



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
Cyrtocarpa procera KUNTH (CHUPANDILLA)**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

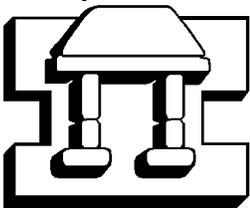
B I Ó L O G A

PRESENTA:

KARLA STEPHANIE MARTÍNEZ ELIZALDE

ASESORA Y DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ



IZTACALA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO.

2009



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. María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Dra. Margarita Canales Martínez.

Dr. Rafael Lira Saade.

Biol. Luis Barbo Hernández Portilla.

Para la realización de esta Tesis se contó con el apoyo de:

CONACyT (Fortalecimiento de Actividades de Tutoría y Asesoría de Estudiantes de Nivel Licenciatura); proyecto No. 101974. 2009.

UNAM PAPCA 2009-2010

UNAM PAPIIT 207808

Plantas útiles de San Rafael, Coxcatlán

(MGU/Useful Plants Project Mexico)

A mis Padres,

con el agradecimiento,

carriño y admiración

que se merecen; Los Amo.

A mi directora de Tesis,

Dra. Ma. Margarita

Canales Martínez,

Por su dedicación, estímulo,

apoyo y cariño.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la FESI por haberme dado la grandiosa oportunidad de desarrollarme en sus aulas y lograr este sueño.

A los profesores que evaluaron y revisaron este proyecto, ya que sus observaciones y consejos ayudaron a concluir el mismo:

A la Dra. María Margarita Canales Martínez, por su gran sabiduría, inmenso apoyo y cariño que siempre tuvo conmigo. Gracias por aceptarme, por la gran amistad que me brindó y por sus valiosas palabras de aliento, en verdad maestra que nunca se lo terminaré de agradecer, la aprecio mucho.

A la Dra. Tzaná Hernández, por todo el apoyo y sus consejos que siempre me manifestó, además de la bonita amistad que me brindó y los detalles que estuvieron presentes durante mi estancia en el laboratorio, Gracias.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez, por sus atinadas observaciones en el proyecto y por compartir conmigo sus valiosos conocimientos.

Al Dr. Rafael Lira, porque siempre estuvo dispuesto a aclarar mis dudas y por sus observaciones que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al Biólogo Luis Barbo Hernández Portilla, por su apoyo técnico para la realización de algunos estudios espectrométricos y porque siempre me apoyo en lo que necesitaba, además de ser un excelente maestro y participar en mi formación como profesionista.

DEDICATORIAS

A Dios:

Por darme la oportunidad de vivir cada día, disfrutando de la compañía de mis seres queridos y por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida y lograr otra meta más en mi carrera.

A mis padres: Carlos y Mercedes:

Porque siempre procuraron darme lo mejor durante todos estos años, por su cariño, comprensión y apoyo sin condiciones ni medida, por la formación que me han dado para ser una persona excepcional, ustedes son mi ejemplo a seguir, ya que tu papi, eres un padre triunfador, honesto, y por esa fortaleza que hasta ahora me has demostrado tener, mami, gracias por darme la vida y la dicha de contemplarte, amarte, respetarte y el orgullo que me da ser tu hija, porque en todo momento y a pesar de las dificultades siempre, siempre estuviste conmigo al pendiente de mi vida, preocupándote y desvelándote por mi.

Porque ustedes son mi gran impulso que me permite seguir adelante, forjando mis sueños y a no bajar la guardia y rendirme, la mejor recompensa que les puedo brindar es esta tesis y mi título de licenciatura. Los amo muchísimo y les agradezco absolutamente todo su esfuerzo por hacerme feliz, les estaré agradecida eternamente.

A mi hermano Bryan:

Porque aparte de ser mi hermano, eres mi tocayo, y aunque eres mi hermano menor has demostrado ser el mayor tanto de estatura como de corazón ☺; gracias porque tú fuiste mi gran compañero de la infancia, a tu lado viví cosas hermosas, los dos nos acompañamos en momentos muy duros, pero tú siempre fuiste junto con mis papás la causa de mi fortaleza y de mis ganas de seguir adelante, también este logro fue gracias a ti, porque puede demostrarte que si se puede a pesar de las adversidades, espero hermanito lindo que tú también en unos años estés escribiendo las dedicatorias de tu tesis, te amo hermano y gracias por tu amor y apoyo.

A mis Amigos:

Jaz, Angie, Melisa, Arely, Tania, porque fueron mi apoyo y mis confidentes durante la carrera, gracias por esas lágrimas y risas que tuvimos juntas, también por las prácticas de campo y por hacer junto con los pollos (Jos, Robert, Salo, Luis A., Luis E. y Lalo) las clases más amenas, aprendí cosas muy valiosas de cada uno de ustedes, muchas gracias por esos momentos inolvidables. A Cali, Sujey León y Erik, porque ustedes fueron las primeras personas que conocí entrando a la carrera y porque aún tenemos una gran amistad, gracias por todo chicos.

A los integrantes del Lab. de Fitoquímica:

Gracias a July, Chio, Mena, Mayris y Gabrielito por hacer del laboratorio un lugar agradable para trabajar, a mi gran compañera Angie le doy las gracias en particular por estar conmigo siempre y por apoyarme en mis experimentos, siempre fuiste mi amiga incondicional, me apoyaste en todo momento y fuiste mi mano derecha en este proyecto TQM.

A mi Amor Josué

Como iba a terminar mi dedicatoria sin mencionarte amor mío, gracias por ser mi compañero incondicional, por todos esos días de trabajo en los que me acompañaste y me ayudaste pero sobre todo me tuviste paciencia en mi desesperación.

Por todo este tiempo que hemos compartido juntos, tiempo de risas, enojos, lágrimas, confianzas: GRACIAS; en fin mi amor eres especial en mi vida y el que me llena día a día y me enseña lo que es querer y ser querido, te admiro y te respeto Jos, porque tú también terminas la licenciatura y consigues una de las muchas metas que tienes y la compartes conmigo. TE AMO!!!!

