calculó con la ecuación:

% de Inhibición = $100 - (T / C \times 100)$ donde:

T g : Peso de la oreja tratada en gramos.

C g : Peso de la oreja control en gramos (García-Argáez *et al.*, 2000).

(1): Las pruebas antiinflamatorias fueron realizadas en el Instituto de Química de la UNAM por la M. en C. Teresa O. Ramírez Apan.

- **Pruebas antibacterianas:**

Los ensayos con bacterias se realizaron en la Facultad de Química de la UNAM(2); todo el procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar con instrumental, soluciones y medios nutritivos previamente esterilizados para evitar cualquier tipo de contaminación, además de realizar pruebas de esterilidad previas a la realización de los bioensayos.

Las cepas (*E. coli* ATCC 9202; *B. subtilis* ATCC 6633) fueron proporcionadas por el cepario de la Facultad de Química de la UNAM. Se tomó directamente una muestra para realizar tinciones Gram y observar morfología, Gram y pureza de las cepas; se empleó tinción de spora para *Bacillus subtilis* con la finalidad de conocer el estado en que se encontraba la cepa, las observaciones se llevaron a cabo en un microscopio óptico con un aumento de 100 x (Anexos 2-3, método de tinciones).

Se efectuaron siembras en tubo de ensayo con medio nutritivo inclinado en serie de tres para cada bacteria por el método de estría continua, utilizando medio selectivo EMB para *E. coli* y agar nutritivo para *B. subtilis*, se incubaron 24 h a 37 ° C (Anexo 4, preparación de medios).

El resultado de esta siembra fue observada de nuevo al microscopio para observar la pureza de la cepa. Se resembró nuevamente por el método de estría continua en tubos con medio inclinado en serie de cinco para cada bacteria, empleando para ambos casos agar nutritivo e incubando por 48 h a 37 ° C con el objeto de obtener la mayor biomasa posible.

Se resuspendieron las bacterias con 10 ml de solución salina al 0.85 %, se probaron diferentes diluciones para conocer la densidad de bacterias en la que se obtenía una mejor respuesta. Esto se realizó tomando lecturas de transmitancia (% T) en un espectrofotómetro modelo Spectronic 21 D hasta encontrar que, al 25 % T en una dilución óptima de 1:3.5 se tiene una densidad de bacterias presentes en el medio, que dan una respuesta efectiva y clara de inhibición.

Las pruebas antibacterianas se llevaron a cabo en 10 placas microbiológicas de 20 cm de ancho x 20 cm de largo y una altura de 5 cm con tapa, utilizando 640 ml de agar nutritivo por caja; estas pruebas se efectuaron a los extractos y sus fracciones, cada uno de los cuáles se impregnó en discos Schleicher and Schuell # 740-E tamaño ½ IN de papel filtro, de 7 mm de diámetro y capacidad de 25 µl aplicando las concentraciones siguientes para cada extracto y fracción: [0.5] mg, [1.0] mg, [1.5] mg, [2.0] mg y [2.5] mg.

Como controles se emplearon los disolventes: hexano, AcOEt, MeOH, CHCl₃ y H₂O de acuerdo con la solubilidad de cada muestra. Los discos se impregnaron con 25 µl de cada muestra 24 h antes de realizar los bioensayos para que se evaporara el disolvente almacenándolos en el interior de cajas petri cerradas. Cada control se colocó en el interior de la placa correspondiente.

Como control farmacéutico se utilizó ampicilina clave 1929, 500 mg Sector Salud, en diferentes concentraciones: [0.005] mg, [0.01] mg, [0.02] mg, [0.04] mg, [0.08] mg.

Se realizaron ensayos con las diferentes concentraciones de ampicilina en placas microbiológicas, haciendo un total de 10 pruebas para estandarizar la respuesta de inhibición. Se obtuvo un promedio por cada concentración y por falta de espacio sólo se colocó la concentración más baja y la más alta de ampicilina al llevar a cabo las pruebas antibacterianas con los extractos y fracciones. Las placas se incubaron 24 h a 37 ° C, las lecturas de los resultados se realizaron a las 24 h, 30 h y 36 h.

(2): Las pruebas bacterianas fueron realizadas en la Facultad de Química de la UNAM bajo la supervisión de la Q. F. B. Norma Trejo Medina.

- **Placas cromatográficas en capa fina:**

Para las pruebas en placa se pesaron 2 mg de cada extracto o fracción y se disolvieron de acuerdo a su solubilidad, en 0.5 ml de disolvente. De esta solución se tomó una muestra con capilar para realizar la aplicación sobre la placa cromatográfica (cromatoplasas de sílice MERCK 60 F254).

Se probaron diversos eluyentes de diferente polaridad hasta obtener aquel que nos diera una mejor resolución de las manchas.

Como revelador de las placas cromatográficas se empleó sulfato cérico y las observaciones se hicieron en una lámpara UV (cámara de luz ultravioleta Spectroline CX-20) debido a que la detección con radiación UV es un procedimiento rápido y preciso para visualizar las sustancias separadas (Bauer, 1991).

- **Pruebas cromogénicas en placa cromatográfica:**

Se desarrollaron pruebas cromogénicas en placas de cromatografía en capa fina a los extractos y a sus fracciones, estas pruebas fueron realizadas con la finalidad de caracterizar los grupos de metabolitos secundarios presentes. Se realizó una solución de 2 mg de muestra disuelta en 0.5 ml de disolvente, se tomó con un capilar parte de la solución y se aplicó en la placa para llevar a cabo el corrimiento de la misma con el eluyente correspondiente, revelando cada una de ellas con los siguientes reveladores: Dragendorff para detección de alcaloides, FeCl_3 para fenoles, Liebermann-Burchard para esteroides, anisaldehído para azúcares, esteroides y terpenos, ZnCl_2 para sapogeninas y esteroides, AlCl_3 para flavonoides (Anexo 1, reveladores).

Las placas después de ser impregnadas por el revelador, se sometieron a calor en una plancha térmica Sybron / Thermolyne Type 1900 model HP-A1915B; observando como respuesta positiva fluorescencia bajo luz UV a 365 nm o dando un aspecto colorido a la muestra para evidenciar la presencia del grupo químico correspondiente.

- **Pruebas cromogénica y de precipitación en tubo de ensayo:**

Se realizaron pruebas en tubo, empleando para cada una 5 mg de muestra disuelta en 1 ml de disolvente. Los disolventes que se utilizaron fueron de acuerdo con la solubilidad de cada extracto o fracción, a excepción de aquellos que en su reactivo requirieran de HCl, para estos se utilizó como disolvente HCl diluido.

Los ensayos realizados fueron para detectar: glicósidos, alcaloides, flavonoides, terpenos, fenoles y taninos empleando los siguientes reactivos: Mólisch para la detección de glicósidos, Zn / HCl para flavonoides, FeCl₃ para fenoles, gelatina sal para prueba cualitativa de taninos (fenoles) y Liebermann-Burchard para terpenos; para la prueba de alcaloides se empleó Dragendorff y ácido silicotúngstico (Anexo 1, reactivos).

Diagrama I. Diagrama de flujo para el análisis biológico y químico de la lámina foliar de *Phyllonoma laticuspis*

