



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Ceiba parvifolia* ROSE
(POCHOTE) DE SAN RAFAEL, COXCATLÁN, PUEBLA.

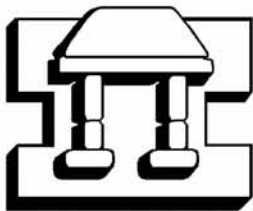
TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

ARIADNA MARIA AGUILAR ROBLEDO

ASESORA Y DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ



IZTACALA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO.

2006



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.

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Fue dirigido por la Dra. Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado.

Dra. Margarita Canales Martínez.

Dr. Rafael Lira Saade.

Dr. Guillermo Avila Acevedo.

Maestra en Ciencias Ana María García Bores.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Guillermo Avila Acevedo, al Dr. Rafael Lira Saade, a la Maestra en Ciencias Ana María García Bores, a la Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado y a la Dra. Margarita Canales Martínez, por su apoyo para la realización del presente trabajo, gracias a sus observaciones, a la aclaración de todas mis dudas, a sus consejos, gracias por siempre estar cuando los necesitaba.

Al Biólogo Luis Barbo Hernández Portilla, por su apoyo técnico para la realización de algunos estudios espectrométricos

Al Maestro en Ciencias Ángel Durán Díaz por el apoyo en los análisis estadísticos.

A la Maestra en Ciencia Aidé Avendaño Gómez, por la bibliografía proporcionada.

Al Instituto de Química, por los espectros realizados.

Al Doctor Carlos Céspedes, por el apoyo técnico para la realización del estudio espectrométrico de RMN¹H.

DEDICATORIAS

A Dios, por la oportunidad que me brinda cada día de vivir disfrutando de todo lo que me ofrece.

A mi padre, por tu apoyo y la oportunidad durante todos estos años que me brindaste para realizar una carrera profesional, por la formación que me has dado para ser una persona excepcional, ya que tú para mí eres un gran ejemplo a seguir, por ser un padre triunfador, honesto, y por esa fortaleza que hasta ahora me has demostrado tener.

A mi madre, por darme la vida y la dicha de contemplarte, amarte, respetarte y el orgullo que me da ser tu hija. Porque en todo momento a pesar de la distancia me apoyas y estás pendiente de mi vida. Nunca olvidaré los desvelos y preocupaciones que te he ocasionado sin esperar nada a cambio. La mejor recompensa que te puedo brindar, es esta tesis y mi título de licenciatura. Porque siempre has sido mi bandera que me impulsa a seguir adelante, forjando mis sueños a no bajar la guardia y rendirme. Por todo lo que representas para mí, GRACIAS MAMÁ!!

A mis hermanos, porque siempre he contado con ustedes, porque a su lado he pasado grandes cosas, porque a cada uno de ustedes los valoro por sus consejos, apoyo, amor y la unidad que nos caracteriza, espero sigamos juntos como hasta ahora y aprendiendo cosas nuevas de cada uno, porque sé que siempre podré contar con ustedes, les dedico mi tesis y espero nunca defraudarlos.

A todas esas personas a las cuales les adeudo la paciencia de tolerarme los arrebatos del humor, mis temores y mis dudas, que a pesar de todo estuvieron conmigo; pero sobre todo a mi mejor amiga Mara por todo el apoyo incondicional, por tu presencia en las buenas y en las malas, por saberme escuchar y recordar todos esos tecnicismos que te aprendiste para comprender mis pláticas sin aburrirte, mil gracias.

A cada uno de mis profesores, que gracias a sus consejos y palabras de alivio logré querer tanto esta carrera como siempre lo hubiera deseado, gracias a ellos sigo aquí. En particular le agradezco al grupo de profesores de Fitoquímica que para mí han sido como una familia, por su apoyo en mis dudas y por siempre dedicarles tiempo a sus alumnos, por el trato que me brindan infinitas gracias.

A mi directora de tesis la Doctora Margarita Canales Martínez, por su entrega de conocimientos, por su paciencia, la formación académica invaluable que me ha dado, los consejos que me ha brindado, la respeto, valoro y admiro, que Dios la bendiga y mantenga a su familia siempre unida.

Índice general

Índice de figuras.....	i
Índice de cuadros.....	iii
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	4
Objetivos.....	6
Descripción botánica.....	7
Zona de colecta.....	10
Metodología.....	12
Resultados y análisis.....	16
Discusión.....	32
Conclusiones.....	36
Perspectivas.....	36
Apéndices I. Método de difusión en agar de Kirby – Bäuer	37
Apéndice II. Microtécnica de dilución en caldo	39
Apéndice III. Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial	40
Apéndice IV. Métodos cromatográficos	41
Bibliografía	43

Índice de figuras

Figura 1.- <i>Ceiba parvifolia</i> Rose (Pochote).....	8
Figura 2.- Distribución de <i>Ceiba parvifolia</i> en la República Mexicana.....	9
Figura 3.- Ubicación geográfica de San Rafael (Coxcatlán, Puebla).....	10
Figura 4.- Halos de inhibición del extracto metanólico de la corteza de <i>Ceiba parvifolia</i>	18
Figura 5.- Actividad antibacteriana del extracto metanólico (libre de grasas) de <i>Ceiba parvifolia</i>	19
Figura 6.- Comparación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico (libre de grasas) de <i>Ceiba parvifolia</i>	20
Figura 7.- Cromatograma de HPLC de la fracción 25 obtenida de la cromatografía de sílica gel de la fase polar de <i>Ceiba parvifolia</i>	26
Figura 8.- Espectro de UV del compuesto puro con actividad antibacteriana de <i>Ceiba parvifolia</i>	27
Figura 9.- Espectro IR del compuesto puro responsable de la actividad antibacteriana de <i>Ceiba parvifolia</i>	27
Figura 10.- Espectro de masas del compuesto puro de <i>Ceiba parvifolia</i>	28
Figura 11.- Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN ¹ H) del compuesto puro de <i>Ceiba parvifolia</i>	29

Figura 12.- Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN^1H) del compuesto puro de *Ceiba parvifolia* (Amplificación de la zona 0.7 a 3.2 ppm).....30

Figura 13.- Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN^1H) el compuesto puro de *Ceiba parvifolia* (Amplificación de la zona 3.4–4.3 ppm).....31

Índice de cuadros

Cuadro 1.- Diferentes usos de <i>Ceiba parvifolia</i> Rose (Pochote).....	5
Cuadro 2.- Rendimiento de las diferentes fases del extracto metanólico de la corteza de <i>Ceiba parvifolia</i>	17
Cuadro 3.- Actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza de <i>Ceiba parvifolia</i>	18
Cuadro 4.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) del extracto metanólico de <i>Ceiba parvifolia</i>	21
Cuadro 5.- Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas de la columna de Sephadex LH - 20.....	22
Cuadro 6.- Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas de la columna de sílica gel.....	23
Cuadro 7.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) del compuesto puro de <i>Ceiba parvifolia</i>	24
Cuadro 8.- Comparación entre la concentraciones mínima inhibitoria (CMI) del extracto metanólico y el compuesto puro de <i>Ceiba parvifolia</i>	25

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Ceiba parvifolia* ROSE (POCHOTE) DE SAN RAFAEL, COXCATLÁN, PUEBLA.

Resumen.

Ceiba parvifolia es usada por los habitantes de San Rafael, Coxcatlán, Puebla, para aliviar heridas infectadas, gastritis y úlceras. Algunas de estas enfermedades son ocasionadas por bacterias. En este trabajo, se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto metanólico de la corteza de *Ceiba parvifolia*. Se evaluó la actividad antibacteriana (método de difusión en agar de Kirby – Bauer) y antifúngica (método cualitativo de inhibición del crecimiento radial). Así mismo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) por la microtécnica de dilución en caldo. Mediante una cromatografía en columna abierta, se aisló el compuesto responsable de la actividad antibacteriana. Se elucidó la estructura del compuesto responsable de la actividad antibacteriana por medio de diferentes espectros (UV, IR, masas, RMN¹H). El extracto metanólico de la corteza del Pochote no mostró actividad antifúngica. De las 13 cepas de bacterias utilizadas, el crecimiento de 10 de ellas (6 Gram⁻ y 4 Gram⁺) fue inhibido por el extracto metanólico. Las cepas bacterianas más sensibles al extracto metanólico fueron: *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae* No-01, *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico y *Vibrio cholerae* CDC V12 que tuvieron una CMI de 0.25 mg/ml.

El compuesto responsable de la actividad antibacteriana absorbe a 280 nm. El espectro infrarrojo muestra que este compuesto presenta en su estructura química el grupo funcional OH y la presencia de grupos C=C de anillos aromáticos. Se logró determinar el peso molecular del compuesto, que fue de 620.6. Dadas las características anteriores, se considera que el compuesto con actividad antibacteriana es probablemente un lignano glucosidado. Estos resultados justifican el uso tradicional que se le ha dado a la corteza del Pochote.

Introducción.

Las plantas producen diversos compuestos (metabolitos secundarios) que, en su mayoría no participan directamente en su crecimiento y desarrollo (Croteau et al., 2002). Algunos de estos, son responsables de los olores y colores característicos de los vegetales; otros proporcionan a la planta sus virtudes culinarias, medicinales o venenosas (Trease y Evans, 1989). Muchos de estos metabolitos, se sabe que son atrayentes de polinizadores, algunos otros confieren características alelopáticas, otros protegen a las plantas contra herbívoros, de infecciones microbianas, etc. La actividad biológica de estos metabolitos secundarios (antimicrobiana y antifúngica), muchas veces coincide con la actividad farmacológica en los seres humanos (Croteau et al., 2002; Wink, 1999; Harbone y Tomas-Barberan, 1991; Harbone y Dey, 1989).

La característica más importante de muchos metabolitos secundarios es una distribución relativamente restringida en la naturaleza que, en algunos casos, se limita a especies o subespecies únicas y en consecuencia son una manifestación de la individualidad del organismo que los contiene (Gros et al., 1985).

Los productos naturales (PNs) son típicamente metabolitos secundarios, producidos por organismos (plantas, hongos, bacterias, protozoarios, insectos y animales) en respuesta a estímulos externos, por ejemplo cambio nutricional, el estrés hídrico, infección, competencia y herbivoría. Algunos PNs han sido aislados como compuestos biológicamente activos (Strohl, 2000).

Aproximadamente una de cada tres de las drogas más vendidas en el mundo son PNs o sus derivados. Además, estos son muy reconocidos en la industria farmacéutica por su extensa diversidad estructural, así como su amplia línea de actividades farmacológicas (Strohl, 2000). Los PNs han jugado un papel importante en el descubrimiento de drogas. En la sociedad pre-industrializada y en las sociedades agrarias, los derivados de las plantas (PNs),

fueron usados por poblaciones indígenas como terapia para diversas enfermedades (Strohl, 2000).

Las plantas tienen capacidades para sintetizar sustancias aromáticas, la mayoría son fenoles o derivados con oxígeno-sustituido (algunas quinonas, terpenos, etc). Muchos de estos son metabolitos secundarios, de los cuales al menos 12, 000 han sido aislados, los cuales corresponden probablemente a menos del 10 % del total de estos compuestos en la naturaleza. En algunos casos, estas sustancias les sirven a las plantas como mecanismos de defensa contra la depredación de microorganismos, insectos y herbívoros (Cowan, 1999).