Y a todos aquellos que de alguna manera, compartieron conmigo y son parte de este gran logro.

A todos, mil gracias.

Índice de contenido

Índice de Figuras	i
Índice de Cuadros.....	ii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS PARTICULARES.....	5
METODOLOGÍA	6
Colecta del material.....	6
Obtención de los extractos.....	6
Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	6
Evaluación de la actividad anitbacteriana.....	7
Evaluación cualitativa.....	7
Evaluación cuantitativa.....	7
Actividad de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	8
Evaluación de la actividad antifúngica.....	8
Evaluación cualitativa.....	8
Evaluación cuantitativa.....	8
Prueba de Toxicidad general.....	8
Pruebas estadísticas.....	9
Evaluación Antioxidante.....	9
Fraccionamiento Biodirigido.....	9
Detección cualitativa de metabolitos secundarios.....	9
RESULTADOS	10
Colecta de la planta.....	10
Rendimiento del extracto.....	10
Actividad antibacteriana.....	12
Evaluación Cualitativa.....	12
Evaluación Cuantitativa.....	13
Actividad del extracto M2 sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	14

Fraccionamiento del extraco metanólico libre de compuestos no polares (M2).....	15
Determinación de CMI y CBM de la fracción activa	18
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	20
Actividad antifúngica.....	21
Evaluación Cualitativa.....	21
Evaluación Cuantitativa.....	21
Toxicidad general.....	23
Actividad Antioxidante	23
Detección de metabolitos secundarios	24
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	30
PERSPECTIVAS	30
APÉNDICE 1 Descripción botánica de la planta estudiada.....	31
APÉNDICE 2 Zona de colecta.....	34
APÉNDICE 3 Técnica de Maceración.....	37
APÉNDICE 4 Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer.....	37
APÉNDICE 5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM).	41
Microtécnica de dilución en caldo	42
APÉNDICE 6 Actividad de los extractos sobre la curva de crecimiento.....	43
APÉNDICE 7 Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial	43
Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial.....	44
APÉNDICE 8 Método de toxicidad general.....	45
APÉNDICE 9 Método de Reducción del Radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH).....	46
REFERENCIAS	48

Índice de Figuras

Figura 1: Rendimiento de los extractos de <i>C. procera</i>	11
Figura 2: Halos de Inhibición del extracto M1 de la corteza de <i>C. procera</i>	13
Figura 4: Actividad del extracto M2 sobre la curva de crecimiento de <i>S. epidermidis</i>	15
Figura 3: Actividad del extracto M2 sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> Tor	15
Figura 5: Actividad de la fracción 7 sobre la curva de crecimiento de <i>S. epidermidis</i>	19
Figura 6: Actividad de la fracción 7 sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> Tor	19
Figura 7: Comparación de los cromatogramas de las fracciones 5, 6 y 7.	20
Figura 8: Determinación de la CF ₅₀ del extracto M1y de M2 de <i>C. procera</i> sobre <i>T. mentagrophytes</i>	23
Figura 9 Comparación del % de reducción de los extractos M1 y M2 de <i>C. procera</i>	24
Figura 10: <i>Cyrtocarpa procera</i>	32
Figura 11: Mapa de la distribución geográfica de <i>Cyrtocarpa procera</i>	33
Figura 12: Ubicación geográfica del poblado de San Rafael	34

Índice de Cuadros

Cuadro 1: Datos etnobotánicos de la especie.....	10
Cuadro 2: Rendimiento de los extractos de la corteza de <i>C. procera</i>	11
Cuadro 3: Actividad antibacteriana del extracto metanólico crudo (M1) de <i>C. procera</i>	12
Cuadro 4: Determinación de CMI y CBM de los extractos de <i>C. procera</i> en mg/mL.....	14
Cuadro 5: Fraccionamiento del extracto metanólico libre de grasas (M2) mediante cromatografía en columna.....	16
Cuadro 6: Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna abierta del extracto M2.....	17
Cuadro 7: Determinación de CMI y CBM de la fracción 7 en mg/mL.....	18
Cuadro 8: Compuestos presentes en las fracciones 5, 6 y 7.	20
Cuadro 9: Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los extractos de <i>C. procera</i>	21
Cuadro 10: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>Cyrtocarpa procera</i> sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	22
Cuadro 11: Toxicidad general del extracto M1 de <i>C. procera</i> sobre <i>Artemia salina</i>	23

RESUMEN.

La corteza de *Cyrtocarpa procera* (Chupandilla) es usada por los habitantes de San Rafael, Coxcatlán, Puebla para aliviar heridas infectadas y padecimientos de las vías urinarias; en otras partes de la República Mexicana es utilizada para resolver trastornos como la diarrea y disentería. En este trabajo, se determinó la actividad antibacteriana y antifúngica, así como la toxicidad general del extracto metanólico (M1), metanólico libre de compuestos no polares (M2) y hexánico de la corteza de *Cyrtocarpa procera*. Se evaluó la actividad antibacteriana (método de difusión en agar de Kirby–Bauer en 13 cepas bacterianas y 5 levaduras) y antifúngica (método cualitativo de inhibición del crecimiento radial en 5 cepas fúngicas). Así mismo, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) por la técnica de dilución en agar. Se determinó la actividad del extracto sobre el crecimiento bacteriano. La actividad antioxidante se evaluó por el método de reducción del DPPH. La toxicidad general se determinó utilizando larvas nauplio II de *Artemia salina*. Mediante una cromatografía en columna abierta, se obtuvo la fracción más activa responsable de la actividad antibacteriana. El extracto hexánico no mostró actividad antimicrobiana. Los extractos M1 y M2 inhibieron el crecimiento de 12 de las 13 cepas de bacterias utilizadas (9 Gram negativas y 3 Gram positivas). Las cepas bacterianas más sensibles a los dos extractos fueron: *Sarcina lutea* y *Staphylococcus epidermidis* (CMI= 0.25 mg/mL). M2 mostró un efecto bacteriostático frente a *S. epidermidis* y *Vibrio cholerae* Tor a una concentración de 0.25, 0.5 y 0.75 mg/mL y 0.125, 0.25 y 0.75 mg/mL respectivamente. Ambos extractos mostraron actividad antifúngica sobre *Trichophyton mentagrophytes* (M1 CL₅₀= 0.3 mg/mL; M2 CL₅₀= 1.2 mg/mL). De las fracciones obtenidas de la cromatografía en columna abierta, la fracción más activa fue la 7 y comparando los resultados con los extractos M1 y M2, esta fracción tuvo mayor actividad al mostrar valores más pequeños en la CMI y CBM para todas las cepas ensayadas. La actividad antioxidante de los extractos M1 y M2 mostraron el valor de Cl₅₀= 4.6 µg/mL Respecto a la toxicidad ambos extractos resultaron ser altamente tóxicos. Estos resultados justifican el uso tradicional de la corteza de la Chupandilla.