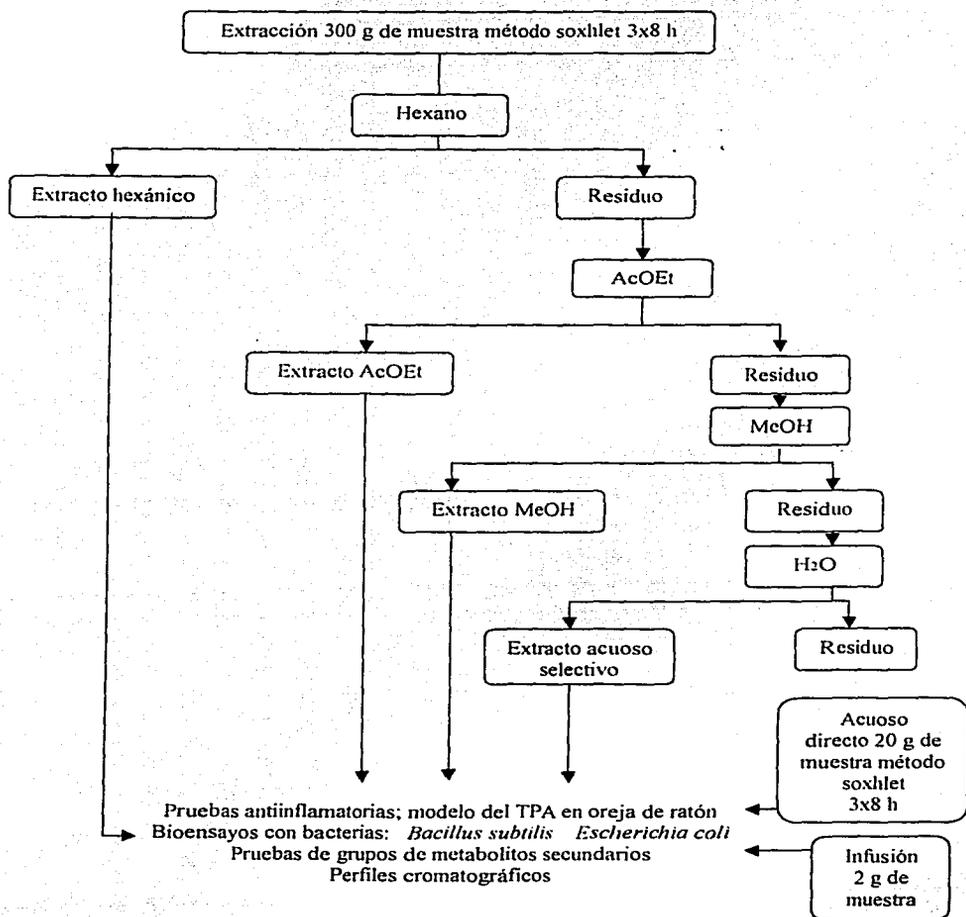


Diagrama II. Extracto Hexánico

Pp: Precipitado

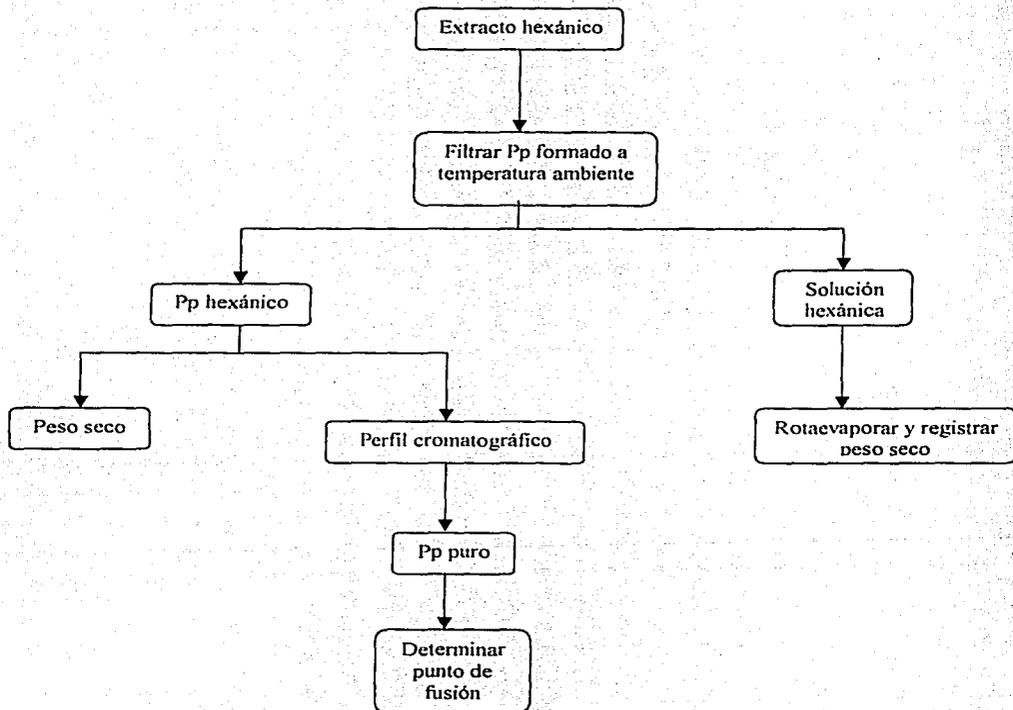


Diagrama III. Extracto de acetato de etilo

Pp: Precipitado
A M.: Aguas madres

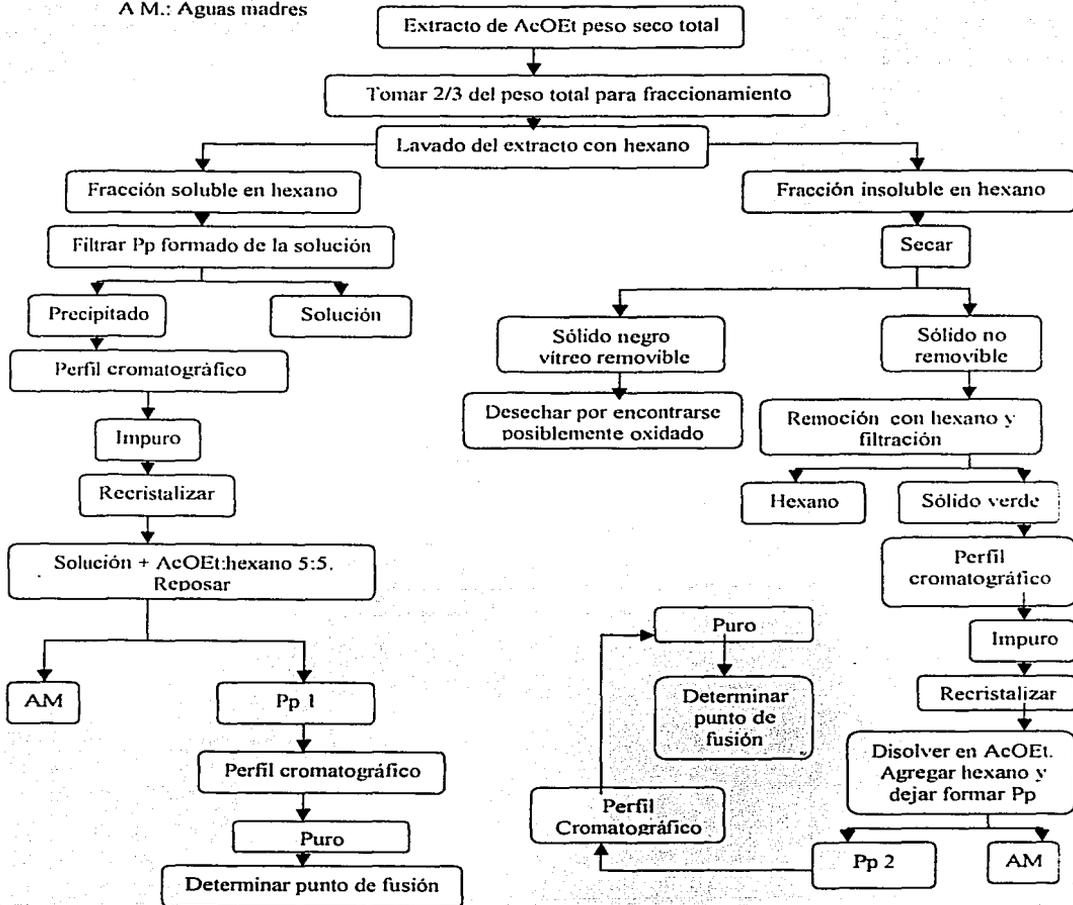


Diagrama IV. Extracto metanólico

Pp: Precipitado

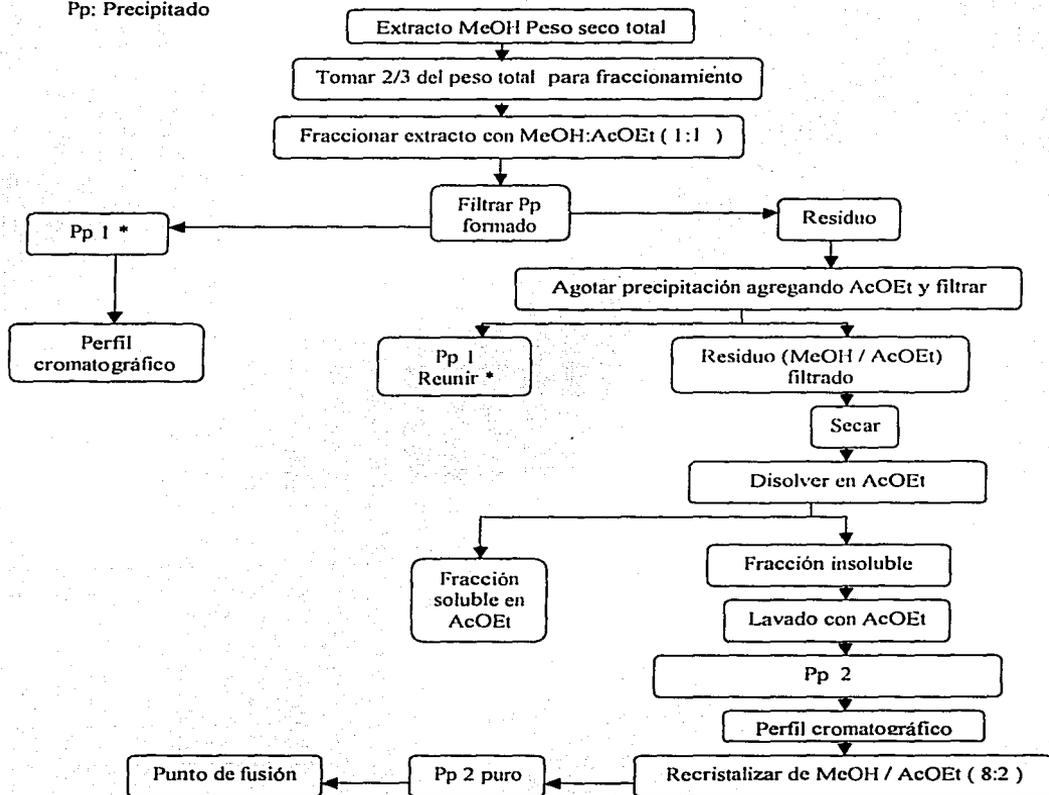
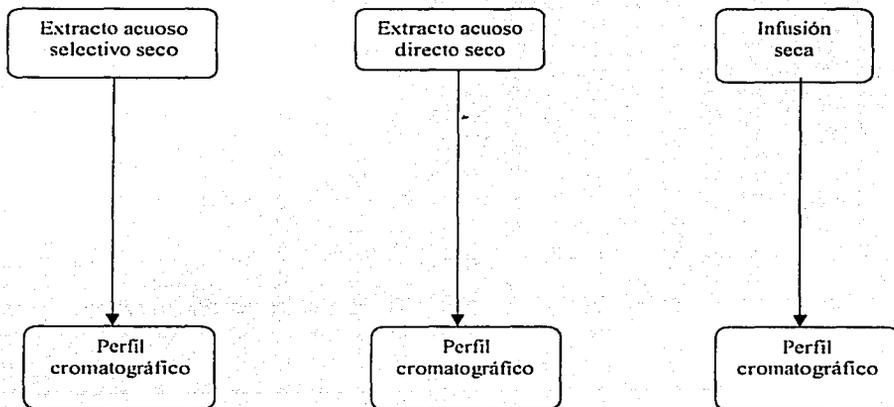


Diagrama V. Extracto acuoso selectivo, directo e infusión



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo se dividió en dos partes, la primera tuvo por objeto la preparación de extractos y el análisis de su actividad antiinflamatoria y antibacteriana, propiedades que ayudan en la cicatrización de heridas al desinflamar la zona y mantenerla libre de gérmenes. La segunda parte se orientó al análisis preliminar de los extractos realizando la separación de sus productos en base a su solubilidad.

- **Extractos:**

Para el extracto hexánico se obtuvo la fracción soluble en hexano con un perfil cromatográfico que reveló siete manchas en capa fina empleando como eluyente hex:AcOEt 6:4 y como revelador sulfato cérico, además de un precipitado color beige que se formó desde el momento de la extracción hasta el enfriamiento del extracto, tuvo una apariencia de polvo fino y un punto de fusión de 219-220 ° C. En placa fina reveló una sola mancha utilizando de eluyente hex:AcOEt 5:5 y sulfato cérico como revelador.

Del fraccionamiento del extracto de AcOEt, se obtuvieron dos precipitados: el Pp 1 del lavado con AcOEt y hexano de grano mediano, con un punto de fusión de 228-230 ° C que reveló una sola mancha en capa delgada y el Pp 2 de grano fino con punto de fusión de 140 ° C y una mancha en placa fina después de recristalizar, además de una parte soluble en hexano con cuatro manchas y el residuo del extracto de AcOEt con dos manchas. Las muestras se corrieron con eluyente hex:AcOEt 5:5 y se revelaron con sulfato cérico.

Del fraccionamiento del extracto metanólico se obtuvieron dos precipitados: el Pp 1 del lavado con MeOH:AcOEt 1:1 un polvo fino que no fundió hasta llegar a la temperatura máxima de 290 ° C y que en placa delgada presenta cinco manchas al eluir con BuOH:acético:H₂O 5:1:4 y revelar con sulfato cérico, el Pp 2 del lavado con AcOEt de consistencia sólida fina, altamente higroscópico que funde a 90-94 ° C y que en placa delgada muestra dos manchas, además de una parte soluble en AcOEt que revela una mancha y el residuo del extracto MeOH que presentó dos manchas en perfil cromatográfico