Algunos metabolitos secundarios sintetizados por las plantas como los terpenoides le proporcionan el olor; otros (quinonas y taninos) son responsables de la pigmentación de la planta, así como algunos le dan el sabor a la planta como la capsaicina de los chiles (Cowan, 1999).

La búsqueda de compuestos de origen natural decayó por mucho tiempo (1930 – 1970), dado el auge en la obtención de productos sintéticos aparentemente similares a los de origen natural, de mayor eficacia y más baratos. Sin embargo, el resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas (como paludismo, malaria, tuberculosis, lepra y diferentes enfermedades bacterianas), están ocasionando severos problemas de salud debido a la resistencia que han desarrollado ciertos microorganismos a los fármacos, lo que hace que muchos tratamientos sean poco eficaces, muy caros, más prolongados y en muchas ocasiones con efectos secundarios severos (Álvarez, 2002).

Debido a esta problemática en el área de la salud, se deben incrementar las investigaciones desde el punto de vista químico farmacológico de las plantas, enfocándose al estudio de nuevos principios activos o moléculas prototipo para el desarrollo de compuestos farmacológicamente activos, menos tóxicos, más selectivos y por lo tanto más eficaces.

Las plantas curativas son el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional mexicana, que en gran parte es aún rescatable y puede constituir un importante elemento para implementar nuevos planes de salud que combinen el conocimiento popular con el científico (Argueta y Cano, 1994).

En particular, en este trabajo se estudió la actividad antimicrobiana de la corteza de *Ceiba parvifolia* (Pochote) la cual es utilizada en la medicina tradicional para aliviar heridas infectadas, úlceras, gastritis, etc. (Canales et al., 2005).

Antecedentes.

En las revisiones de la literatura taxonómica y etnobotánica el género *Ceiba* cuenta con muy pocos registros del uso medicinal de la especie *Ceiba parvifolia* (Pochote) (Cuadro 1), por lo tanto es de suma importancia el estudio de la misma.

Investigador	Lugar	Uso alimenticio	Uso comercial	Uso medicinal	Parte usada
Zepeda 1985	Camodia, Kenia, Tanzania, Ceilán, Java, India, Filipinas, Costa Rica y en México	Frutos tiernos y hervidos, la semilla tostada	Material de relleno de almohadas y cojines.	Anti- pirético y contra mordedura de serpientes.	Fibra , fruto, semillas , hojas y raíces
Argueta y Cano 1994	Oaxaca, Quintana Roo, Veracruz			Enfermedades gastrointestinales, anti-inflamatorio, jote, lavar heridas, diabetes, reumas, sarna, dolor de muelas, postemas y parásitos.	Hojas, ramas, corteza
Rocha 2002	San Rafael Coxcatlán			Para aliviar enfermedades de posible origen bacteriano	Corteza
Rosas 2003	San Rafael Coxcatlán	Fruto comestible	Relleno de cojines		Semilla y fibra del fruto
Hersch et al., 2004	México, en los edos. de Puebla y Guerrero	Los frutos asados, la semilla para hacer tortillas, la raíz como tubérculo.	Fibra, Seda fina, como relleno de almohadas, el aceite de la semilla para manufactura de jabón, la corteza para artesanía.	Febrículas	Frutos, semillas, raíz, fibra, seda, corteza.
Canales et al., 2005	San Rafael Coxcatlán			Aliviar heridas infectadas, gastritis y úlceras	Extracto metanólico de la coteza
Avendaño et al., 2006	Valle de Tehuacán	Semillas hervidas o tostadas, raíz como jicama y flores guiso con <i>chiltepetl</i>	Corteza para artesanía	La corteza en infusión para los riñones, infecciones en la piel, disminución de azúcar en la sangre. La raíz cruda para riñones y gastritis	Semilla, raíz, flores, tallo, ramas, algodón, corteza

Cuadro 1. Diferentes usos de *Ceiba parvifolia* Rose (Pochote).

Con lo anterior queda claro que para la especie *Ceiba parvifolia* no se han realizado estudios suficientes que validen su uso etnobotánico, aunado a esto, la bibliografía reporta el uso medicinal de esta especie en un poblado (San Rafael) que se ubica dentro de la reserva de la Biósfera del Valle de Tehuacán – Cuicatlán. Tomando en cuenta las recomendaciones de la OMS sobre la validación científica del conocimiento tradicional (Eloff, 1998; Farnsworth et al., 1985 en Álvarez, 2002), en este trabajo se explica la base científica del uso tradicional de *Ceiba parvifolia*.

Objetivo general.

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de la corteza de *Ceiba parvifolia* Rose (Pochote).

Objetivos particulares.

Obtener el extracto metanólico de la corteza de *Ceiba parvifolia*.

Determinar la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto metanólico.

Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), bactericida mínima (CBM) y fungicida mínima (CFM).

Aislar y purificar el (los) compuesto (s) responsable (s) de la actividad antimicrobiana, realizando fraccionamientos cuyo criterio de separación sea la actividad biológica.

Descripción botánica.

Ceiba parvifolia Rose (Pochote)

Etimología: del latín., *parvus*: poco pequeño; *folium*: hoja.

Nombre común: “Pochote”, “Pochotle”, “Ceiba”

Esta especie pertenece a la familia Bombacaceae, la cual comprende árboles, con troncos espinosos, presenta hojas caducas, digitadas o simples. Sus flores pueden ser de diferentes tamaños, a menudo bractioladas, con 5 pétalos y de 5 estambres o más unidos en la base de la mitad hacia abajo. Sus frutos son secos o carnosos de celdas dehiscentes o indehiscentes, con 2 o más semillas por celda. La familia Bombacaceae comprende unos 20 géneros y alrededor de 180 especies. La mayoría de las especies habitan en los densos bosques lluviosos de Sudamérica y en las sabanas africanas, pocas al sur de Asia y algunas en Madagascar (Reyes et al., 2004).

Características morfológicas.

Ceiba parvifolia es un árbol caducifolio hasta 10 m de alto, con tronco generalmente cubierto por corcho a manera de protuberancias y ramas ornamentadas con espinas. Sus hojas son ovadas a redondas, muy pecioladas y con 5 a 6 folíolos. Las flores son blanco amarillentas, con pétalos enrollados de 13 cm de largo, suculentos y de estambres largos. Florece entre noviembre y enero. Sus frutos son cápsulas de 8 cm de largo que en su interior contienen semillas morenas, esféricas y lisas con abundante lana blanca (Fig. 1) (Reyes et al., 2004).



Figura 1. *Ceiba parvifolia* Rose (Pochote).

a) Detalle del tronco, b) Flor c) Fruto cerrado, d) Fruto abierto

Distribución.

Ceiba parvifolia Rose (Pochote), se distribuye en la República Mexicana en los estados de: Guerrero, Morelos, Puebla, Oaxaca, Tabasco y Yucatán (Fig. 2).



Figura 2. Distribución de *Ceiba parvifolia* en la República Mexicana.

■ Estados donde se localiza la especie.

Usos etnobotánicos.

La corteza del Pochote se utiliza para hacer pequeñas figuras artesanales. Las flores son preparadas en guisos. En tiempos prehispánicos la fibra del fruto se empleaba para confeccionar telas para príncipes y reyes. La fibra de este árbol es usada para rellenar cojines, almohadas, colchones y otros artículos de mueblería. Las almohadas tienen especial demanda para enfermos de asma o con padecimientos de alergia. Las semillas inmaduras son comestibles y además proporcionan aceite que puede usarse en la fabricación de jabón (Ludlow, 1980; Reyes et al., 2004).

La planta con la que se realizó este trabajo fue colectada en San Rafael, Coxcatlán, Puebla.

Zona de colecta.

San Rafael Coxcatlán.

El pueblo de San Rafael está localizado en la porción sudeste de la Reserva de la Biosfera del Valle de Tehuacán Cuicatlán ($18^{\circ} 12''$ y $18^{\circ} 14''$ N; $97^{\circ} 07''$ y $97^{\circ} 09''$ O) (Fig. 3).

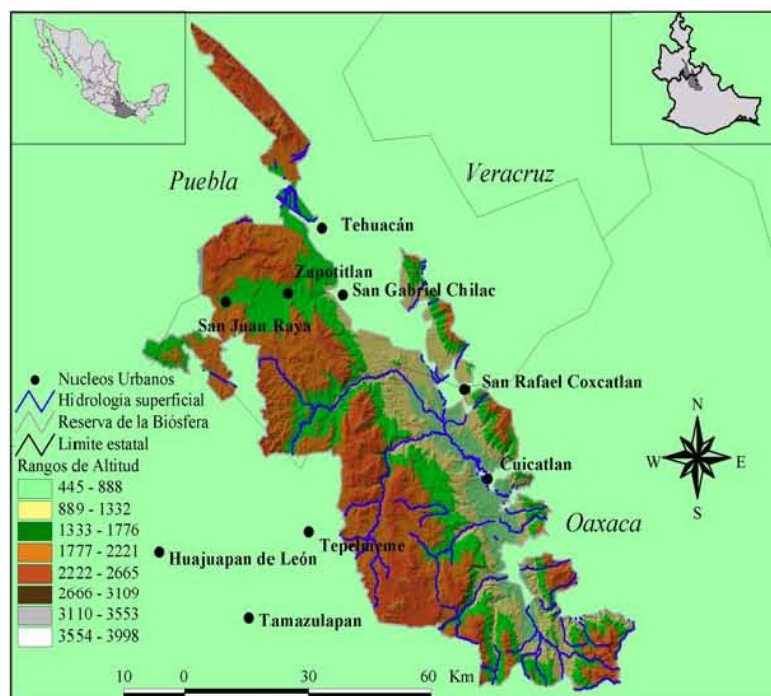


Figura 3. Ubicación geográfica de San Rafael (Coxcatlán, Puebla).

Clima.

El tipo de clima en la zona es el Bs1 (h') w'' (w) (e) g correspondiente a climas secos o áridos, cálidos con lluvias en verano, con temperatura media anual sobre 22°C, su régimen de lluvias es de verano y se calcula una precipitación total anual de 394.6 mm para la zona (Medina, 2000).

Hidrografía.

Esta parte del Valle de Tehuacán - Cuicatlán es drenada por el Río Tehuacán que se encuentra al oeste del cerro Colorado, convirtiéndose en el río Salado para entrar en la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste (Salcedo, 1997).

Edafología

El origen del suelo data del periodo Cuaternario, era Cenozoica. Presenta rocas sedimentarias y volcánicas sedimentarias en conglomerados, formado por calizas, areniscas, rocas ígneas y fragmentos de cuarzo y pedernal en una matriz arcillo-arenosa con sedimentos de lutita y areniscas del paleozoico superior. Existen predominantemente dos tipos de suelo regosoles predominantemente calcáreos y regosoles éutricos y xerosoles, predominantemente xerosoles háplicos (Salcedo, 1997).

Vegetación.

En cuanto a la vegetación, acorde con Fernández (1999), con base a la fisonomía, la presencia y dominancia de algunas especies y siguiendo la clasificación de Miranda y Hernández, reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación para el área de estudio: Cordonal de *Pachycerus weberi* (J. Coulter) Baker, se caracteriza por la dominancia de cactáceas columnares (cardones).