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth (Chupandilla)*

INTRODUCCIÓN.

México es un país de gran diversidad florística ya que cuenta con muchas especies de plantas con flor que contienen sustancias de valor medicinal (Rzedowski y Equihua, 1987).

Su población posee un profundo conocimiento de su medio ambiente ya que a través del tiempo y de un largo proceso de aprendizaje, ha sabido apropiarse de esos recursos naturales y ha encontrado numerosos usos a las plantas como por ejemplo el medicinal (Ankli et al., 2002, Frei et al., 1998, Henrich et al., 1998). Las plantas medicinales son el recurso terapéutico por excelencia y forman parte importante de la medicina tradicional mexicana por lo que representa una alternativa para la implementación de nuevos planes de salud, que combinen el conocimiento popular con el científico (Argueta y Cano, 1994; Aguilar y Camacho, 1984).

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).

Por tal motivo es importante estudiar los metabolitos secundarios pues por lo general se biosintetizan a partir de los primarios (clorofilas, proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, etc.), esta es la principal razón por la que forman parte de las investigaciones fitoquímicas que comprenden: extracción de la planta; separación y aislamiento de los componentes de interés; caracterización de los compuestos aislados; investigación de las rutas biosintéticas referida a

compuestos determinados, y valoraciones cuantitativas (Vivanco et al., 2005; Traese y Evans, 1987; Gros et al., 1985).

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); por este motivo los estudios fitoquímicos son una parte importante dentro de las investigaciones encaminadas a encontrar nuevos compuestos y formas de preparación de medicamentos ya que la fitoquímica se encarga de elucidar la estructura química de estos compuestos, su biosíntesis, su metabolismo y su distribución natural (Harborne, 1973). Existe un gran número de metabolitos secundarios que han presentado actividad antimicrobiana por ejemplo: terpenos, aminas, saponinas, flavonas, etc. (Cowan, 1999).

En particular, en este trabajo se estudió la actividad antimicrobiana de la corteza de *Cyrtocarpa procera* (Chupandilla) (Apéndice 1) de la localidad de San Rafael Coxcatlán ubicado en el estado de Puebla ya que se reporta como una de las especies utilizadas dentro de la medicina tradicional para resolver trastornos como la diarrea, disentería y heridas infectadas así como para bajar la fiebre, contra la lepra y para aliviar infecciones de vías urinarias (Canales, 2005; Argueta y Cano, 1994).

ANTECEDENTES

En las revisiones de la literatura taxonómica y etnobotánica, la familia Anacardiaceae cuenta con muy pocos registros del uso medicinal de la especie *Cyrtocarpa procera* (Chupandilla), por lo tanto es de suma importancia el estudio de la misma.

Ojewole, 2005, examinó la actividad antiinflamatoria, analgésica y antidiabética del extracto acuoso de la corteza y tallo de *Mangifera indica* Linn, un miembro de la familia Anacardiaceae. Ésta especie presentó actividad significativa, los diferentes componentes químicos de la planta, son especialmente polifenoles, flavonoides, triterpenoides, mangiferina, y otros compuestos químicos

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth (Chupandilla)*

presentes en la planta que participan en la actividad antiinflamatoria, analgésica y efecto hipoglucemiante.

Maiga et al., 2006, evaluaron la actividad antioxidante de diversas plantas, entre ellas *Lanea velutina* (Anacardiaceae), encontrando que la raíz, corteza y tallo son ricos en antioxidantes.

Canales et al., 2005, realizaron un estudio sobre la actividad antibacteriana de la flora medicinal de San Rafael, en el municipio de Coxcatlán, Puebla, los estudios preliminares revelaron que la corteza de *C. procera* fue activa sobre 6 cepas bacterianas.

Canales et al., 2006, realizaron un estudio sobre el conocimiento tradicional de la flora medicinal de San Rafael, en el municipio de Coxcatlán, Puebla, encontrando que la corteza de *C. procera* se utiliza como té para aliviar dolor de riñones.

Rodríguez-López et al., 2006, obtuvieron el extracto de la corteza de *C. procera* con hexano seguido de diclorometano y acetona, estos extractos fueron evaluados para determinar su toxicidad en *Artemia salina*. Todos los extractos demostraron una actividad significativa y el fraccionamiento de estos extractos condujo al aislamiento de β - sitosterol, la identificación de varios compuestos como el 1,3-propil-dipentadecanoato 3-hydroxipropil-9-octadecanoato, pentadecilbenzeno, eicosilbenzeno, docosano, heptacosano dotriacontano y de 2,6,10-trimetiltetradecano.

C. procera es poseedora de una gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales le atribuyen a la planta diversas actividades biológicas. Tomando en cuenta lo antes mencionado los objetivos de este trabajo son:

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la actividad antimicrobiana, antioxidante y toxicidad general de la corteza de *Cyrtocarpa procera* Kunth.

OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Obtener el extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera* mediante la técnica de maceración.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana (método de difusión en agar de Kirby Baüer e inhibición del crecimiento radial), toxicidad general (técnica sobre *Artemia salina*) y la actividad antioxidante (método de oxidación del DPPH) del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera*
3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Bactericida Mínima (CBM); la Concentración Fungicida Media (CF₅₀) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM) por el método de macrodilución en agar del extracto metanólico de *Cyrtocarpa procera*.
4. Realizar el fraccionamiento biodirigido (cromatografía en columna abierta) para obtener la fracción (s) de mayor actividad.

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

METODOLOGÍA

Colecta del material

La corteza de *C. procera* se colectó en Agosto del 2007 en la localidad de San Rafael, Coxcatlán, Puebla (Apéndice 2). Un espécimen fue depositado en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (IZTA) con el siguiente número de registro: MPF 371.

Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos herbales, se tomaron 1009.5 gr de la corteza de la planta seca de *Cyrtocarpa procera*; una vez molida se obtuvo el extracto metanólico crudo (M1) mediante la técnica de maceración descrita por Domínguez, (1973) (Apéndice 3). Se realizó una partición con todo el extracto crudo con metanol y hexanos para determinar que polaridad presentaba la actividad antimicrobiana y para ver si ésta incrementaba. De esta forma se obtuvo el extracto metanólico libre de compuestos no polares (M2) y el extracto hexánico. Los extractos se filtraron y se concentraron a sequedad a presión reducida. El rendimiento de los extractos se determinó por diferencia de peso con relación al peso seco de la planta

Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Microorganismos utilizados.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se emplearon los siguientes microorganismos:

Bacterias:

Vibrio cholerae No-01 (no patógena), *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislada de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislada de un caso clínico, *Vibrio cholerae* CDC V 12, las cuales corresponden al grupo 01, productor de enterotoxina, serotipo Inaba, biotipo El Tor, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Salmonella typhi* ATCC 19430, donadas por el laboratorio de microbiología de la FES-Cuautitlán. *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Yersinia enterocolitica* y *Sarcina lutea* donada por el laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI del Campus Iztacala. *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermis* donadas por la FES-Cuautitlán.

Hongos:

Aspergillus niger, *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium sporotrichum* ATCC NRLL3299, *Fusarium moniliforme* donadas por el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO, FES-Iztacala y *Rhizoctonia solani* por el INIFAP, Celaya, México.

Levaduras:

Candida albicans ATCC 14065, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Cryptococcus neoformans* donadas por el laboratorio de Micología y Parasitología de la Facultad de Medicina UNAM. Dr. Rubén López Martínez (responsable) Dra. Patricia Manzano Gayoso. *Candida albicans* aislada de un caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Evaluación cualitativa.

La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Bauer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 4). Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con Cloramfenicol (25 µg por disco). Los discos fueron impregnados con 2000 µg del extracto a probar. Como controles negativos se utilizaron sensidiscos con el solvente empleado (10µL) para evitar errores en los resultados y comprobar que no tienen ningún efecto sobre los microorganismos. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado. Esta misma metodología se aplicó para las levaduras.

Evaluación cuantitativa.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se utilizó la técnica de dilución en agar (Koneman, 1996) (Apéndice 5). Las concentraciones empleadas para los bioensayos cuantitativos fueron las siguientes: 2, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 2.5, 0.125 mg/mL.

Para determinar la CMI y CBM de la fracción activa de la columna de silica gel, se utilizó la microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1996) (Apéndice 5). Las concentraciones empleadas para los bioensayos cuantitativos fueron las siguientes: 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.031, 0.015, 0.007, 0.003 mg/mL.

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

Actividad de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano.

Para determinar si el extracto tenía un efecto bactericida o bacteriostático se evaluó su actividad sobre la curva de crecimiento bacteriano, para lo cual se preparó un tubo para cada concentración del extracto a evaluar ($\frac{1}{2}$ MIC, MIC y CBM) y se muestreó desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora durante los cuatro primeros tiempos, después dos muestras con intervalos de dos horas, una muestra a las 12 horas y finalmente a las 24 horas (Ávila, 1996) (Apéndice 6).

Evaluación de la actividad antifúngica.

Evaluación cualitativa

Para el análisis cualitativo se utilizó la técnica de inhibición del crecimiento radial (Apéndice 7) usando una concentración de 2000 μg por disco del extracto a probar y como control positivo Ketoconazol (0.007 mg) y como control negativo se utilizarán sensidiscos impregnados con 10 μL de metanol (Wang y Bun, 2002).

Evaluación cuantitativa.

Para la determinación de la concentración fungicida media (CF_{50}) y la concentración fungicida mínima (CFM), se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial reportado por Wang y Bun, 2002 (Apéndice 7). Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL. cada bioensayo se realizó por triplicado.

Prueba de Toxicidad general:

La prueba de toxicidad general en crustáceos de agua salina *in vivo* se llevó a cabo usando el extracto metanólico de la corteza sobre larvas de *Artemia salina* (Leach). Siguiendo el método modificado de Niño et al. (2006) con las concentraciones: 1.0, 0.10 y 0.010 mg/mL, los ensayos se hicieron por triplicado (Apéndice 8).

Pruebas estadísticas

A los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana se les realizó un análisis de varianza (ANOVA de dos factores) para determinar si existen diferencias significativas en la sensibilidad de las cepas bacterianas.

Evaluación Antioxidante

La evaluación antioxidante se llevó a cabo mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) método modificado de Murillo (2006) (Apéndice 9). Se evaluó el extracto a diferentes concentraciones (2-30 ppm).

Fraccionamiento Biodirigido

La cromatografía en columna abierta se realizó con 50 gr del extracto M2, la fase móvil consistió en mezclas de acetato de etilo y metanol en orden creciente de polaridad.