para estos últimos se empleó MeOH:AcOEt 6:4 como eluyente y sulfato cérico como revelador.

Por otro lado, los extractos acuosos selectivo y directo de color caramelo, presentaron una consistencia sólida, de grano grueso poroso. En perfil cromatográfico se corrieron con BuOH:acético:H₂O 5:1:4 revelando 3 y 4 manchas respectivamente.

De la infusión se obtuvo un grano fino de color amarillo-verdoso, que en placa reveló tres manchas, el eluyente utilizado fue BuOH:acético:H₂O 5:1:4.

La tabla I muestra los pesos secos de los extractos antes de su fraccionamiento a excepción del extracto hexánico que fue pesado después de la formación de su Pp. De los extractos selectivos, el extracto hexánico fue el que menor peso presentó 3.2616 g, el extracto metanólico registró el mayor peso con 41.9689 g, por lo que es en esta polaridad a donde se extrae un mayor número de compuestos. Este mismo resultado se refleja en la tabla II que indica los pesos de las fracciones obtenidas para los extractos selectivos.

Los extractos de AcOEt y MeOH formaron dos precipitados al ser fraccionados, a el hexánico no se le realizó fraccionamiento ya que formaba un precipitado desde el proceso de extracción hasta el enfriamiento.

Tabla I. Peso de los extractos realizados a la lámina foliar de *Phyllonoma laticuspis*.

E X T R A C T O S	PESO (g)
Hexano	3.2616
AcOEt	6.0638
MeOH	41.9689
Acuosos selectivo	26.2493
Acuoso directo	4.7152
Infusión	0.25

Nota: El extracto hexánico se fracciona desde el proceso de extracción formando un Pp, por lo que su peso se registró después de formado el mismo.

Tabla II. Peso de las fracciones derivadas del fraccionamiento de los extractos selectivos de hoja de *Phyllonoma laticuspis*.

FRACCIÓN DEL EXTRACTO HEXÁNICO	PESO (g)
Pp	0.2803
FRACCIONES DEL EXTRACTO DE AcOEt	
Pp 1	1.2
Pp 2	1.2864
Residuo del extracto de AcOEt	0.7
FRACCIONES DEL EXTRACTO METANÓLICO	
Pp 1	7.2871
Pp 2	14.355
Residuo del extracto de MeOH	6.3371

• **Pruebas de solubilidad:**

El primer paso para efectuar el análisis de los extractos fue determinar su solubilidad. La tabla III indica los diferentes disolventes que se probaron para los extractos y fracciones así como la solubilidad que presentaron a temperatura ambiente y ebullición. Los asteriscos indican el disolvente ideal, mismo que fue empleado en todas las pruebas realizadas a excepción de las antiinflamatorias en donde se utilizaron disolventes específicos mencionados en el apartado del método de las mismas.

Tabla III. Pruebas de solubilidad de los extractos y fracciones.