Chiotillal de *Escontria chiotilla* (F: A: C: Weberi) Rose en el nivel próximo al margen del cauce del río, sobre niveles de terrenos de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal, con una alta densidad arbustiva.

Cuajiotal con especies dominantes como: *Burseras morelensis* Ramírez, *Mimosa polyantha* Benth, *Fouquieria formosa* Kunth, así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fruticosa* Hemsl, localizada a aproximadamente 1.5 – 3.5 m por encima del nivel basal.

Fouqueria con especies dominantes como: *Fouquieria formosa*, *Bursera aptera* Ramírez, *Mimosa polyantha*, *Ceiba parvifolia*, *Manihotoides pauciflora* (Brandege) D. J Roger y Appan, *Senna wislizenii* (A: Gray) H. S. Irwin y Barneby, *Mimosa luisiana* Brandege y *Sanvitalia fruticosa*. Localizada en el nivel más alto de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal, la densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceo es muy baja, dominando en su totalidad por *Sanvitalia fruticosa*.

Metodología.

Obtención de la planta.

La planta utilizada para este trabajo es *Ceiba parvifolia* (Pochote) de la cual se colectaron 316.4 g de corteza en el mes de diciembre del 2001 en la comunidad de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Se depositó un ejemplar en el Herbario IZTA (Número de colecta: RRL 147).

Extracto de la corteza.

A) Obtención del extracto.

El extracto se preparó colocando 316.4 g de la corteza seca y molida en 2.5 litros de metanol en un recipiente de vidrio donde se dejó macerando durante 10 días. Después se filtró y el exceso de solvente se destiló a presión reducida.

La solución se concentró a sequedad obteniéndose así el extracto metanólico.

El extracto metanólico se sometió a una partición con hexanos, de ésta manera se obtuvo el extracto metanólico libre de grasas.

B) Cuantificación de sólidos solubles.

Se realizó pesando en una balanza semianalítica directamente el extracto sin ninguna traza de solvente.

Bioensayos.

A) Actividad antibacteriana.

Se utilizó la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer (Koneman et al., 1985), realizando cada ensayo por triplicado (Apéndice I). Los sensidiscos se impregnaron con 2 mg del extracto. Los controles positivos fueron sensidiscos con 25 µg de cloramfenicol y los

controles negativos sensidiscos con 10 µl de solvente. En los bioensayos de seguimiento para separar el principio activo se utilizó la técnica antes descrita.

Microorganismos utilizados.

Bacterias Gram-negativas: *Vibrio cholerae* No-01, *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislado de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico (estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxinas, sero tipo Inaba), *Vibrio cholerae* CDC V12, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Enterobacter aerogenes*, fueron donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán y *Yersinia enterocolitica*, fue donada por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la F. E. S. Iztacala (UNAM) y *Salmonella typhi* ATCC 19430.

Bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Sarcina lutea*, fueron donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán.

B) Evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se utilizó la microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1985). Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice II). Como control negativo se aplicó metanol en el volumen más grande (10 µl por pozo) en el cual se disolvió el extracto.

C) Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó según el método cualitativo de inhibición del crecimiento radial descrito por Wang y Bun (2002).

Se utilizaron discos impregnados con 2 mg del extracto. Como control negativo se prepararon discos impregnados con 10 µl de solvente y como control positivo discos con 20 µg de ketoconazol (Apéndice III).

Cepas de hongos utilizadas.

Trichophyton mentagrophytes, *Aspergillus niger*, *Fusarium sporotrichum* (ATTC NRLL 3299), *Fusarium moniliforme* (donadas por el Dr. César Flores Ortiz, Lab. de Fisiología UBIPRO – FES - Iztacala) y *Rhizoctonia solani* (donada por el Dr. Raúl Rodríguez, INIFAP - Celaya).

Aislamiento y purificación del compuesto puro.

La fracción metanólica de la corteza de Pochote (libre de grasas) se sometió a un fraccionamiento cromatográfico.

Se probaron dos fases estacionarias para determinar cuál era la más apropiada para la separación del principio activo del extracto, estas fueron Sephadex LH-20 y sílica gel 70-230.

Para la cromatografía en gel con Sephadex LH-20, la fase móvil fue metanol colectando 30 alícuotas de 3.0 ml cada una.

En la columna de sílica, la fase móvil consistió de un gradiente de polaridad, iniciando con diclorometano y aumentando la polaridad con metanol, hasta llegar a metanol 100%, obteniendo 200 alícuotas de 10 ml (Apéndice IV).

En el análisis cromatográfico en placa fina, se emplearon placas de aluminio (sílica gel 60 F₂₅₄ Merck) con un espesor de 0.20 mm con indicador de fluorescencia.

La cromatografía en placa fina se observó mediante una lámpara de luz UV (366-254nm), para revelar se usó sulfato cérico.

Detección cualitativa de taninos.

La presencia de taninos en el extracto metanólico (libre de grasas) y en el compuesto puro, se realizó preparando discos impregnados con 2 mg para cada caso. Estos sensidiscos se colocaron en una caja con agar xilosa – sangre para comprobar si alguno era capaz de provocar hemólisis.

Elucidación de la estructura química.

La determinación de la estructura química del compuesto puro se realizó mediante estudios espectrométricos y espectroscópicos.

La temperatura de fusión se midió con un aparato Fisher-Jones (0-300° C).

El espectro ultravioleta se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer lambda 2S UV/VIS.

El espectro de infrarrojo (IR) se determinó en un espectrofotómetro Perkin Elmer Spectrum 2000.

El espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN¹H) se realizó en un Varian Gemini 300 MHz.

El espectro de masas se evaluó en un controlador de inserción directa Finnigan MAT modelo DPC, con una corriente inicial de 0 mA, manteniendo estas condiciones durante 30 segundos. Rampa de corriente de 100 mA/segundo, manteniendo así por 30 segundos.

Pruebas estadísticas

Se utilizó un análisis estadístico ANOVA; así como la prueba de Tukey, para determinar si existían diferencias significativas de sensibilidad entre las cepas de bacterias.

Resultados y análisis.

Rendimiento del extracto

El rendimiento del extracto metanólico de la corteza de *Ceiba parvifolia* (Pochote) fue de 17.8 g. De la partición del extracto, la fase metanólica obtuvo un mayor rendimiento (13.11 g) que la fase hexánica (4.62 g) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Rendimiento de las diferentes fases del extracto metanólico de la corteza de *Ceiba parvifolia*

Fase	Peso g.	%
Metanólica (polar)	13.11	4.148
Hexánica (no polar)	4.62	1.462

El % se calculó con respecto a 316.4 g de corteza.

Actividad antifúngica.

De acuerdo a los resultados obtenidos, no se observó actividad antifúngica.

Actividad antibacteriana.

En cuanto a la actividad antibacteriana del extracto metanólico, se determinó que este inhibió el crecimiento de 10 cepas bacterianas (4 Gram⁺ y 6 Gram⁻), siendo *Sarcina lutea* la que mostró los halos de inhibición más grandes (14.33 ± 0.5 mm) y *Escherichia coli* la que presentó los menores halos de inhibición (7.33 ± 0.5 mm) (Cuadro 3, Figura 1).

Cuadro 3. Actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza de *Ceiba parvifolia*.

BACTERIA	HALO DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO (mm)	CLORAMFENICOL CONTROL POSITIVO (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.60 ± 0.57	23.0 ± 0.5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8.34 ± 0.21	23.0 ± 0.5
<i>Sarcina lutea</i>	14.30 ± 0.57	34.0 ± 0.5
<i>Bacillus subtilis</i>	9.66 ± 1.54	34.0 ± 0.5
<i>Vibrio cholerae</i> agua	11.33 ± 0.57	31.0 ± 0.5
<i>Vibrio cholerae</i> No-01	12.66 ± 0.57	38.0 ± 0.5
<i>Vibrio cholerae</i> Tor	13.33 ± 0.57	34.0 ± 0.5
<i>Vibrio cholerae</i> cc	10.33 ± 0.57	31.0 ± 0.5
<i>Escherichia coli</i>	7.33 ± 0.50	20.0 ± 0.5
<i>Salmonella typhi</i>	7.66 ± 0.57	26.0 ± 0.5

Halo de inhibición, valor promedio de 3 repeticiones

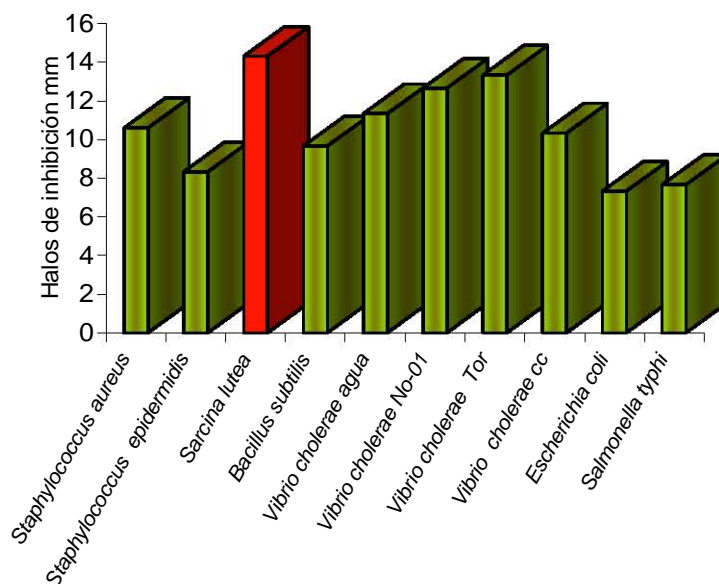


Figura 4. Halos de inhibición del extracto metanólico de la corteza de *Ceiba parvifolia*.

La partición no polar del extracto metanólico no presentó actividad antibacteriana, por lo cual los siguientes resultados, se refieren exclusivamente al extracto metanólico libre de grasas.

En la Figura 5, se observa que hay especies bacterianas más sensibles al extracto metanólico de la corteza del Pochote y que si hay diferencias significativas ($F= 8.6130$; $p<0.005705$) entre el tipo bacteriano, es decir la sensibilidad al extracto depende de la especie bacteriana, de acuerdo con la prueba de Tuckey ($P<0.05$) la bacteria más sensible fue *Sarcina lutea* y la menos sensible *Salmonella typhi*.