A las fracciones que presentaron actividad se les realizó una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) con las siguientes condiciones: columna Discovery C-18, con las siguientes características: 250 x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5 µm, se corrió de forma isocrática con una mezcla de metanol-acetonitrilo-agua (25-25-50) con un flujo de 1 mL/min y con un detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda de 260nm y realizando un barrido completo de 200-400 nm. Esta cromatografía se realizó a tres fracciones las fracciones 5, 6 y 7 obtenidas de la cromatografía en columna abierta

Detección cualitativa de metabolitos secundarios

Fenoles

Se tomó una muestra de los extractos M1, M2 y la fracción 7 diluidos en metanol y se le agregó cloruro férrico. En caso de dar positivo para fenoles se obtendrá un precipitado verde oscuro que sugiere derivados de catecol o un color azul intenso indicando derivados del pirogalol (Domínguez, 1973).

Alcaloides:

Por la gran heterogeneidad de los alcaloides existen numerosas pruebas coloridas o de precipitación que sólo son positivas con ciertos grupos de alcaloides, por lo que se han propuesto

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth (Chupandilla)*

para clasificaciones parciales. En este caso se utilizaron unas gotas del reactivo de Dragendorff, ya que al agregarlo precipita y da una coloración anaranjado-marrón, dando así positivo en el contenido de alcaloides (Domínguez, 1973).

También se comprobó la presencia de alcaloides con el reactivo de Mayer, para lo cual se disolvió un poco del extracto en metanol, se le agregaron unas gotas del reactivo de Mayer, si al agregarlo se observa un color amarillo blanquecino, entonces es positivo (Domínguez, 1973).

Carbohidratos:

Se utilizó el extracto metanólico diluido con un poco de metanol, se le agregó una pequeña cantidad de alfa-naftol, posteriormente se vertió ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo. Para obtener una coloración rojo-violeta en caso de ser positivo (Miller y Solomon, 2001).

RESULTADOS

Colecta de la planta.

La corteza del árbol de *C. procera* (Chupandilla) fue colectada en el mes de Agosto del 2007 en la localidad de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Los datos de la especie se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1: Datos etnobotánicos de la especie

Nombre científico	<i>Cyrtocarpa procera</i>
Nombre común	Chupandilla
Familia	<i>Anacardiaceae</i>
Parte utilizada	Corteza
Forma de uso	Infusión

Rendimiento del extracto

El rendimiento del extracto libre de compuestos no polares (M2) de la corteza de *C. procera* (Chupandilla) fue de 126.79g; tuvo un mayor rendimiento en comparación al extracto hexánico lo

cual indica que esta especie posee una mayor cantidad de compuestos de polaridad alta (Cuadro 2, Figura 1).

Cuadro 2: Rendimiento de los extractos de la corteza de *C. procera*.

Extracto	Peso	%
M1	131.59g	(13.03%)
M2	126.79g	(12.55%)
Hexánico	4.8g	(0.47%)

M1: extracto metanólico crudo, M2: extracto metanólico libre de compuestos no polares.

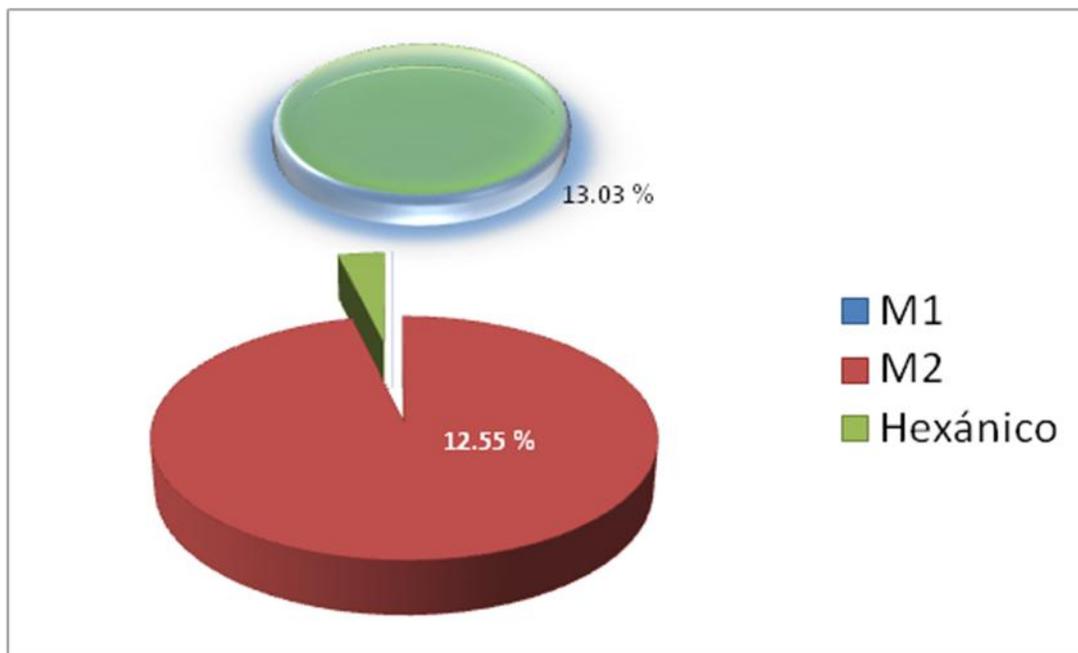


Figura 1: Rendimiento de los extractos de *C. procera*

El rendimiento en porcentaje de *C. procera* se calculó con respecto a 1009.5 gr de corteza seca.

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

Actividad antibacteriana

Evaluación Cualitativa

La evaluación de la actividad antibacteriana del extracto M1 de la corteza de *C. procera*, mostró que tuvo actividad sobre 12 de 13 cepas bacterianas empleadas, la bacteria que presentó los halos de inhibición más grandes fue *S. lutea* (10.00 ± 0.00); mientras que en *V. cholerae* No.01 no se observaron halos de inhibición (Cuadro 3, Figura 2). El extracto hexánico no mostró actividad sobre ninguna cepa bacteriana.

Los resultados del análisis de varianza de dos factores (ANOVA) muestran que no hay diferencias significativas ($P < 0.05$; $F = 1.8$) entre la sensibilidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas al aplicarles el extracto M1.

Cuadro 3: Actividad antibacteriana del extracto metanólico crudo (M1) de *C. procera*.