Extractos y fracciones	Hexano		AcOEt		MeOH		EtOH		CHCl ₃		H ₂ O	
	Ta	E	Ta	E	Ta	E	Ta	E	Ta	E	Ta	E
Pp hexánico	-	-	-	-	-	-	-	++	*	++	-	-
Ext. de Hexano	++	+++	+	+++	-	-	-	++	*	+++	+	-
Pp 1 de AcOEt	-	-	-	+	-	-	-	++	*	+++	-	-
Pp 2 de AcOEt	-	-	+	+++	-+	-	++	++	*	++	-	-
Ext. de AcOEt	-	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pp 1 de MeOH	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	*	+++
Pp 2 de MeOH	-	+	-	-	*	+++	+	++	-	-	++	++
Ext. de MeOH	+	+	+++	+++	*	-	-	+	+++	+++	-	-
Acuoso selectivo	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	*	+++
Acuoso directo	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	*	+++

Ta: Temperatura ambiente

E: Ebullición

-: Insoluble

+: Escasamente soluble

++: Soluble

+++ : Muy soluble

- **Pruebas antiinflamatorias:**

En ratones de la cepa CD-1 proporcionada por el Instituto de Química de la UNAM, se hicieron las pruebas antiinflamatorias midiendo el porcentaje de inhibición del edema causado en la oreja por administración del TPA. Las pruebas se llevaron a cabo con los extractos orgánicos enteros y el extracto acuoso preparado en tres formas diferentes para ver la influencia de éstas sobre la extracción de compuestos: la extracción selectiva, que finalizó con el extracto acuoso, un segundo extracto realizado directamente sobre la planta y la infusión, preparada del mismo modo en que lo hacen en la comunidad estudiada.

La tabla IV indica el porcentaje de inhibición del edema inducido con TPA en oreja de ratón; el porcentaje de inhibición de cada extracto esta dado en relación a los controles empleados (ver pie de tabla).

Los extractos que mostraron una mayor respuesta ante la presencia de un edema fueron los de metanol y acetato con 29.18 % y 25.64 % respectivamente por lo que en estos extractos probablemente el compuesto activo contra el edema se encuentra en mayor concentración.

En cuanto a los extractos acuosos, la infusión presentó mayor actividad en la inhibición del edema. El extracto acuoso directo al parecer incrementa la inflamación, posiblemente en este método de extracción se extrae un compuesto que favorece la inflamación incrementándola.

Tabla IV. Actividad antiinflamatoria de los extractos de hoja de *Phyllonoma laticuspis*.

EXTRACTO (31 mg / Kg)	Porcentaje de inhibición del edema (%)
Hexano*	17.00
AcOEt*	25.64
MeOH*	29.18
Acuoso selectivo**	0.82
Acuoso directo**	-1.80
Infusión**	9.45

Controles:

* : DMSO

** : Solución salina

El mejor resultado se obtuvo con el extracto metanólico y de los acuosos, con la infusión.

- **Pruebas antibacterianas:**

Las pruebas antibacterianas se realizaron a los extractos enteros y a sus fracciones frente a dos tipos de bacterias, una Gram negativa (*Escherichia coli*) y una Gram positiva (*Bacillus subtilis*). Los resultados observados se registraron a las 24 h ya que a las 30 y 36 h no se presentaron cambios en el máximo de inhibición observada.

Los extractos de AcOEt y MeOH así como sus fracciones fueron los que presentaron mayor actividad frente a *B. Subtilis*, ya que los extractos acuosos selectivo y directo, no dieron respuesta. Por otro lado, la infusión sí mostró propiedades antibacterianas con los dos tipos de bacterias, siendo la única en presentar actividad frente a *E. coli* a partir de altas concentraciones (tablas V y VI), esto nos hace suponer que en los métodos de extracción utilizados para los extractos acuosos selectivo y directo no se extrae algún compuesto que evidentemente sí se extrae por el método de infusión, o quizás se encuentre en menor proporción que en la infusión, de ahí que ésta sea activa al probar frente a los dos tipos de bacterias.

La nula respuesta de algunos extractos y fracciones en las pruebas antibacterianas puede deberse a que la concentración en que se encontraban era baja, o los compuestos con potencial antibacteriano no se encuentran presentes en estos.

***Escherichia coli:**

La tabla siguiente indica que sólo la infusión presentó actividad frente a *E. coli* de tipo bacteriostática a concentraciones altas.

Tabla V. Pruebas antibacterianas *E. coli* (lectura a las 24:00 h)

EXTRACTO	FRACCIÓN	Miligramos (mg)				
		[0.5]	[1.0]	[1.5]	[2.0]	[2.5]
Hexánico	Extracto	-	-	-	-	-
	Pp Hexánico	-	-	-	-	-
AcOEt	Pp1	-	-	-	-	-
	Pp 2	-	-	-	-	-
	Extracto entero	-	-	-	-	-
MeOH	Pp1	-	-	-	-	-
	Pp2	-	-	-	-	-
	Extracto fraccionado	-	-	-	-	-
	Extracto entero	-	-	-	-	-
Acuoso	Selectivo	-	-	-	-	-
	Directo	-	-	-	-	-
Infusión	Infusión	-	-	-	BT 7	BT 10

-: Sin respuesta

BT: Bacteriostático

Los números representan el tamaño que presentó el halo de inhibición en milímetros de diámetro.

****Bacillus subtilis*:**

La siguiente tabla indica que los extractos con mayor acción bactericida fueron los de AcOEt y MeOH, el Pp 2 de MeOH sólo presenta actividad bacteriostática a altas concentraciones. La infusión actúa como bacteriostática en casi todas sus concentraciones y a la concentración de 1.5 mg presenta una repuesta equivalente a una concentración de 0.005 mg de ampicilina.

Tabla VI. Pruebas antibacterianas *B. subtilis* (lectura a las 24:00 h)

EXTRACTO	FRACCIÓN	Miligramos (mg)				
		[0.5]	[1.0]	[1.5]	[2.0]	[2.5]
Hexánico	Extracto	-	-	-	-	-
	Pp	-	-	-	-	-
AcOEt	Pp 1	-	B	B	B	-
	Pp 2	-	B	B	B	B
	Extracto Entero	B	B	B	B	B
MeOH	Pp1	-	B	B	B	B
	Pp 2	-	B	B	10	10
	Extracto fraccionado	-	B	B	B	B
	Extracto entero	-	B	B	B	B
Acuoso	Selectivo	-	-	-	-	-
	Directo	-	-	-	-	-
Infusión	Infusión	-	BT	BT	BT	BT

B: Bactericida

BT: Bacteriostático

-: Sin respuesta

Los números representan el tamaño que presentó cada halo de inhibición, en milímetros de diámetro.

***Ampicilina:**

La tabla VII indica la respuesta que tuvo la ampicilina en sus diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*; así como el promedio obtenido por cada concentración.

Tabla VII. Concentraciones de ampicilina

Número de Placa	Ampicilina (mg)									
	[0.005]	[0.005]	[0.01]	[0.01]	[0.02]	[0.02]	[0.04]	[0.04]	[0.08]	[0.08]
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
1	13	13	18	17	18	19	22	21	37	30
2	13	14	18	17	18	17	22	21	37	35
3	17	14	17	18	17	17	20	22	27	20
4	7	17	24	15	21	20	20	21	20	37
5	7	15	9	18	21	19	19	20	20	36
6	13	17	9	16	9	19	18	22	9	25
7	16	13	15	17	17	20	20	21	30	30
8	15	15	12	16	17	18	21	20	35	20
9	16	15	17	17	20	18	21	22	30	25
10	17	13	17	18	18	18	20	20	20	25
$\bar{X} =$	13.4	14.6	15.6	16.9	17.6	18.5	20.3	21.0	26.5	28.3

Los números de las 10 placas representan el diámetro que presentó cada halo de inhibición en milímetros.

\bar{X} = Promedio de el diámetro de los halos de inhibición por concentración en milímetros.

- **Perfiles cromatográficos en capa fina:**

Las pruebas en placa realizadas a los extractos, para conocer el número aproximado de sus componentes, y a sus fracciones para analizar su pureza mostraron los siguientes perfiles cromatográficos: Para el extracto hexánico se empleó como eluyente hex:AcOEt en una proporción 6:4 y como revelador sulfato cérico revelando 7 manchas discernibles de color café (Figura 1).



Fig.1. Perfil cromatográfico del extracto hexánico de la lámina foliar de *Phyllonoma laticuspis*.

Para el precipitado hexánico el eluyente fue hex:AcOEt 5:5, reveló una sola mancha de color fucsia con sulfato cérico (Figura 2), con un R_f de 0.70 que se obtuvo al sustituir en la ecuación:

$$R_f = b / a \text{ donde:}$$

R_f : Valor relativo al frente

b: Distancia de migración de la sustancia

a: Distancia de migración de el frente del solvente



Fig.2. Perfil cromatográfico del Pp hexánico al emplear hex:AcOEt 5:5 como eluyente y sulfato cérico como revelador.