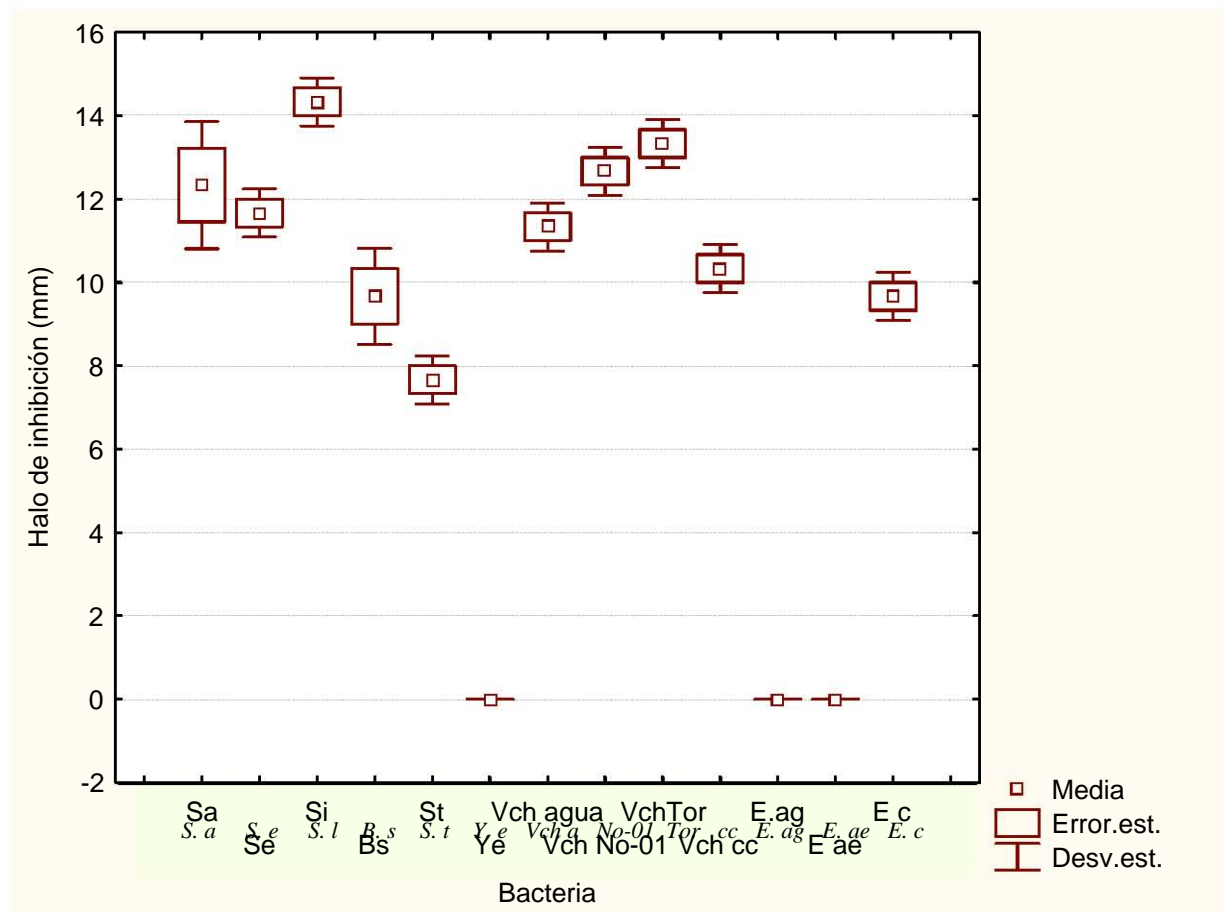


Figura 5. Actividad antibacteriana del extracto metanólico (libre de grasas) de *Ceiba parvifolia*. S. a: *Staphylococcus aureus*; S. e: *S. epidermidis*; S. l: *Sarcina lutea*; B. s: *Bacillus subtilis*; S. t: *Salmonella typhi*; Y. e: *Yersinia enterocolitica*; Vch a: *Vibrio cholerae* aislado de agua contaminada; No-01: *Vibrio cholerae* No-01; Tor: *Vibrio cholerae* CDC V12; cc: *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico; E. ag: *Enterobacter agglomerans*; E. ae: *Enterobacter aerogenes*; E. c: *Escherichia coli*.

Se determinó que hubo una diferencia estadísticamente significativa ($F= 169.623$; $p<0.001$) entre la sensibilidad de las bacterias Gram–negativas y Gram–positivas, siendo estas últimas las más sensibles (mostrando halos de inhibición mayores) al extracto metanólico de *Ceiba parvifolia* (Figura 6).

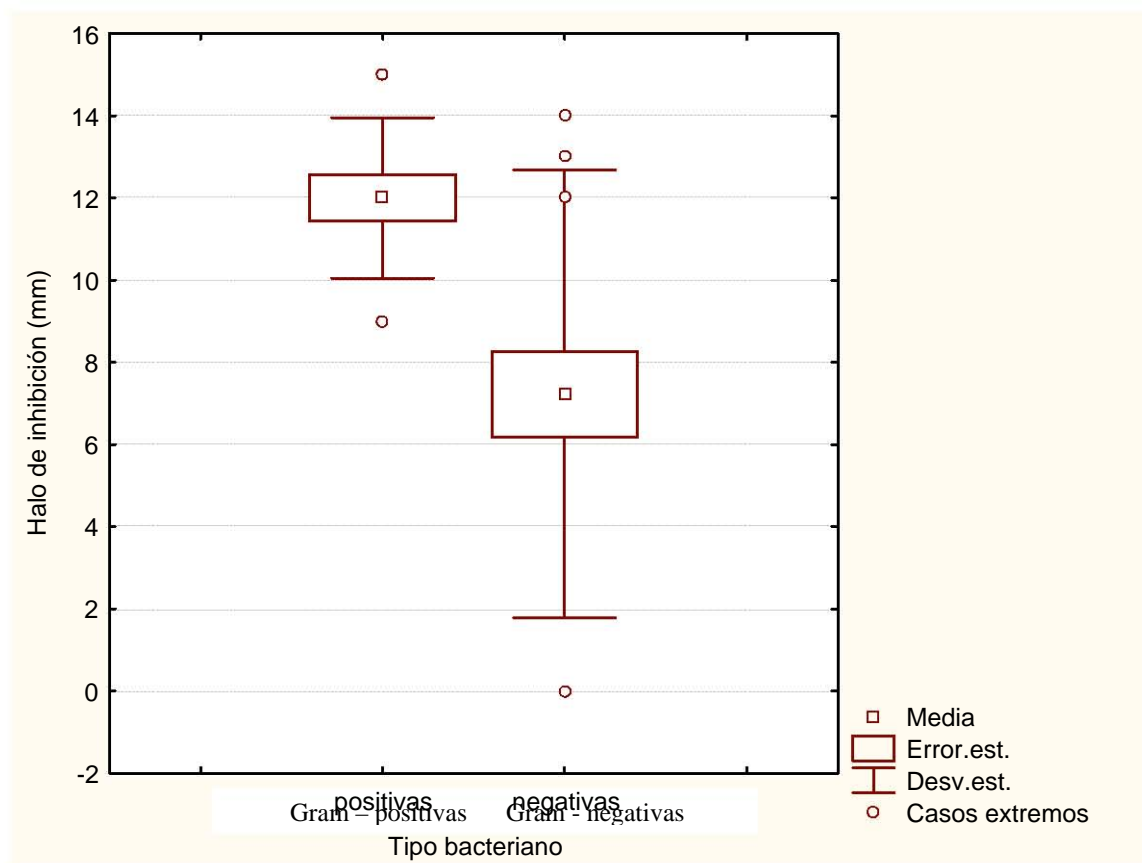


Figura 6. Comparación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico (libre de grasas) de *Ceiba parvifolia*.

Con respecto a la determinación de CMI y CBM del extracto metanólico, se observó que para las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae* Tor, *Vibrio cholerae* cc y *Vibrio cholerae* No-01 la CMI es de 0.25 mg/ml y la CBM de 0.5 mg/ml. Para el resto de las bacterias sensibles a este extracto, la CMI estuvo entre 0.50 a 1.0 mg/ml y la CBM entre 0.75 a 1.5 mg/ml (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentraciones mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) del extracto metanólico de *Ceiba parvifolia*.

BACTERIA	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25	0.50
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.25	0.50
<i>Sarcina lutea</i>	0.50	0.75
<i>Bacillus subtilis</i>	0.75	1.0
<i>Vibrio cholerae</i> Tor	0.25	0.50
<i>Vibrio cholerae</i> cc	0.25	0.50
<i>Vibrio cholerae</i> agua	0.75	1.0
<i>Vibri. cholerae</i> No-01	0.25	0.50
<i>Salmonella typhi</i>	1.00	1.50
<i>Escherichia coli</i>	1.00	1.50

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Fraccionamiento

Tomando en cuenta que *Sarcina lutea* fue la cepa más sensible al extracto metanólico (12.0 ± 0.5 mm), se escogió esta bacteria como indicador para realizar el fraccionamiento biodirigido.

De la cromatografía en gel (Sephadex LH – 20) del extracto metanólico (libre de grasas), se obtuvieron 30 alicuotas, que se agruparon en 7 fracciones de las cuales las fracciones 2 a 5 mostraron actividad antibacteriana, siendo la más activa la fracción 3 (halo de inhibición de 18.0 ± 0.5 mm) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Actividad antibacteriana de las fracciones
obtenidas en la columna de Sephadex LH-20.

FRACCIÓN	HALO DE INHIBICIÓN EN (mm)
1	na
2	14.0 ± 0.5
3	18.0 ± 0.5
4	14.0 ± 0.5
5	12.0 ± 0.5
6	na
7	na

El ensayo sólo se realizó en *Sarcina lutea*.

na: no activa

De la cromatografía de columna abierta con fase estacionaria sílica gel, se obtuvieron 200 alícuotas las cuales fueron agrupadas en 32 fracciones, de éstas 20 mostraron actividad, siendo la fracción 25 la que obtuvo el mayor halo de inhibición (18.0 ± 0.5 mm) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas de la columna de sílica gel.

POLARIDAD	FRACCIÓN	HALO (mm)
100 % diclorometano	1-2	na
100 % diclorometano	3	8.0 ± 0.5
100 % diclorometano	4-9	na
9-1 diclorometano-metanol	10	14.0 ± 0.5
9-1 diclorometano-metanol	11	13.0 ± 0.5
9-1 diclorometano-metanol	12	9.0 ± 0.5
9-1 diclorometano-metanol	13	12.0 ± 0.5
9-1 diclorometano-metanol	14	13.0 ± 0.5
9-1 diclorometano-metanol	15	10.0 ± 0.5
9-1 diclorometano-metanol	16	7.0 ± 0.5
9-1 diclorometano-metanol	17-18	8.0 ± 0.5
9-1 diclorometano-metanol	19-20	10.0 ± 0.5
9-1 diclorometano-metanol	21	11.0 ± 0.5
8-2 diclorometano-metanol	22	9.0 ± 0.5
8-2 diclorometano-metanol	23	12.0 ± 0.5
8-2 diclorometano-metanol	24	10.0 ± 0.5
7-3 dicloro-metano	25	18.0 ± 0.5
6-4 dicloro-metano	26	11.0 ± 0.5
1-1 dicloro-metano	27-28	8.0 ± 0.5
100 % metanol	32	14.0 ± 0.5

El ensayo sólo se realizó en *Sarcina lutea*

na: no activa

Tomando en cuenta que la fracción 25 de la cromatografía de sílica gel obtuvo el mayor halo de inhibición y que posteriormente se demostró que se trataba de un compuesto puro (Fig. 5 a 11), se obtuvieron los valores de la CMI Y CBM de esta fracción que se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Concentraciones mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) del compuesto puro de *Ceiba parvifolia*.