Bacteria	Halos de Inhibición
<i>S. aureus</i>	7.67 ± 0.57
<i>S. epidermidis</i>	9.00 ± 1.00
<i>B. subtilis</i>	7.00 ± 0.00
<i>S. lutea</i>	10.00 ± 0.00
<i>V. cholerae</i> No-01	7.66 ± 1.15
<i>V. cholerae</i> agua	7.00 ± 0.00
<i>V. cholerae</i> caso clínico	7.66 ± 1.15
<i>V. cholerae</i> Tor	7.33 ± 0.57
<i>E. coli</i>	7.00 ± 0.00
<i>E. agglomerans</i>	6.00 ± 0.00
<i>E. aerogenes</i>	6.00 ± 0.00
<i>S. typhi</i>	7.00 ± 1.00
<i>Y. enterocolitica</i>	7.66 ± 0.57

Halos de inhibición en mm; valor promedio de 3 repeticiones; el extracto probado fue con una concentración de 2mg/10µl por sensidisco. Todas las especies bacterianas mostradas fueron sensibles al cloramfenicol (25 µg/disco).

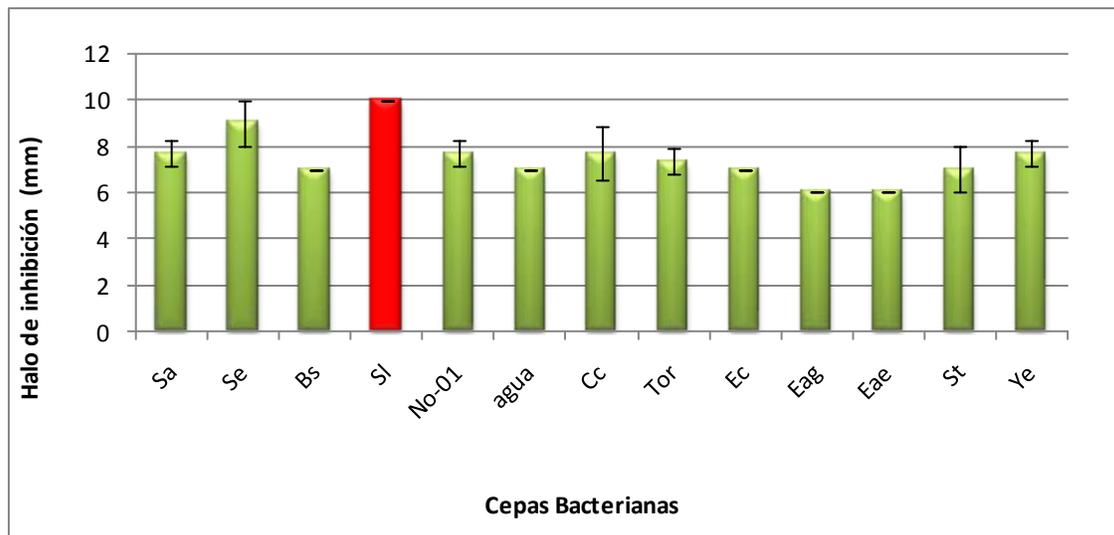


Figura 2: Halos de Inhibición del extracto M1 de la corteza de *C. procera*.

Sa: *S. aureus*; Se: *S. epidermidis*; Bs: *B. subtilis*; Sl: *S. lutea*; No-01: *V. cholerae* No-01; agua: *V. cholerae* aislada de agua; Cc: *V. cholerae* aislada de un caso clínico; Tor: *V. cholerae* Tor; Ec: *E. coli*; Eag: *E. agglomerans*; Eae: *E. aerogenes*; St: *S. typhi*; Ye: *Y. enterocolitica*.

Evaluación cuantitativa

Los resultados obtenidos de la determinación de la CMI y CBM de los extractos (M1 y M2) se muestran en el cuadro 4, donde se observa que para el extracto M1 la bacteria más sensible fue *S. lutea*, pues requiere bajas concentraciones para inhibir su crecimiento (CMI=<0.125; CBM= 0.5mg/mL). Las cepas de *E. coli*, *E. agglomerans*, *E. aerogenes*, *S. typhi* son las menos sensibles al requerir concentraciones mayores a 2.0 mg/mL de extracto para inhibir su crecimiento.

Con respecto al extracto M2 se puede apreciar que para inhibir el crecimiento de todas las cepas bacterianas utilizadas (excepto *S. lutea*) se necesita una menor concentración de este extracto en comparación con el extracto M1; teniendo así que las bacterias Gram positivas requieren concentraciones menores del extracto M2 para inhibir su crecimiento, mientras que las Gram negativas, requieren de concentraciones mayores.

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

Cuadro 4: Determinación de CMI y CBM de los extractos de *C. procera* en mg/mL.

Bacteria	Extracto M1		Extracto M2	
	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>S. aureus</i>	1.00	2.00	0.50	0.75
<i>S. epidermidis</i>	1.50	2.00	0.50	0.75
<i>B. subtilis</i>	1.50	2.00	0.75	1.00
<i>S. lutea</i>	<0.125	0.125	<0.125	0.125
<i>V. cholerae</i> No-01	1.50	2.00	0.25	0.75
<i>V. cholerae</i> agua	1.00	2.00	0.50	1.00
<i>V. cholerae</i> cc	1.50	2.00	0.50	1.00
<i>V. cholerae</i> Tor	1.00	2.00	0.25	0.75
<i>E. coli</i>	>2.00	>>2.00	2.00	>2.00
<i>E. agglomerans</i>	>2.00	>>2.00	2.00	>2.00
<i>E. aerogenes</i>	>2.00	>>2.00	2.00	>2.00
<i>S. typhi</i>	>2.00	>>2.00	2.00	>2.00
<i>Y. enterocolitica</i>	0.75	2.00	0.25	0.75

Actividad del extracto M2 sobre la curva de crecimiento bacteriano

El efecto del extracto M2 sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis* y *V. cholerae* Tor se observa en las figuras 3 y 4 respectivamente; el efecto es bacteriostático ya que para *S. epidermidis* aplicando concentraciones de 0.25, 0,5 y 0,75 mg/mL el crecimiento bacteriano disminuye siguiendo una línea recta por abajo del testigo; el mismo comportamiento bacteriostático se observó para *V. cholerae* Tor, sólo que para esta bacteria se requirieron concentraciones de 0,125, 0,25 y 0,75 mg/mL y como se observa en la figura 4 el crecimiento bacteriano es menor con el transcurso del tiempo aplicando la concentración más alta.