Se realizó una placa comparativa entre el precipitado hexánico (a) y el β -sitosterol (b) este último proporcionado por el mismo laboratorio, debido a que este compuesto presentaba características similares a las del Pp hexánico. Con este perfil se comprobó que ambas muestras son diferentes ya que a pesar de que ambos presentaron una sola mancha, el Pp hexánico mostró color fucsia y un Rf de 0.70, el β -sitosterol presentó un color rojizo oscuro y un Rf de 0.64, como eluyente se utilizó hex:AcOEt en una proporción 5:5 y como revelador sulfato cérico (Figura 3).

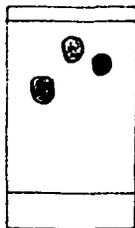


a b

Fig.3. Placa comparativa entre a, Pp hexánico y b, β -sitosterol.

Se realizó una placa comparativa del Pp hexánico y lupeol, un compuesto que se tenía en el laboratorio, ya que su punto de fusión era similar (Pp hexánico= 219-220 ° C, Lupeol= 215 ° C), se aplicó nuevamente β -sitosterol para asegurar el corrimiento del compuesto en la placa debido a que su corrimiento era similar al del Pp hexánico. El eluyente fue hex:AcOEt 5:5 y el revelador Liebermann-Burchard obteniendo una mancha fucsia para el Pp hexánico y Rf de 0.61, café claro para el lupeol y Rf de 0.83, y café oscuro para el β -sitosterol con un Rf de 0.69, por lo que se comprobó que no se trataba del mismo compuesto (Figura 4).

- a: Pp hexánico
- b: lupeol
- c: β -sitosterol



a b c

Fig.4. Perfil comparativo entre Pp hexánico, lupeol y β -sitosterol al revelar con Liebermann-Burchard.

Se realizaron placas cromatográficas para el extracto de AcOEt entero (Figura 5), de AcOEt fraccionado (Figura 6) así como a el Pp1 y Pp 2 del mismo (Figuras 7- 8), después de recrystalizar. El corrimiento se realizó con el eluyente hex:AcOEt 5:5 y se reveló con sulfato cérico.

Los resultados observados para la primera placa fueron, tres manchas de color café (Figura 5). Para la placa del extracto fraccionado todas las muestras revelaron una mancha color fucsia a excepción del lavado hexánico que presentaba cuatro manchas color verde; el residuo del extracto además, reveló una mancha morada cerca del frente (Figura 6). Los Pp 1 y Pp 2 después de recrystalizar revelaron una mancha color café (Figura 7 y 8).

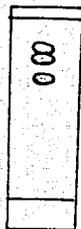
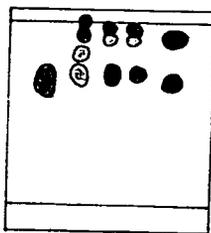


Fig.5. Perfil cromatográfico del extracto de AcOEt entero de la lámina foliar de *Phyllonoma laticuspis*.



- a: Pp 1
- b: lavado hexánico
- c: sólido negro vítreo
- d: Pp 2
- e: residuo del extracto

a b c d e

Fig.6. Cromatoplaca de las fracciones del extracto de AcOEt empleando como eluyente hex:AcOEt 5:5 y sulfato cérico como revelador.



Fig.7. Perfil cromatográfico del Pp 1 recristalizado del extracto de AcOEt.

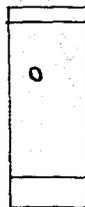


Fig.8. Perfil cromatográfico del Pp 2 recristalizado del extracto de AcOEt.

En cuanto al extracto de MeOH, se corrieron las placas del extracto entero (Figura 9) y fraccionado (Figura 10), se utilizó como eluyente MeOH:AcOEt en una proporción 6:4. Posteriormente para el Pp 1 se requirió una mezcla de BuOH:acético:H₂O 5:1:4 debido a que parte de la muestra permanecía en el punto de aplicación de la placa; de esta manera se obtuvo una mayor resolución de manchas (Figura 11). Los perfiles mostraron los siguientes resultados: el extracto entero presentó tres manchas color café. Después del fraccionamiento del extracto se observó para el Pp 1 solo una mancha color café claro, el lavado de AcOEt mostró una pequeña mancha café cerca del frente, mientras que el Pp 2 y el residuo del extracto revelaron 2 manchas del mismo color. El perfil realizado al Pp 1 con BuOH:acético:H₂O 5:1:4 reveló cinco manchas café claro.

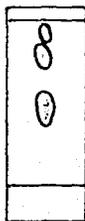
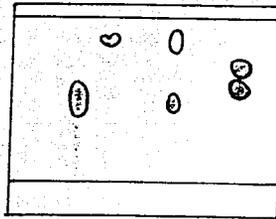


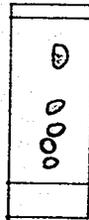
Fig.9. Extracto de MeOH entero de la lámina foliar de *Phyllonoma laticuspis*.



a b c d

- a: Pp 1
- b: lavado de AcOEt
- c: Pp2
- d: residuo del extracto

Fig.10. Perfil cromatográfico de las fracciones del extracto MeOH.

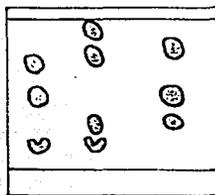


Pp 1

Fig.11. Perfil cromatográfico del Pp 1 del extracto MeOH empleando BuOH:acético:H₂O 5:1:4 como eluyente.

Los extractos acuosos, selectivo y directo, e infusión se corrieron simultáneamente en una placa comparativa. Debido a la polaridad de estas muestras se empleó como eluyente BuOH:acético:H₂O en una proporción 5:1:4.

En esta placa se observó que, todas las muestras revelaron manchas de la misma tonalidad café claro. El extracto acuoso directo fue el que mostró un mayor número de manchas, cuatro en total, a comparación del extracto acuoso selectivo e infusión que solo presentaron tres coincidiendo en desplazamiento en estas muestras la segunda mancha del origen al frente con un Rf de 0.50 y 0.51 para el selectivo y la infusión respectivamente, evidenciando un compuesto que solo se extrae por medio de estos dos procesos; también se observaron dos manchas de corrimiento similar, la segunda del extracto directo y la primera de la infusión, con un Rf de 0.34 y 0.32 respectivamente por lo que probablemente sea el mismo compuesto, además de revelar una mancha irregular que corre a igual distancia en los extractos selectivo y directo cerca del punto de aplicación con Rf de 0.18 para ambas manchas, por lo que se trata del mismo compuesto. También se observó una tercer mancha más polar en el extracto directo con un Rf de 0.76 e infusión con un Rf de 0.80 (Figura 12).



a b c

a: extracto acuoso selectivo

b: extracto acuoso directo

c: infusión

Fig.12. Placa cromatográfica de los extractos acuosos e infusión de la lámina foliar de *Phyllonoma laticuspis*.

Cada uno de los extractos orgánicos obtenidos muestra un perfil diferente en sus compuestos, mientras que los extractos acuosos presentan gran similitud con respecto a el Rf de algunas de sus manchas.

Del fraccionamiento de los extractos se obtuvieron, para el hexánico, un compuesto de apariencia pura (1 mancha en placa), para el de AcOEt dos compuestos que recristalizados dan una sola mancha y para el MeOH dos compuestos que no mostraron pureza debido a que revelan varias manchas y uno de ellos no funde.

- **Pruebas cromogénicas en placa cromatográfica y en tubo de ensayo:**

Para conocer los grupos de metabolitos secundarios que se encontraban en los extractos se realizaron pruebas cromogénicas, tanto en placa cromatográfica como en tubo de ensayo, y de precipitación para alcaloides. La gran mayoría de las muestras, dieron una respuesta positiva al aplicar los siguientes reveladores: Liebermann-Burchard, anisaldehído, cloruro férrico y cloruro de zinc fluoresciendo al ser observados bajo una lámpara UV a 365 nm en el caso de las placas; mientras que la respuesta fue negativa para flavonoides y alcaloides tanto en placa como en tubo (Tabla VIII-IX).