BACTERIA	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25	1.50
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.50	1.50
<i>Sarcina lutea</i>	0.25	0.75
<i>Bacillus subtilis</i>	0.75	1.50
<i>Vibrio cholerae</i> Tor	0.50	1.00
<i>Vibrio cholerae</i> cc	0.50	1.50
<i>Vibrio cholerae</i> agua	0.125	2.00
<i>Vibrio cholerae</i> No-01	0.25	0.50
<i>Salmonella typhi</i>	>2.00	>>2.00
<i>Escherichia coli</i>	>2.00	>>2.00

Todos los ensayos se realizaron por triplicado

En el cuadro 8 se observa que en la mayoría de las cepas sensibles se necesitaron menores concentraciones del extracto metanólico para alcanzar la CMI a diferencia del extracto puro, esto se puede deber a un probable sinergismo entre los diversos compuestos presentes en el extracto metanólico.

Cuadro 8. Comparación entre la concentraciones mínima inhibitoria (CMI) del extracto metanólico y el compuesto puro de *Ceiba parvifolia*.

BACTERIA	CMI (mg/ml)	CMI (mg/ml)
	EXTRACTO METANÓLICO	COMPUESTO PURO
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25	0.25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.25	0.50
<i>Sarcina lutea</i>	0.50	0.25
<i>Bacillus subtilis</i>	0.75	0.75
<i>Vibrio cholerae</i> Tor	0.25	0.50
<i>V. cholerae</i> cc	0.25	0.50
<i>V. cholerae</i> agua	0.75	0.125
<i>V. cholerae</i> No-01	0.25	0.25
<i>Salmonella typhi</i>	1.00	>2.00
<i>Escherichia coli</i>	1.00	>2.00

Aislamiento del compuesto activo.

El punto de descomposición de la fracción activa (25) de la columna de sílica gel, se logró observar a los 230° C.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la fracción 25 mostró la pureza del compuesto activo aislado de *Ceiba parvifolia*. Dicha cromatografía muestra un solo pico (2.866 min) lo cual indica que la fracción es pura. También se observa una señal más pequeña (3.504 min) que forma parte del mismo compuesto ya que absorbe a la misma longitud de onda (pico máximo de absorción = 280 nm) y el espectro de UV mostró la misma forma gráfica (Figura 7 y 8).

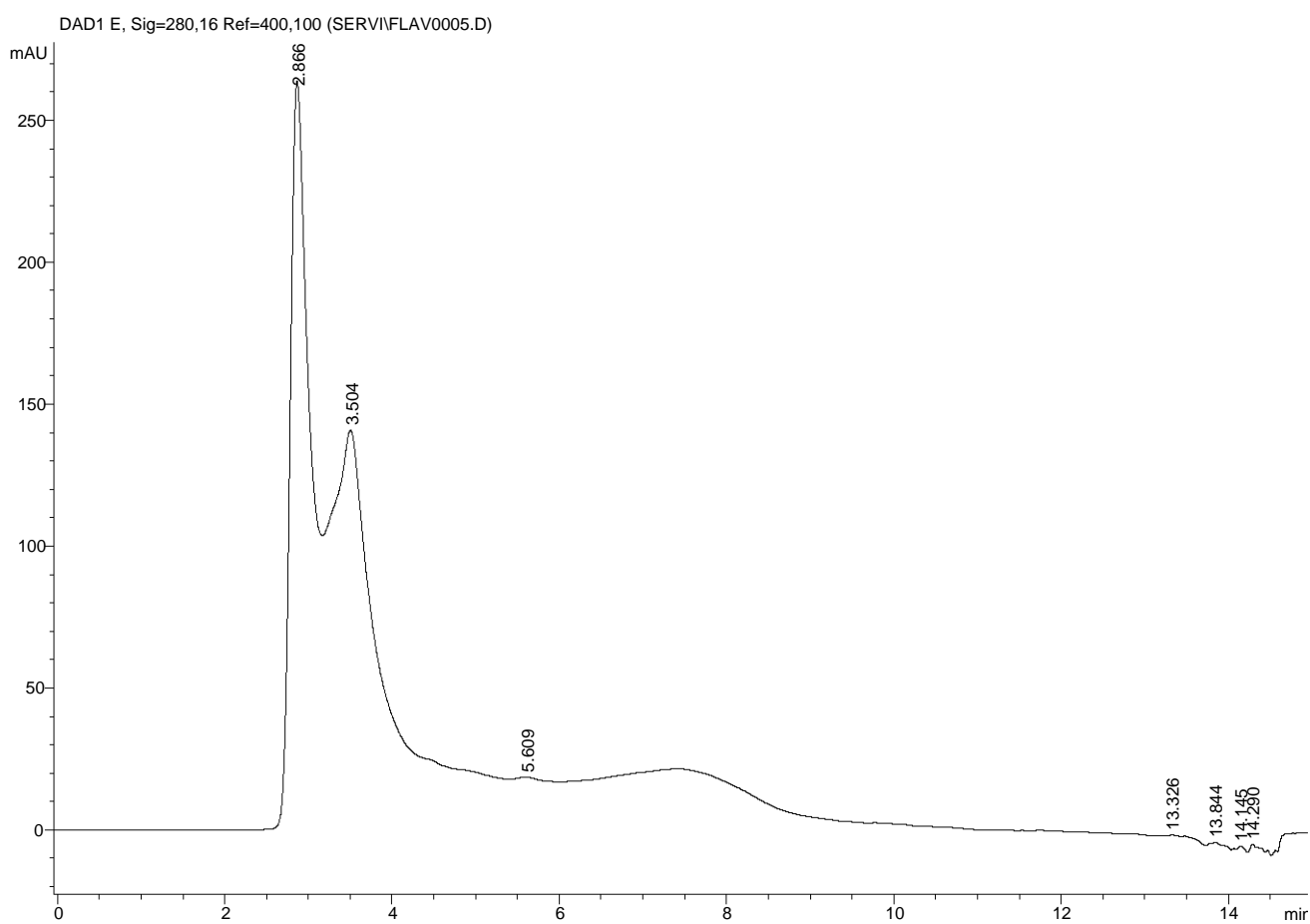


Figura 7. Cromatograma de HPLC de la fracción 25 obtenida de la cromatografía de sílica gel del extracto metanólico libre de grasas de *Ceiba parvifolia*.

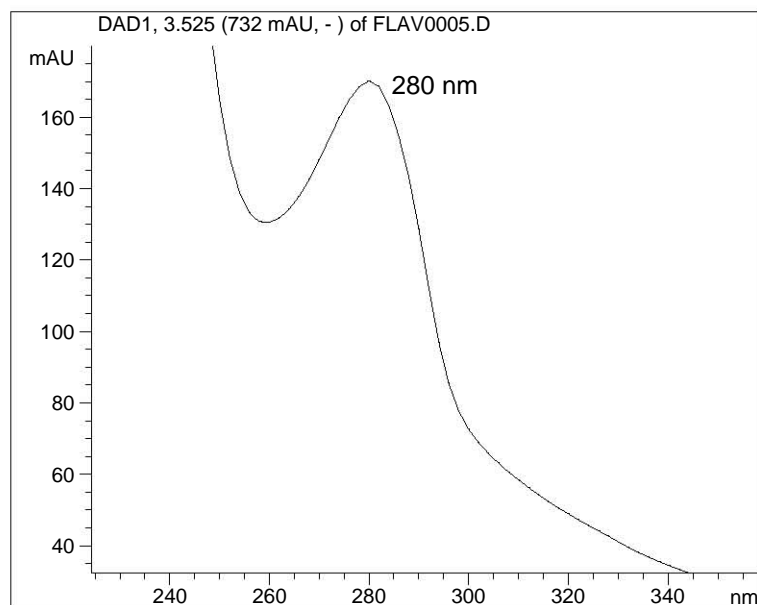


Figura 8. Espectro de UV del compuesto puro con actividad antibacteriana de *Ceiba parvifolia*.

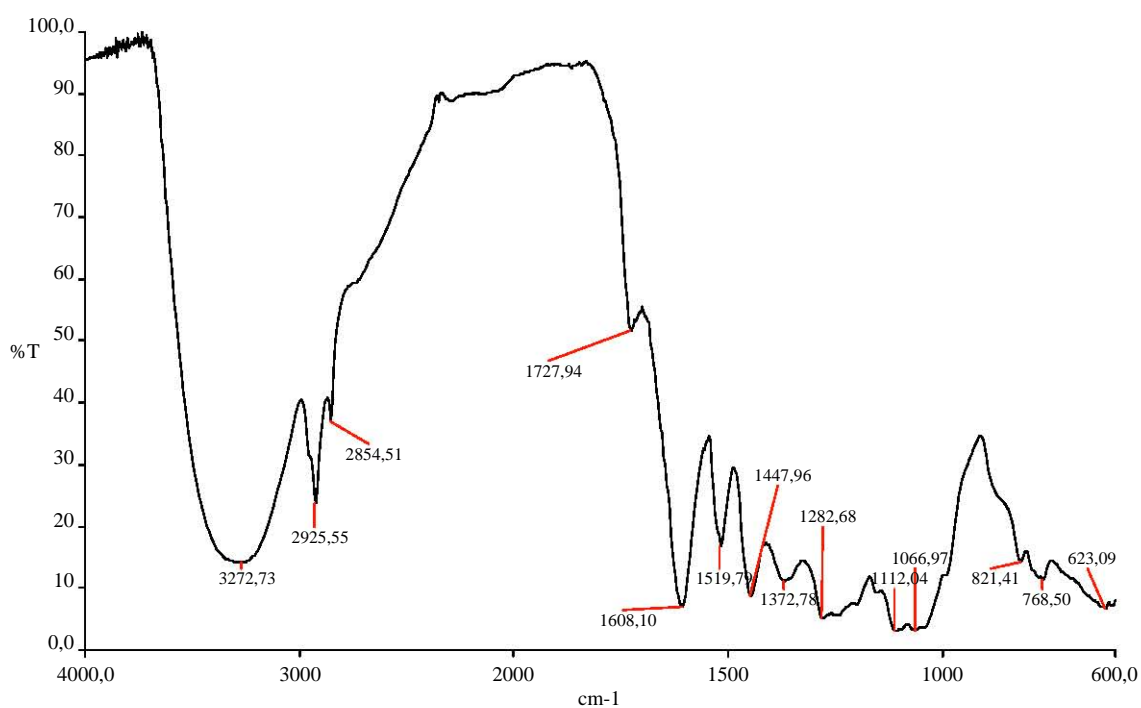


Figura 9. Espectro IR del compuesto puro responsable de la actividad antibacteriana de *Ceiba parvifolia*.

En el espectro de infrarrojo (Figura 9) se puede observar que el compuesto con actividad antibacteriana presenta en su estructura química: el grupo funcional OH (3272.73 cm^{-1}), el alargamiento entre C-C de un anillo (1608.10 cm^{-1}), además la señal a 1519.79 cm^{-1} confirma enlaces entre átomos de carbono sp^2 (C=C) de anillos aromáticos; en 1727.64 cm^{-1} una señal correspondiente al grupo carbonilo.

Mediante un espectro de masas (Figura 10) se obtuvo el peso molecular del compuesto activo, el cual fue de 620.6.