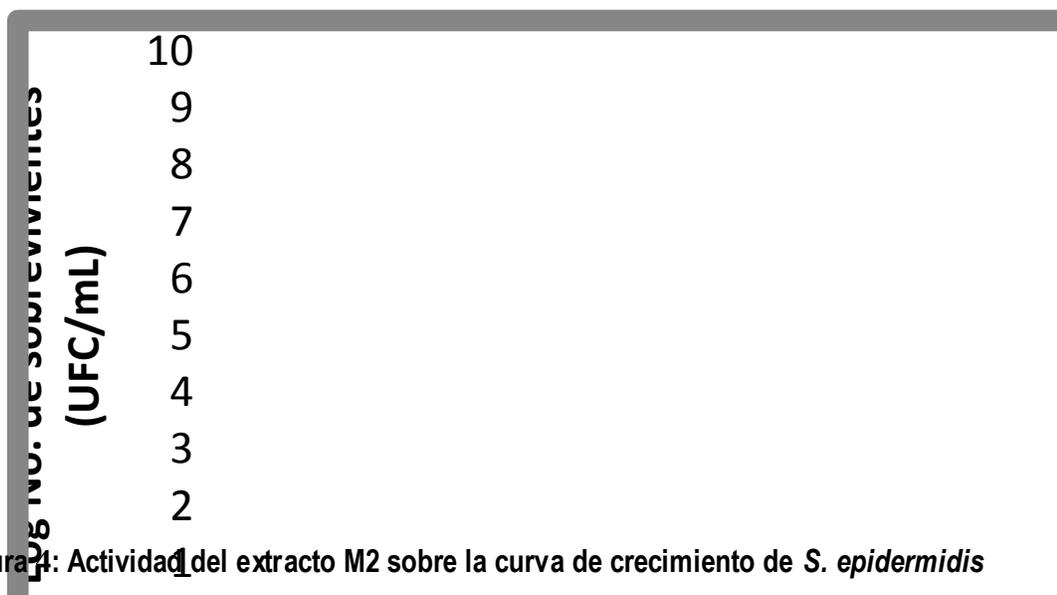


Figura 2: Actividad del extracto M2 sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis*

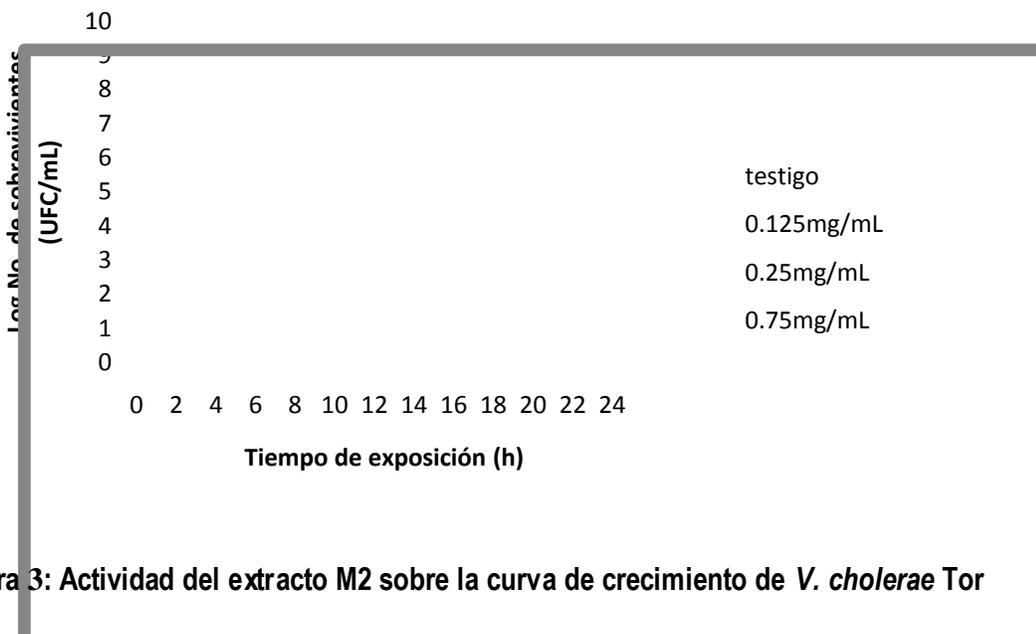


Figura 3: Actividad del extracto M2 sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* Tor

Fraccionamiento del extracto metanólico libre de compuestos no polares (M2)

Del fraccionamiento del extracto M2 se obtuvieron 157 alícuotas de 250 mL que se agruparon en 35 fracciones (Cuadro 5) a las cuales se les evaluó la actividad antibacteriana sobre *S. epidermidis* (Gram positivas).

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procerca* Kunth
(Chupandilla)*

Cuadro 5: Fraccionamiento del extracto metanólico libre de grasas (M2) mediante cromatografía en columna

Eluyente	Proporción (100%)	Alícuota	Fracción		
Acetato de etilo	100	1-3	1		
		4	2		
	90:10	5-6	3		
		7-9	4		
		10-11	5		
		12-15	6		
	80:20	16	16	7	
			17-20	8	
		21	21	9	
			22-23	10	
			24-31	11	
			32	12	
			33-37	13	
			38-41	14	
Acetato de etilo- Metanol			70:30	42-60	15
				61-68	16
	70:30	70	17		
		71	18		
		72	19		
		73	20		
60:40	74-76, 78-81	74-76, 78-81	21		
		77	22		
	60:40	82-84, 86-96	23		
		85	24		
		97	25		
		98	26		
		99	27		
		100	28		
		101	29		
		102-103	30		
50:50	104-117	31			
	118-127	32			
Metanol	100	128-137	33		
		138-152	34		
		153-157	35		

Cuadro 6: Actividad antibacteriana de las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna abierta del extracto M2.