Tabla VIII. Pruebas cromogénicas en placa fina

EXTRACTO	FRACCION	Liebermann-Burchard	Dragendorff	Anisaldehído/Sulfúrico	AlCl ₃	FeCl ₃	ZnCl ₂
		Esteroides, triterpenos y sus glicósidos	Alcaloides y compuestos nitrogenados	Azúcares, esteroides, terpenos y fenoles	Flavonoides	fenoles	Sapogeninas y esteroides
Hexánico	Pp hexánico	+		+			+
	Extracto	+ 7 mancha		+ manchas 5, 6, 7		+	+ mancha 4
AcOEt	Pp 1	+		+			+
	Pp 2	+ manchas 1, 2, 3	-	+ manchas 2, 3	-	+ manchas 2, 3	+ mancha 2
	Sólido negro vítreo	+ manchas 1, 2, 3	-	+ manchas 2, 3	-	+ manchas 2, 3	+ mancha 2
	Lavado hexánico	+ manchas 3, 4, 5	-	+ manchas 4, 5	-	+ manchas 4, 5	+ mancha 5
	Residuo del extracto de AcOEt	+ manchas 1-5	-	+ manchas 2, 3	-	+ manchas 2, 3	+ mancha 2
MeOH	Pp 1	+ manchas 3, 4, 5	-	+ mancha 4	-	+	+ manchas 4, 5
	Pp 2	+		+		+	
	Lavado de AcOEt	+ manchas 1, 2, 3 *	-	+	-	+	+ manchas 1-4 *
	Residuo del extracto de MeOH	+	-	+	-	+	-
Acuoso	Extracto Selectivo	+	-	+	-	-	-
	Extracto Directo	+	-	+	-	-	-

+: Prueba positiva ; si no presenta número significa que fue mancha única

-: Prueba negativa

1: Mancha que aparece como única en sulfato cérico, la siguiente numeración indica manchas adicionales que aparecen de acuerdo al revelador.

2: Mancha adicional que recorrió la numeración.

*: Manchas que no se revelan en sulfato cérico pero que aparecen con el revelador empleado.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Tabla IX. Pruebas cromogénicas en tubo de ensayo

EXTRACTO	FRACCIÓN	Mölish	Dragendorff	Ácido silicotúngstico	Zn/HCl	FeCl ₃	Gelatina-sal Taninos	Liebermann-Burchard
		glicósidos	alcaloides	alcaloides	flavonoides	fenoles	fenoles	terpenos
Hexánico	Pp hexánico	+	-	-	-	-	-	+
	Extracto	+	-	-	-	+	+	+
AcOEt	Pp 1	+	-	-	-	-	-	+
	Pp 2	+	-	-	-	++	+-	++
	Sólido negro vítreo	+	-	-	-	++	+-	++
	Lavado hexánico	+	-	-	-	+	+	+
	Residuo del extracto de AcOEt	+	-	-	-	+	+	+
MeOH	Pp 1	+++	-	-	-	+++	-	+
	Pp 2	+++	-	-	-	++++	+	+
	Lavado de AcOEt	+	-	-	-	++	-	+++
	Residuo del extracto de MeOH	+	-	-	-	++	+	+
Acuoso	Extracto selectivo	+	-	-	-	-	-	+
	Extracto directo	++	-	-	-	-	-	+

+: Prueba positiva

: Prueba negativa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

En esta investigación se obtuvieron seis extractos a partir de la lámina foliar de *Phyllonoma laticuspis*, el extracto hexánico, el de AcOEt, el de MeOH así como los extractos acuosos selectivo y directo, e infusión; registrándose una actividad elevada en los de mayor polaridad.

Los extractos orgánicos se pudieron fraccionar en base a su solubilidad evidenciando que, aquellos de mayor polaridad presentan un elevado número de componentes.

En cuanto a las pruebas antiinflamatorias el extracto con mayor actividad en la inhibición del edema fue el metanólico con un 29%, el extracto de AcOEt y hexánico con 25.64% y 17% respectivamente. El extracto acuoso directo no mostró acción antiinflamatoria debido a que el porcentaje de inhibición del edema fue de -1.80%; esto nos hace suponer que este extracto tiene una actividad que favorece el edema incrementándolo; respecto a la infusión, se detecta una respuesta elevada, considerando el método empleado para su elaboración.

En las pruebas bacterianas frente a *Bacillus subtilis*, los extractos de AcOEt, MeOH y sus fracciones presentaron una respuesta bactericida a partir de la concentración óptima de 1 mg, encontrándose un halo de inhibición mayor en el extracto MeOH entero con concentración de 1.5 mg. La infusión tuvo una actividad bacteriostática a una concentración de 1 mg y un halo de inhibición mayor al del extracto MeOH en la concentración de 1.5 mg.

Por otro lado, en las pruebas realizadas frente a *Escherichia coli* la única muestra en presentar actividad fue la infusión que mostró una actividad de tipo bacteriostático, observándose que la concentración óptima es de 2.0 mg.

Comparando los resultados obtenidos en la placa cromatográfica de los extractos acuosos e infusión y las pruebas biológicas, suponemos que: uno de los compuestos antiinflamatorios se presenta tanto en la infusión como en el extracto acuoso selectivo ($R_f = 0.51$ y $R_f = 0.50$ respectivamente) ya que ambos mostraron respuesta frente a estas pruebas; dicho compuesto no se detecta en el extracto acuoso directo, encontrándose en éste además, dos manchas cercanas al frente con $R_f = 0.76$ y 0.88 del origen al frente. Respecto al efecto antibacteriano posiblemente se relacione con la tercer mancha presente en la infusión con un $R_f = 0.80$ debido a que, la infusión fue la que presentó una mayor respuesta frente a los dos tipos de bacterias.

La caracterización de los grupos de metabolitos secundarios presentes en la lámina foliar, evidenció que los extractos presentaban glicósidos, fenoles y terpenos. De acuerdo con los resultados observados en las pruebas cromogénicas en placa y en tubo, los extractos que mostraron un mayor número de grupos de metabolitos secundarios fueron los extractos de AcOEt y MeOH.

Los extractos acuosos al ser sometidos a las pruebas cromogénicas en placa y en tubo sólo resultaron positivos para glicósidos, esto puede deberse a que la hoja de esta especie se compone en su gran mayoría de este tipo de compuestos y por lo tanto en dichas pruebas predominó solo este grupo químico.

Cabe mencionar que los extractos presentaron una mayor actividad enteros, esto nos permite establecer que, pese a que las fracciones pueden ser efectivas por sí solas su acción puede verse afectada al encontrarse aisladas de algún otro componente que les permite tener un mayor potencial activo. Por lo tanto es importante que exista una sinergia entre las sustancias que integran a una planta medicinal para que el efecto sea mayor.

El estudio químico y biológico realizado a los extractos de la lámina foliar de *Phyllonoma laticuspis* permitió evaluar las propiedades medicinales que se le atribuyen y demostrar que esta especie presenta propiedades farmacológicas que validan su uso tradicional.

Este análisis contribuye al conocimiento de los constituyentes químicos que se tienen sobre *Phyllonoma laticuspis* y a la actividad biológica de la misma con el propósito de aprovechar mejor este recurso, tener un control sobre el mismo y promover la investigación sobre la reproducción de esta especie ya que su población se ha visto disminuida en el área de estudio ya que para la población representa una fuente más de ingresos y la recolecta de la misma se realiza sin ningún control.

Hay que recordar que *Phyllonoma laticuspis* se encuentra ubicada dentro de una familia monogenérica con sólo cuatro especies donde tres de ellas se consideran en peligro de extinción.

Anexo I

Preparación de reveladores y reactivos

- **Reveladores:**

- **Sulfato cérico:**

350 g de hielo

40 ml ácido sulfúrico (H_2SO_4)

14 g sulfato cérico Ce (SO_4)₂

Mezclar el ácido sulfúrico y el sulfato cérico lentamente en un baño de hielo.

Someter la placa a un calentamiento de 50 ° C en una plancha térmica después de rociar sobre ellas el revelador, las placas reveladas se observan en una lámpara de UV en longitudes de onda larga (365 nm) y onda corta (254 nm) (Ashworth, 1969).

- **Dragendorff (alcaloides):**

Solución a):

20 ml de H_2O

5 g de ácido tartárico

0.44 g de nitrato de bismuto básico

Solución b):

8 g KI / 20 ml H_2O

27.2 g de KI / 50 ml H_2O

Mezclar las dos soluciones y dejar reposar por 24 horas; esta mezcla puede durar en

refrigeración por varios meses. Como revelador se utiliza rociando con aspersor sobre la placa cromatográfica y se somete a calor hasta obtener coloración en las manchas.

Para pruebas de precipitación, se usa sobre soluciones aciduladas, se forma un precipitado anaranjado-marrón como reacción positiva al añadir dos gotas a la muestra deseada. Las soluciones de varios ácidos de metales pesados, como el silicotúngstico al igual que el yoduro de bismuto (Dragendorff) forman precipitados en la mayoría de los alcaloides (Dominguez, 1973).

* Cloruro férrico (fenoles):

Cloruro férrico etanólico al 5 %

Rociar la placa con un aspersor, dejar secar ligeramente el revelador, calentar la placa (Ashworth, 1969).