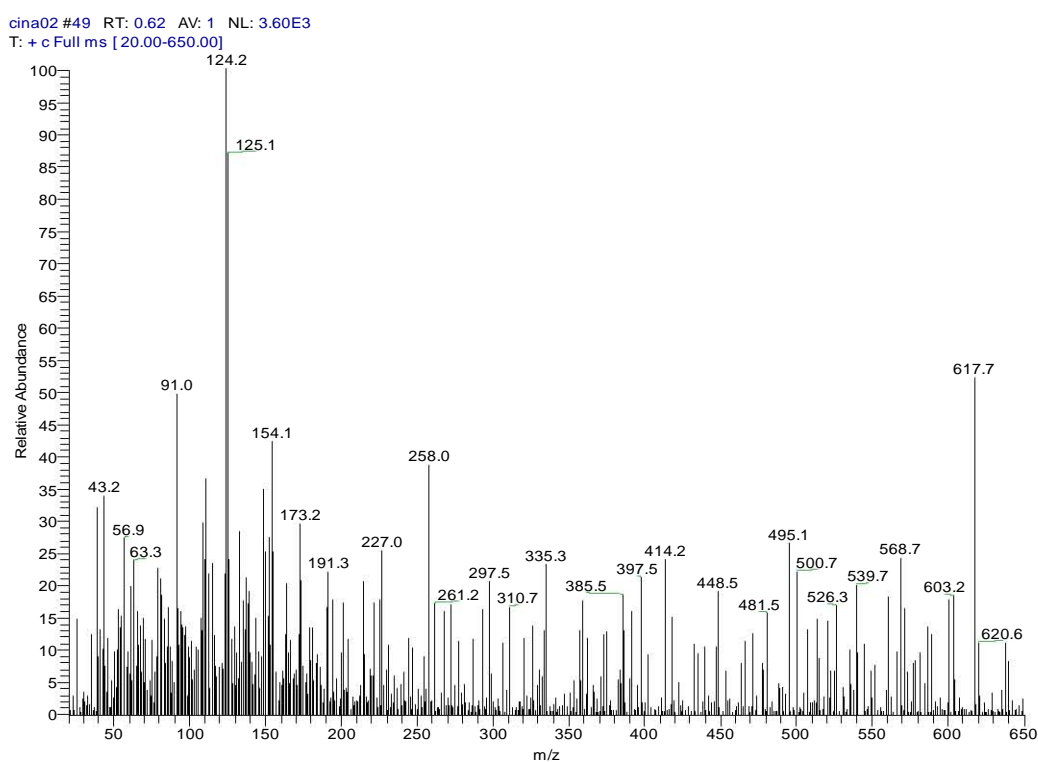


Figura 10. Espectro de masas del compuesto puro de *Ceiba parvifolia*.

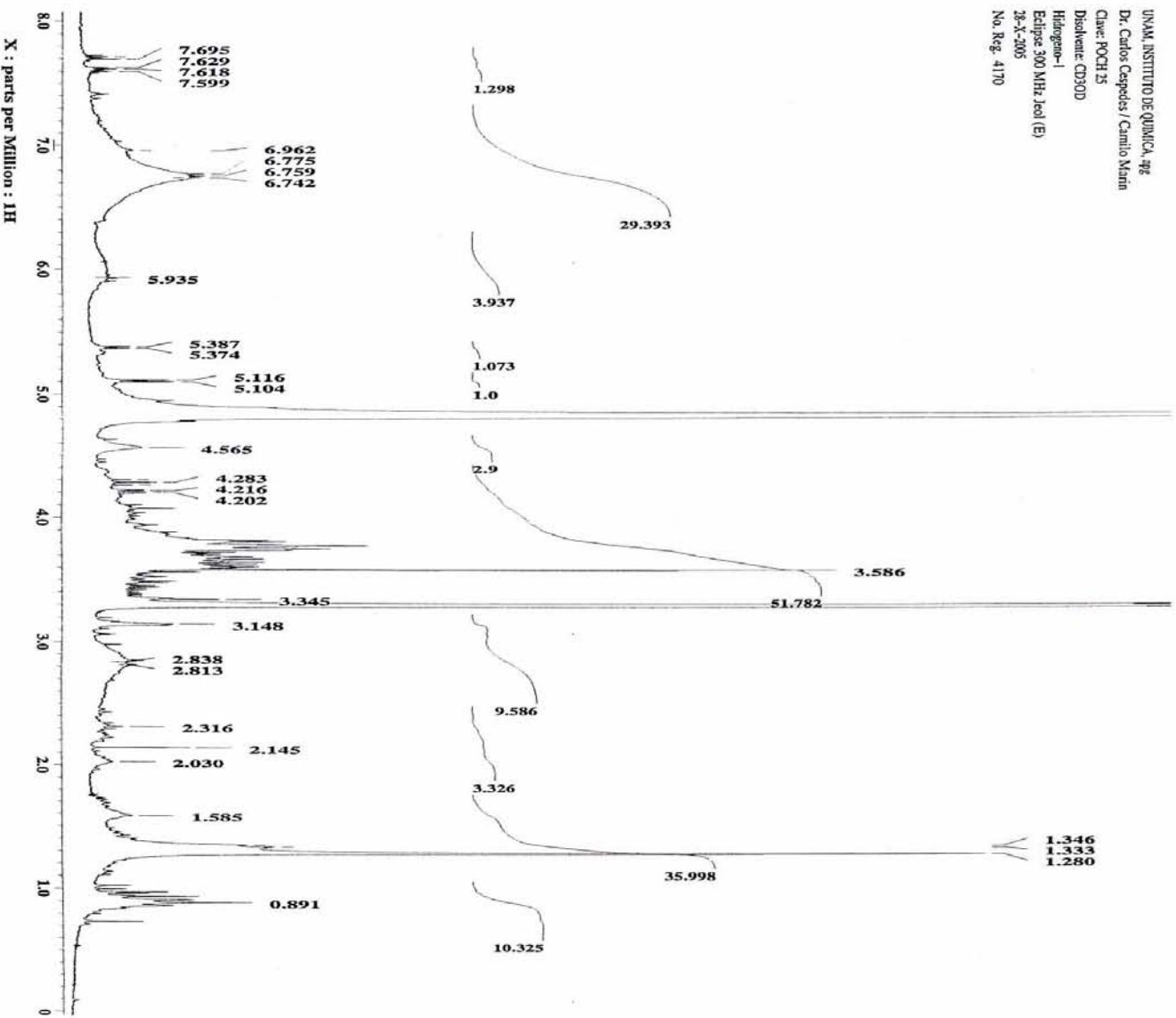


Figura 11. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN¹H) del compuesto puro de *Ceiba parvifolia*.

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, spg
Dr. Carlos Cespedes / Camilo Marin
Clave: POCH 25
Disolvente: CD3OD
Hidrogeno-1
Eclipse 300 MHz Jeol (E)
28-X-2005
No. Reg. 4170

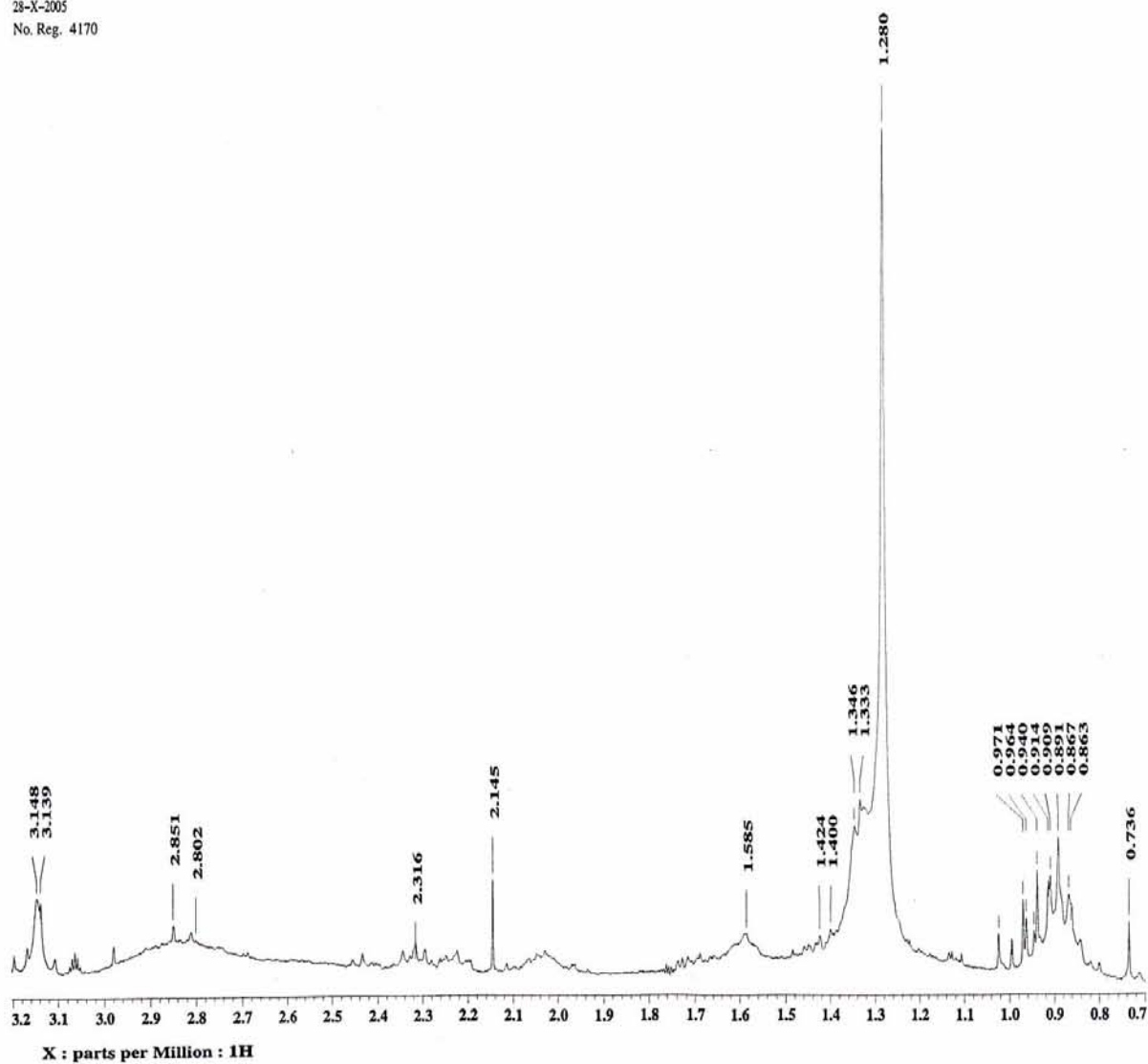


Figura 12. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN¹H) del compuesto puro de *Ceiba parvifolia* (Amplificación de la zona 0.7 a 3.2 ppm).