* Liebermann – Burchard (terpenos):

15 ml anhídrido acético

15 ml de cloroformo (CHCl_3)

15 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4)

Mezclar iguales volúmenes de anhídrido acético y cloroformo, enfriar la mezcla sumergida en hielo y agregar tantas gotas de ácido sulfúrico como mililitros de cloroformo haya contenidos en la mezcla.

Rociar las placas y calentar a 100°C por 5 minutos (Ashworth, 1969).

* Anisaldehído (azúcares, esteroides y terpenos):

1 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado

0.5 ml de anisaldehído

50 ml de ácido acético

Mezclar el anisaldehído y el ácido acético, enseguida adicionar el ácido sulfúrico; el revelador debe ser preparado antes de usarse.

Rociar la placa y calentarla a 100-105 ° C, las manchas alcanzan el color a su máxima intensidad, el fondo rosa puede desteñirse por la exposición al vapor.

La respuesta es positiva si se presentan los siguientes colores: violeta para fenoles, azul para terpenos, rojo para azúcares y verde para esteroides (Ashworth, 1969).

* Cloruro de zinc (sapogeninas-esteroides y esteroides):

30 g de $ZnCl_2$

Metanol (MeOH)

Disolver el $ZnCl_2$ en MeOH hasta alcanzar los 100 ml, posteriormente filtrar; calentar la placa 1h a 105 ° C, las manchas fluorescen en luz UV (Ashworth, 1969).

* Cloruro de aluminio (flavonoides):

Cloruro de aluminio ($AlCl_3$) al 1 % en etanol

El cloruro de aluminio se afora a 50 ml, se rocía en la placa y se calienta hasta que las manchas se hacen evidentes.

Las flavonas y flavonoles se ponen amarillos, las isoflavonas viran a diversos tonos de rojo, las chalconas a púrpura rojizo, los flavonoles a café-anaranjado y las antocianinas a azul (Dominguez, 1973).

• **Reactivos:**

* Mólisch (glucósidos):

α -naftol al 5 % en etanol

Ácido sulfúrico concentrado H_2SO_4

Agregar 2 gotas de α - naftol y 2 gotas de ácido sulfúrico resbalando por las paredes del tubo a 1 ml de extracto, la presencia de un anillo violeta en la interfase indica la presencia de glucósidos (Dominguez, 1973).

* Ácido Silicotúngstico (alcaloides):

5.0 g de ácido silicotúngstico ($4H_2O \cdot SO_2 \cdot 12WO_3 \cdot 22H_2O$)

Ácido sulfúrico 6N

Mezclar para disolver el ácido silicotúngstico utilizando el ácido sulfúrico necesario para formar 100 ml (Dominguez, 1973).

* Zn / HCl (flavonoides):

Limadura de zinc (Zn)

Ácido clorhídrico concentrado (HCl)

Agregar una pequeña porción de limadura de zinc a 1 ml de extracto y posteriormente 2 gotas de HCl resbalando por las paredes; una coloración naranja indica la presencia de flavonoides.

Los extractos alcohólicos incoloros o ligeramente amarillos, se tratan con zinc y ácido clorhídrico concentrado observándose de inmediato una coloración intensa al presentar flavonoles (Ashworth, 1969).

* Cloruro férrico FeCl_3 (fenoles):

Cloruro férrico etanólico al 5 %

Agregar 3 ml del reactivo a 1 ml del extracto, color azul verdoso indica reacción positiva y presencia de grupos fenólicos (Ashworth, 1969).

* Gelatina-sal para prueba cualitativa de taninos (fenoles):

1 ml de gelatina al 1 %

1 ml de solución NaCl al 0.85 %

Mezclar y tomar una muestra de 0.5 ml para tres tubos, de la siguiente manera:

0.5 ml de NaCl al 0.85 % (tubo I)

0.5 ml de solución de gelatina al 1 % (tubo II)

0.5 ml del reactivo gelatina-sal (tubo III)

Cada mezcla se vertirá a tres tubos que contengan 3-4 mg / 0.5 ml del extracto deseado. La prueba será positiva cuando se observe precipitado en los tubos II y III, y negativa cuando sólo se observe en el tubo I.

* Liebermann - Burchard (terpenos):

15 ml de anhídrido acético

15 ml de cloroformo (CHCl_3)

15 gotas de ácido sulfúrico (H_2SO_4)

Mezclar iguales volúmenes de anhídrido acético y cloroformo, enfriar la mezcla sumergida en hielo y agregar tantas gotas de ácido sulfúrico como mililitros de cloroformo haya contenidos en la mezcla.

Agregar 1 ml del reactivo a 1 ml del extracto, la presencia de triterpenos adquiere una coloración verde, rosa para esteroides (Ashworth, 1969).

Anexo 2

Método de tinción Gram y esporas

- **Tinción Gram:**

-Hacer un frotis de los microorganismos en estudio marcando con su nombre o clave.

-Cubrir la preparación fija con cristal violeta de Gram y dejarlo actuar durante un minuto, moviendo suavemente el portaobjetos para favorecer el contacto del colorante con las células. Al cabo de un minuto escurrir el exceso de colorante y lavar.

-Cubrir la preparación con lugol de Gram y dejarlo actuar durante un minuto, escurrir el exceso de reactivo y lavar.

-Decolorar agregando mezcla de alcohol-acetona a la preparación, mientras se sostiene ligeramente inclinada para que el decolorante resbale lentamente por ella.

-Lavar con agua para detener la acción del colorante tan pronto como las gotas de esta solución ya no arrastren color.

-Cubrir la preparación con safranina y dejarla actuar por un minuto. Escurrir el exceso, lavar con agua y dejar secar al aire.

-Observar la preparación al microscopio con 100x, aplicando una gota de aceite de inmersión a la muestra (Ramírez-Gama, 1998).

- **Tinción de espora:**

- Preparar dos frotis fijos de cada cultivo.

- Cubrir un frotis de cada uno de los microorganismos con azul de metileno y dejarlo actuar durante cinco minutos.

- Lavar y secar al aire.

- Observar con objetivo de inmersión.

- Cubrir el segundo frote de cada microorganismo con verde de malaquita, calentar la preparación con mechero hasta que el colorante empiece a vaporizar, continuar el calentamiento por diez minutos, teniendo cuidado de que el colorante no hierva y de mantener la preparación húmeda.

- Ecurrir el exceso de colorante y lavar con agua.

- Teñir con solución de safranina al 0.5 % y dejarla reaccionar durante treinta segundos.

- Lavar la preparación, dejarla secar al aire y observar con objetivo de inmersión (Ramírez-Gama, 1998).

Anexo 3

Preparación de colorantes para tinción Gram y esporas

- **Colorantes para tinción Gram:**

* **Cristal violeta con oxalato de amonio:**

Solución A

Cristal violeta	2.0 g
Etanol al 95 %	20.0 ml

Solución B

Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80.0 ml

Dejar la solución B en reposo durante una noche o calentar débilmente hasta que se solubilice, después, mezclar con la solución A y filtrar (Ramírez-Gama, 1998).

* **Lugol (solución de yodo iodurado):**

Yodo metálico (I ₂)	1.0 g
Yoduro de potasio (KI)	2.0 g
Agua destilada	300.0 ml

En un mortero mezclar el yodo metálico y el yoduro de Potasio molerlo finamente, agregar una pequeña cantidad de agua para lavar el material, aforar y agitar vigorosamente (Ramírez-Gama, 1998).

*** Alcohol-Acetona:**

Etanol al 95 %	800.0 ml
Acetona	200.0 ml

Mezclar y almacenar en un recipiente bien cerrado para evitar la evaporación (Ramírez-Gama, 1998).

*** Safranina:**

Safranina	0.25 g
Etanol al 95 %	10.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

Disolver la safranina en el alcohol, agregar agua destilada y filtrar a través de papel filtro (Ramírez-Gama, 1998).

• Colorantes para tinción de esporas:

*** Azul de metileno:**

Solución alcohólica de azul de metileno al 0.3 % (Ramírez-Gama, 1998).

*** Verde de malaquita:**

Solución acuosa de verde de malaquita al 5.0 % (Ramírez-Gama, 1998).

*** Safranina al 0.5 %:**

Solución acuosa de safranina al 0.5 % (Ramírez-Gama, 1998).

*** Fucsina fenicada:**

Clorohidrato de fucsina básica	4.0 g
Fenol	12.0 ml
Etanol al 95 %	25.0 ml

*** Alcohol-Acetona:**

Etanol al 95 %	800.0 ml
Acetona	200.0 ml

Mezclar y almacenar en un recipiente bien cerrado para evitar la evaporación (Ramírez-Gama, 1998).

*** Safranina:**

Safranina	0.25 g
Etanol al 95 %	10.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

Disolver la safranina en el alcohol, agregar agua destilada y filtrar a través de papel filtro (Ramírez-Gama, 1998).

• Colorantes para tinción de esporas:

*** Azul de metileno:**

Solución alcohólica de azul de metileno al 0.3 % (Ramírez-Gama, 1998).

*** Verde de malaquita:**

Solución acuosa de verde de malaquita al 5.0 % (Ramírez-Gama, 1998).

*** Safranina al 0.5 %:**

Solución acuosa de safranina al 0.5 % (Ramírez-Gama, 1998).

*** Fucsina fenicada:**

Clorohidrato de fucsina básica	4.0 g
Fenol	12.0 ml
Etanol al 95 %	25.0 ml

Agua destilada	± 260.0 ml
Tween 80	30 gotas

Mezclar la fucsina con el fenol y colocar en baño de agua a 85 ° C con agitación, enfriar a 45 ° C, agregar el etanol, continuar agitando y llevar a un volumen de 300 ml con agua destilada (Ramírez-Gama, 1998).

* Alcohol ácido:

Ácido nítrico	5.0 ml
Etanol al 70 %	95.0 ml

Agregar el ácido sobre el etanol (Ramírez-Gama, 1998).

* Ácido acético al 5 %:

Solución acuosa de ácido acético al 5 % (Ramírez-Gama, 1998).

* Azul de metileno de Loeffler:

Solución A

Azul de metileno	0.3 g
Etanol al 95 %	30.0 ml

Solución B

Hidróxido de potasio	0.1 g
Agua destilada	100.0 ml

Mezclar las dos soluciones. Este reactivo debe ser madurado por oxidación, proceso que toma varios meses en completarse, pero que puede acelerarse por aireación; los frascos sólo deben llenarse hasta la mitad; se recomienda reemplazar el tapón por una torunda de algodón ligero y agitar el frasco con frecuencia (Ramírez-Gama, 1998).

Anexo 4

Preparación de medios de cultivo

*** Agar-eosina de metileno-lactosa (EMB):**

Peptona de carne	10.0 g / l de agua
K ₂ HPO ₄	2.0 g
Lactosa	10.0 g
Eosina Y, amarillenta	0.4 g
Azul de metileno	0.065 g
Agar	13.5 g

Pesar las cantidades indicadas, disolver y esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos; el medio queda de color vino.

Este medio puede ser modificado mediante la sustitución de peptona carne por peptona de caseína y la incorporación de sacarosa (Ramírez-Gama, 1998).

*** Agar nutritivo:**

Infusión de carne de res	300.0 g
Peptona de caseína H	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	17.0 g
Agua destilada	1000.0 ml
PH final	7.4 ± 0.2

Pesar las cantidades indicadas, disolver y calentar hasta disolución total; esterilizar en autoclave a 115 ° C durante 20 minutos (Ramírez-Gama, 1998).

Bibliografía

- * Arellano M. R. 2000. Aislamiento, determinación de la estructura molecular y bioevaluación preliminar de los metabolitos secundarios de las partes aéreas de *Viguiera hypargyrea* (plateada), una planta empleada en la medicina tradicional. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 115 p.
- * Ashworth M. R. F. 1969. Thin-layer Chromatography a laboratory handbook. Ed. Egon Stahl. Nueva York. 905 p.
- * Bauer K., L. Gros, W. Sauer. 1991. Thin Layer Chromatography. Merck. Mitter weger werksatz, Plankstadt. 66 p.
- * Chariandy C. M., C. E. Seaforth, R. H. Phelps, G. V. Pollard, B. P. S. Khambay. 1999. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. *Journal of Ethnopharmacology* 64 (1999): 265-270.
- * Cronquist A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Ed. Columbia University Press. Nueva York. 1262 p.
- * Cronquist A. 1988. The evolution and classification of flowering plants 2nd edition. Ed. The New York Botanical Garden (NYBG). Nueva York: 555 p.
- * Domínguez A. X. 1973. Investigación Fitoquímica. Ed. Limusa. México. 281 p.
- * Durán-Espinosa C. 1998. Phyllonomaceae. *Flora de Veracruz* 104: 1-7.
- * Espinoza C. M. 2000. Estudio químico y biológico de dos especies vegetales empleadas en la medicina tradicional: *Aloysia tripilli* y *Cirsium jorullense*. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. 204 p.

* García-Argáez N. A., T. O. Ramírez, H. Parra, G. Velásquez, M. Martínez-Velázquez. 2000. Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. *Planta medica*. 66 (2000): 279-281.

* Gros G. E., A. B. Pomilio, A. M. Seldes, G. Burton. 1985. *Introducción al Estudio de los Productos Naturales*. Secretaria General de la Organización de los Estados Unidos Americanos. Washington, D. C. 146 p.

* Harborne B. J. 1984. *Phytochemical Methods a guide to modern techniques of plant analysis*. Ed. Chapman and Hall. Londres. 288 p.

* Hegnauer R. 1973. *Chemotaxonomie der Pflanzen*. VI. Ed. Basel, Birkhauser Verlag. 882 p.

* <http://mobot.mobot.org/W3T/search/index/mesotp.html>

* Ingraham L. J., C. A. Ingraham. 2000. *Introduction to Microbiology*. 2nd edition. Ed. Brooks / Cole. Pacific Grove, California. 804 p.

* Joklik K. W., H. P. Willett, D. B. Amos, Tr. N. G. Meeroff. 1986. *Microbiología*. Ed. Panamericana Medica. Buenos Aires. 1454 p.

* Kaufman B. P., O. Nahum. 1999. *Natural Products from Plants*. Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida. 343 p.

* Lim D. 1998. *Microbiology*. 2nd . Ed. McGraw-Hill. Boston Massachusetts. 720 p.

* Martínez M. 1996. *Las plantas medicinales de México*. 7th edición. Ediciones botas. México, D.F. 656 p.

* Moore R; W. Dennis Clark, K. R. Stern, D. Vodopich. 1995. *Botany*. Wm. C, Publishers. Dubuque, IA. 824 p.

* Mori S. A., J. A. Kallunki. 1977. A revision of the genus *Phyllonoma* (Grossulariaceae) Brittonia 29: 69-84.

* Murray R. P., E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, R. H. Tenover. 1999. Manual of clinical microbiology 7th edition. Ed. ASM Press. Washington, D.C. 1773 p.

* Olivares A. S. 2000. Análisis químicos del árnica mexicana (*Heterotheca inuloides*) biodirigido a la caracterización de sustancias anti-inflamatorias. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. 134 p.

* Payá M., M. L. Ferrándiz, F. Erradi, M. C. Terencio, A. Kijjoa, M. M. M. Pinto, M. J. Alcaraz. 1996. Inhibition of inflammatory responses by a series of novel dolabrane derivatives. European Journal of Pharmacology 312: 97-105.

* Pérez-Cálix E. 1999. Familia Phyllonomaceae. Flora del Bajío y Regiones Adyacentes 74: 1-5.

* Prescott M. L., J. P. Harley, D. A. Klein. 1999. Microbiology. 4th edition. Ed. McGraw-Hill. Nueva York 962 p.

* Ramirez-Gama R. M., B. L. Millán, A. M. Chávez, O. V. Madrazo, G. T. Reyes, L. V. García, L. H. Gómez, I. Müggenburg. 1998. Manual de prácticas de microbiología general. Facultad de Química UNAM. 295 p.

* Rao S. T., J. L. Curne, A. F. Shaffer, P. C. Isakson. 1993. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) – and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) – induced dermal inflammation. Inflammation Research. 17 (6): 723-741.

* Raven H. P., R. F. Evert, S. E. Eichhorn. 1999. Biology of plants 6th edition. W.H Freeman and Company/Worth Publishers. Nueva York, Nueva York. 944 p.

- * Reader's Digest 1987. Plantas medicinales. Ed. Reader's Digest. México. 430 p.
- * Takhtajan A. 1997. Diversity and classification of flowering plants. Ed. Columbia University Press. Nueva York. 643 p.
- * Tortora J. G., B. R. Funke, C. L. Case. 1998. Microbiology. 6th. Ed. Addison Wesley Longman Inc. Menlo Park, California. 832 p.
- * Vane R. J., R. M. Botting. 1998. Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. Inflammation Research. 47: (2) S78-S87.