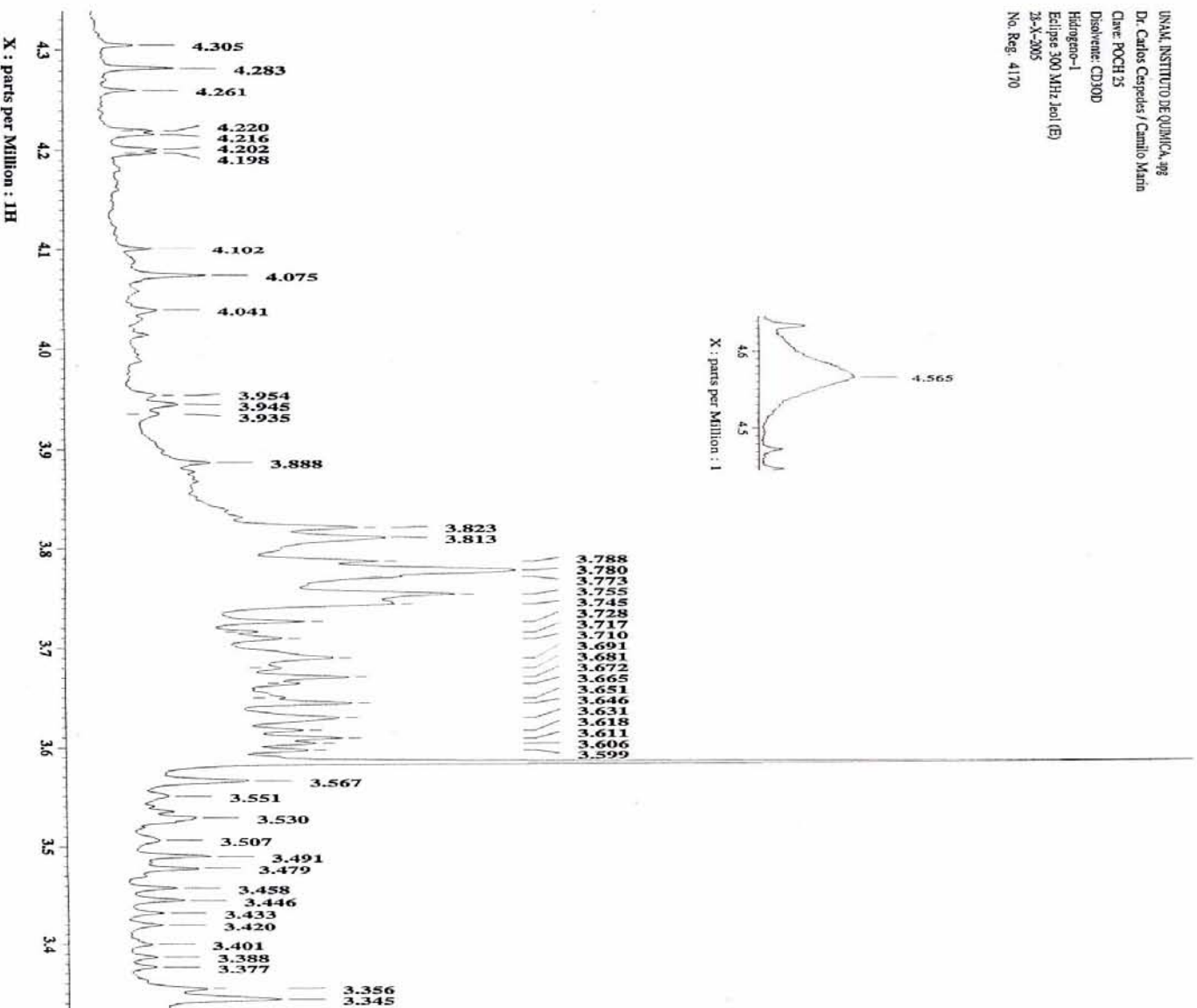


Figura 13. Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN¹H) del compuesto puro de *Ceiba parvifolia* (Amplificación de la zona 3.4 – 4.3 ppm).

El espectro de RMN¹H muestra: la presencia de protones base de alcohol (3.586 – 3.823 ppm); 2 dobletes correspondientes a protones unidos a carbonos anoméricos (5.104 – 5.116 ppm y 5.374 - 5.387 ppm) de azúcares; y en 6.775 ppm la señal de protones aromáticos (Figuras 9,10 y 11). Tomando en cuenta los datos obtenidos, probablemente el compuesto con actividad antibacteriana sea un lignano glucosidado

Por último en la determinación de la presencia de taninos en el extracto, se observó que tanto el extracto metanólico como el compuesto puro no provocaron hemólisis en la sangre, lo cual indica que el compuesto con actividad antibacteriana no es un tanino.

DISCUSIÓN

Rendimiento del extracto

En lo referente al rendimiento de la partición del extracto metanólico (Cuadro 2), se obtuvo que el mayor rendimiento fue la fase polar con 13.11 g (4.148 %) a diferencia de la fase hexánica con 4.62 g, (1.462 %) lo que indica que la planta tiene mayor proporción de compuestos polares. Este hecho era de esperarse, ya que las cortezas principalmente están constituidas de ligninas y lignanos.

Las ligninas están presentes del 15 – 35 % en la mayor parte del tejido de soporte del tallo en la planta y es por eso que es el componente en mayor concentración en xilema y esclerénquima del floema (Preston, 1974).

Los lignanos se obtienen como fragmentos de la degradación de la lignina, ambos están relacionados estructuralmente (tienen en común un ácido residual cinámico). Las ligninas y los lignanos contienen grupos funcionales OH, junto con azúcares y anillos aromáticos, los cuales les dan la característica de ser polares (Croteau et al., 2002).

Actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana observada del extracto metanólico de *Ceiba parvifolia* (Cuadro 3, Figura 4) valida el uso medicinal de esta corteza reportados previamente por Canales et al., 2005.

En estudios previos (Canales et al., 2005) se reporta que la población de San Rafael, usa indistintamente la corteza de *Ceiba parvifolia* y *Juliana adstringens* para aliviar enfermedades de posible origen bacteriano. La actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Juliana adstringens* ha sido comprobada (Canales et al., 2005). Por lo antes mencionado, se esperaba que el extracto metanólico de *Ceiba parvifolia* presentara actividad antibacteriana.

En general los autores: Argueta y Cano (1994), Rocha (2002), Rosas (2003), Canales et al., (2005) reportan el uso del Pochote para aliviar enfermedades relacionadas con infecciones causadas probablemente por bacterias (diarreas, infecciones en los riñones, heridas infectadas, etc), lo cual queda demostrado con los resultados obtenidos en esta investigación.

Por otro lado, se determinó que las bacterias Gram-positivas, en particular *Sarcina lutea* (Figura 6) son más sensibles al extracto metanólico de *Ceiba parvifolia* que las bacterias Gram-negativas. Las características morfológicas de la pared celular de las bacterias, probablemente determine su susceptibilidad (Nicaido y Vaara, 1985). Las bacterias Gram-positivas, a diferencia de las Gram-negativas, tienen una pared gruesa de peptido glucano, la cual es permeable a solutos hidrofílicos (Scherrer y Gerhardt, 1971).

De esta manera, las bacterias Gram-positivas, serán más sensibles a los compuestos polares (Figura 6), que las bacterias Gram-negativas. Con lo anterior se valida científicamente el uso tradicional de *Ceiba parvifolia* (Pochote) por la comunidad de San Rafael, Coxcatlán, Puebla.

Canales et al., (2005), reportan el uso de *Ceiba parvifolia*. (Pochote) para aliviar úlceras. *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram-negativa causante de enfermedades gastroduodenales como: úlceras pépticas, infecciones que debilitan la protección de la capa de mucosa del estómago y duodeno lo que permite que el ácido estomacal junto con la bacteria irriten el revestimiento del intestino causando una llaga o úlcera (Randhir., et al, 2004). Tomando en cuenta que los compuestos de la corteza, inhibieron (aunque en menor grado) a bacterias Gram-negativas, probablemente al consumir en infusión la corteza, se contrarresten las molestias de esta enfermedad.

Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM).

Las concentraciones mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) del extracto metanólico presentaron valores menores que los del compuesto puro con una pequeña diferencia que va de 0.25 – 1.0 mg/ml (Cuadro 9). Probablemente lo anterior se debió a que

en el extracto metanólico interactúan diversos compuestos, haciendo sinergismo (“trabajar juntos”) (Katzung y Trevor, 1997), lo que permite mayor actividad antibacteriana a menor concentración a diferencia del compuesto puro.

Aislamiento del compuesto activo.

El compuesto responsable de la actividad antibacteriana, como se puede ver en el espectro de UV (Figura 8), presenta grupos fenólicos; ya que todos los fenoles, sin excepción, muestran una característica de absorción máxima en la región de 230 -290 nm (Harbone y Dey, 1989).

El número de grupos idénticos en una molécula altera las intensidades relativas de las bandas de absorción en un espectro. Un grupo OH aislado en una molécula producen una absorción relativamente fuerte como se muestra en el lado izquierdo del espectro IR (Figura 9), la cual es una región situada entre 3000 y 3300 cm^{-1} (Fessenden y Fessenden, 1983).

Los enlaces de (C=C) dan lugar a absorciones características de intensidad variable, entre 1600 y 1700 cm^{-1} (5.8-6.2 μm) (Fessenden y Fessenden, 1983). Como lo observado del lado derecho a 1608,10 cm^{-1} del espectro IR (Figura 9).

Mediante lo observado en las diferentes técnicas espectrométricas, probablemente el compuesto responsable de la actividad antibacteriana es un compuesto aromático con grupos OH. Probablemente se trate de una lignano, con posibles azúcares unidos a éste (2 dobletes 5.104 – 5.116 ppm y 5.374 – 5.387 ppm (Figura 11). Los monosacáridos asociados con fenoles incluyen a la glucosa, galactosa, arabinosa, raminosa, xilosa, manosa, apiosa, alosa, fucosa, ácido glucorónico (Harbone y Dey 1989). Entonces se puede pensar que la mayor parte del peso del compuesto (620.6) se deba a la presencia de azúcares.

Actividad antifúngica.

El compuesto puro que se aisló de la corteza de *Ceiba parvifolia* posiblemente se trate de un lignano glucosidado, esta sustancia no tuvo actividad sobre cepas de hongos fitopatogénicos y dermatofitos, esto se puede deber a que probablemente la

estructura química del compuesto aislado no sea la adecuada para actuar sobre los blancos de los antimicóticos como lo son los griseofulvina (desorientación del huso mitótico e inhibición del movimiento cromosómico), polienos (anfotecina B activa sobre esteroides), flúcitosina (se incorpora al ARN) (Greenwood et al., 2002).

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de la corteza de *Ceiba parvifolia* (Pochote) presentó actividad antibacteriana.
- Las bacterias Gram-positivas son más sensibles al extracto metanólico del Pochote.
- El compuesto responsable de la actividad antibacteriana de *Ceiba parvifolia* es de naturaleza polar. Su estructura química está conformada por anillos aromáticos, el grupo funcional OH y presenta azúcares.
- Los compuestos de la corteza del Pochote no presentan actividad antifúngica.
- Los resultados obtenidos validan científicamente el uso tradicional de esta especie.

PERSPECTIVAS

- Es necesario realizar otros estudios para elucidar la estructura química del compuesto con actividad antibacteriana aislado de la corteza de *Ceiba parvifolia*, así se podría investigar en específico su funcionamiento y la interacción con las bacterias.
- Se debe evaluar la toxicidad, del extracto metanólico, así como la del compuesto responsable de la actividad antibacteriana, lo anterior con la finalidad de proponer este compuesto y/o extracto como alternativa en la medicina tradicional.
- Por la actividad del compuesto aislado de la corteza de *Ceiba parvifolia* contra afecciones gastrointestinales que provocan diarreas y pueden ser confundidas con

otros padecimientos, sería recomendable evaluar el compuesto con actividad antibacteriana de la corteza de *Ceiba parvifolia* en otros microorganismos como las amibas, giardias entre otros, también causantes de diarreas.

- Evaluar la actividad antibacteriana espacio-temporal, con la finalidad de observar si en un grado mayor de estrés, el árbol del Pochote llega a producir mayor cantidad de metabolitos secundarios de interés antimicrobiano.

APÉNDICES

Apéndice I

Método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Koneman et al., 1985)

Para evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana de los extractos se realizó:

Medio de cultivo.

Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton (Bioxon 110-1), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. El medio debe alcanzar un espesor uniforme de 4 mm, si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral, aumentando el tamaño de las zonas de inhibición, un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

Inóculo.

Con un asa estéril de poliéster se tocan las superficies convexas de 4 a 5 colonias. Se sumerge el asa en un tubo con 10 ml de caldo Müller-Hinton y se descarga el material. El tubo de cultivo se incuba a 37°C de 18 a 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml. El estándar 0.5 de MacFarland se prepara añadiendo 0.5 ml de sulfato de bario a 99.5 ml de H₂SO₄ 0.36 N. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con el organismo en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales o en su defecto en un espectrofotómetro (Spectronic Milton Roy) a 660 nm.

Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina (NaCl 0.8 %) hasta igualarla. Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlo se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula

la superficie de una placa de agar Müller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance la temperatura ambiente.

Finalmente, se siembra mediante estría en al menos tres direcciones, girando la placa en ángulos de 60° después de cada estría. Se permite que la capa de bacterias se adhieran a la superficie de agar durante un periodo de 5 minutos, después se aplican los sensidiscos con las muestras de las cuales se les evaluará su actividad antimicrobiana.

Aplicación de sustancias.

Para este caso se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman No 5. En todos los casos se hacen diluciones para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto. Se utilizan 2 mg de los extractos y del compuesto puro disueltos en 10 µl de disolvente correspondiente a cada extracto. Al llevar acabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con la sustancia a evaluar se colocan en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril y deben colocarse por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de las pinzas, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo.

Controles negativos.

Discos a los que se les agrega 10 µl del disolvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

Controles positivos.

Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos con 25 µg de cloramfenicol.

Incubación.

Una vez preparadas las placas para la prueba de susceptibilidad, se les colocan en una incubadora a 37°C sin mayor tensión de CO₂. Es preciso evitar presión de CO₂ debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de unos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo que tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Así mismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída de pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición. Se incuba siempre en placas con discos sin sustancias a evaluar como control negativo.

Interpretación de resultados.

Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio en milímetros.

Apéndice II

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM).

Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1985).

En esta técnica la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determinó en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica en este caso, se utilizaron placas con 96 concavidades.

La micro placa se prepara colocando 50 µl de caldo de Mueller-Hinton (Bioxon 260) con las siguientes concentraciones de extracto que se quiere probar (2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125). La placa se prepara 24 horas antes del ensayo con el fin de que se evapore el solvente en el cual se disolvió el extracto.

Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 ml de caldo Mueller-Hinton (Bioxon 260) y se incuba a 35°C durante 24 horas obteniendo

una concentración bacteriana de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/ml. Se hace una dilución en solución isotónica de NaCl 0.8 % para obtener una concentración de 1.5×10^5 bacterias/ml, en cada una de las 96 concavidades se colocan 50 μ l de esta dilución.

Una vez que se encuentra cargada la placa con la suspensión bacteriana, se cubre con su tapa para evitar el desecamiento durante la incubación la cual será a 35°C durante 24 horas. Como control negativo se utilizarán 10 μ l del solvente del extracto y cloramfenicol como control positivo (25 μ g/10 μ l).

Después del tiempo de incubación, se añade a cada cavidad 50 μ l de una solución al 0.08 % de sal de tetrazolio oxidada. La placa se incuba otros 30 minutos. En las cavidades donde se desarrolla el organismo, el colorante es reducido a formazán, de color rojo visible, observándose un botón rojo en el fondo de la cavidad. Donde no hay crecimiento bacteriano, la solución permanece clara.

Apéndice III

Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002)

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas petri (100 X 15 mm) que contengan 10 ml de agar de papa dextrosa, en el cual se inoculan las esporas del hongo. Después que el micelio se ha desarrollado, se colocan discos previamente impregnados con el compuesto activo a concentraciones crecientes (la preparación de los discos es igual a la técnica de difusión en agar).

Incubación.

Las placas son incubadas a 23°C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

Controles negativos.

Discos a los que se les agregará 10 μ l del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 24 horas (al igual que los experimentales).

Controles positivos.

Se evaluó la sensibilidad de la sepas experimentales con sensidiscos de 20 μ g/disco de Ketoconazol.

Interpretación de resultados.

En el caso de existir zonas de inhibición se reportará el extracto como activo, en todos los casos esta prueba se realizó por triplicado.

Apéndice IV

Métodos cromatográficos

Cromatografía de filtración en gel.

1 g de Sephadex LH-20 se hidrató en agua bidestilada. Posteriormente se colocó en una columna de vidrio (diámetro 1.3 cm). Se dejó eluir el exceso de agua y se saturó la columna con metanol.

Posteriormente se colocó la muestra (500 mg) se utilizó como fase móvil metanol. Se colectaron alícuotas de 3 ml cada una.

Cromatografía de sílica-gel.

Para la cromatografía en columna de sílica-gel, se pesaron 10 g de sílica utilizándola como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó un gradiente de polaridad (empezando con diclorometano y finalizando con metanol al 100%). En esta columna se fraccionaron 500 mg de la partición impregnados en celita. Se colectaron alícuotas de 3 ml cada una se fraccionaron en esta columna.

Para el análisis cromatográfico cualitativo en placa fina, se emplearon placas de aluminio (sílica gel 60 F₂₅₄ Merck) con un espesor de 0.20 mm con un indicador de fluorescencia. Para la revelación de la cromatografía se utilizó el sulfato cérico (agente cromógeno) y una lámpara de luz UV (366-254 nm).

Bibliografía

Álvarez, P. V. H. (2002). Estudio químico de *Chamaedora tepejilote liebmex* Mart, con actividad antituberculosa. Tesis de Licenciatura de Biología. FES Iztacala. UNAM. México. 65 pp.

Argueta, V. A. y Cano, A. J. (1994). Atlas de la plantas de la medicina tradicional mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México. Vol. I. 371-372 pp.

Avendaño, A., Casas, A., Davila, P., Lira, R. (en prensa). Use forms, management and comercialization of “pochote” *Ceiba aescualifolia* (H. B. & K.) BRITTEN & Baker f. Subsp. *Parvifolia* (Rose) P. E. Gibas & Semir (Bombacaceae) in Tehuacan Valley, Central Mexico.

Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Durán, A. y Lira, R. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 97: 429-439.

Cowan, M. M. (1999). Plants products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564-565.

Croteau, R., Kutchan, T. M. y Lewir, N G. (2002). Natural Products (Secondary Metabolitos). In: Buchanan B., Gruissem,W., Jones, R. Eds. *Biochemistry and molecular Biology of Plants*. American Society of Plants Physiology. USA. 1250-1318 pp.

Eloff, J. N. (1998). Which extract should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?. *Journal of Ethnopharmacology*. 60:1-8.

Farnsworth, N. R., Akarele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. A., and Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. Bull WHO. 63:965-981.

Fernández, B. M. N. (1999). Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje, en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría de Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D. F. 115 pp.

Fessenden, R. J. y Fessenden, J. S. (1983). Química Orgánica. Grupo Editorial Iberoamericana. México. 1076 pp.

Greenwood, David, Slack, C. B, Peuther, F. J. (2002). Medical Microbiology. 16ª edición. Editorial Churchill Livingstone. 709 pp.

Gros, G. E., Pomilio, B. A., Seldes, M. A. y Burton, G. (1985). Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría General de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington. 147 pp.

Harborne, J. B. y Dey, P. M (1989). Methods in Plant Biochemistry. Vol. 1. Plant Phenolics. Ed. Academic Press. USA.

Harborne, J. B. y Tomas – Barberan, F. A. (1991). Ecological chemistry and biochemistry of plants terpenoids. Oxford University Press. Nueva York. USA. 439 pp.

Hersch, M. P, Gonzales, C. L y Fierro, A. A. (2004). Endogenous knowledge and practice regarding the environment in a Nahua community in México. Agriculture and Human Values. 21: 127-137.

Katzung, G. B. y Trevor. J. A. (1997). Farmacología: auto evaluación y repaso. 2º edición. Editorial. El manual moderno. México. México. 851 pp.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R. y Sommers, H. M. (1985). Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. 909 pp.

Ludlow, W. B. (1980). El Pochote Comunicando n° 40. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Xalapa. Veracruz. México. 1-7 pp.

Medina, S. J. (2000). Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis Licenciatura de Biología. FES Iztacala. UNAM. México. 90 pp.

Nikaido, H. y Vaara, M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews*. 49; 1-32.

Preston, R. D. (1974). The Physical Biology of Plant Cell Walls. Editorial. Chapman and Hall. México. México. 491pp.

Randhir, R., Tong, L. Y. y Shetty, K. (2004). Simulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Process Biochemistry*. 39 637 -646.

Reyes, S. J., Brachet, I. C., Pérez, C. J. Y Gutiérrez, R. A. (2004). Cactáceas y otras plantas nativas de la cañada Cuicatlán, Oaxaca. Ed. UNAM. México. México. 193pp.

Rocha, T. R. (2002). Estudio preliminar de la actividad antibacteriana de las plantas reportadas como medicinales de San Rafael Coxcatlán, Puebla. Tesis Licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. 65 pp.

Rosas, L. R. (2003). Estudio etnobotánico de San Rafael Coxcatlán. Tesis Licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. 95 pp.

Salcedo, S. B. (1997). Insectos precortesianos de la cueva de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Licenciatura de Biología. Facultad de Ciencias UNAM. 6-10 pp.

Scherrer, R. y Gerhardt, P. (1971). Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *Jurnal of Bacteriology* 107, 718-735.

Strohl, R. W. (2000). The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*. 5 (2): 39 – 41.

Trease, G. E. y Evans, W. Ch. (1989). *Farmacognosia*. 13 edición. Editorial Interamericana. MacGraw-Hill. 901pp.

Wang, H. y Bun, N. T. (2002). Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*. 61: 1-6.

Wink, M. (1999). Introduction: biochemistry role and biotechnology of secondary products En: M. Winks, ed. *Biochemistry of secondary Metabolism*. CRC. Press Boca Raten, FL. 1-16 pp.

Zepeda, B. (1985). Estudio Químico de las semillas de dos especies de *Ceiba* del norte del Estado de Yucatán. *Ceiba pentandra* y *Ceiba aesculifolia*. Tesis de licenciatura en Biología. FES Iztacala UNAM. México. D. F