Fracción	Halo de Inhibición mm	Rendimiento (mg).
1	Na	0.643
2	Na	0.014
3	10	0.014
4	Na	0.012
5	21	0.331
6	17	0.395
7	17	3.466
8	16	2.630
9	14	0.413
10	15	0.435
11	11	0.757
12	15	0.166
13	13	0.748
14	12	0.283
15	11	4.412
16	10	2.004
17	9	0.256
18	Na	0.054
19	8	0.253
20	7	0.252
21	9	0.878
22	9	0.161
23	9	3.442
24	11	0.199
25	Na	0.088
26	Na	0.072
27	Na	0.072
28	Na	0.056
29	Na	0.025
30	Na	0.112
31	8	0.535
32	7	0.532
33	Na	0.980
34	Na	0.453
35	7	0.241

Na: No activa, la desviación estándar en todos los casos fue ± 0.00

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procerca* Kunth
(Chupandilla)*

De las 35 fracciones obtenidas 23 mostraron actividad sobre *S. epidermidis*, como se observa en el cuadro 6, la fracción mas activa fue la 5, seguida de la fracción 6 y 7 (21, 17 y 17 mm, respectivamente).

Determinación de CMI y CBM de la fracción activa

Como se puede observar en el cuadro 7 las concentraciones para CMI y CBM de la fracción 7 son menores que las obtenidas con el extracto M2. Comparando el efecto las bacterias Gram positivas resultan ser las más sensibles a la fracción, en particular *S. epidermidis* y *B. subtilis* al requerir valores de CMI y CBM de 0.0625 a 0.125 mg/mL respectivamente; en cuanto a las bacterias Gram negativas, la más sensible fue *E. aerogenes* pues necesita concentraciones de 0.25 a 0.75 mg/mL (CMI y CBM respectivamente).

Cuadro 7: Determinación de CMI y CBM de la fracción 7 en mg/mL.

Bacteria	Fracción 7	
	CMI	CBM
<i>S. aureus</i>	0.125	0.25
<i>S. epidermidis</i>	0.062	0.125
<i>B. subtilis</i>	0.062	0.125
<i>S. lutea</i>	0.75	1.00
<i>V. cholerae</i> No-01	0.50	1.00
<i>V. cholerae</i> agua	0.50	1.00
<i>V. cholerae</i> cc	0.50	1.00
<i>V. cholerae</i> Tor	0.75	1.00
<i>E. coli</i>	0.50	0.75
<i>E. agglomerans</i>	0.50	1.50
<i>E. aerogenes</i>	0.25	0.75

Tomando estos resultados se determinó el efecto de la fracción 7 sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis* y *V. cholerae* Tor y se determinó que $\frac{1}{2}$ CMI, CMI (0.0312, 0.0625 y 0.375, 0.75 mg/mL respectivamente) para las dos bacterias, la fracción tiene un efecto bacteriostático y para CBM (0.125 y 1.00 mg/mL respectivamente) es bactericida. En *S. epidermidis* es bactericida a las 8 horas y para *V. cholerae* Tor a las 3 horas se inhibe el crecimiento bacteriano en un 100%. (Figura 5 y 6).

También se determinaron los impactos para la concentración de CBM y resultó que ambas curvas son de múltiples impactos; para *S. epidermidis* se necesitan 9 impactos y para *V. cholerae* Tor 11 impactos, antes de que se produzca la inactivación total de las especies bacterianas.

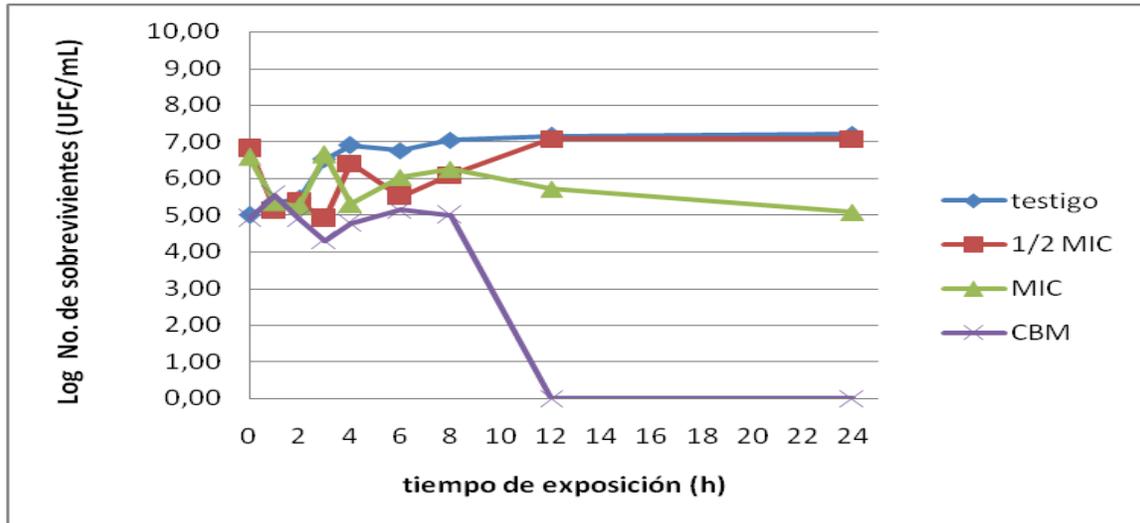


Figura 5: Actividad de la fracción 7 sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis*.

Las concentraciones utilizadas fueron: $\frac{1}{2}$ MIC=0.0312 MIC=0.0625 CBM=0.125mg/mL

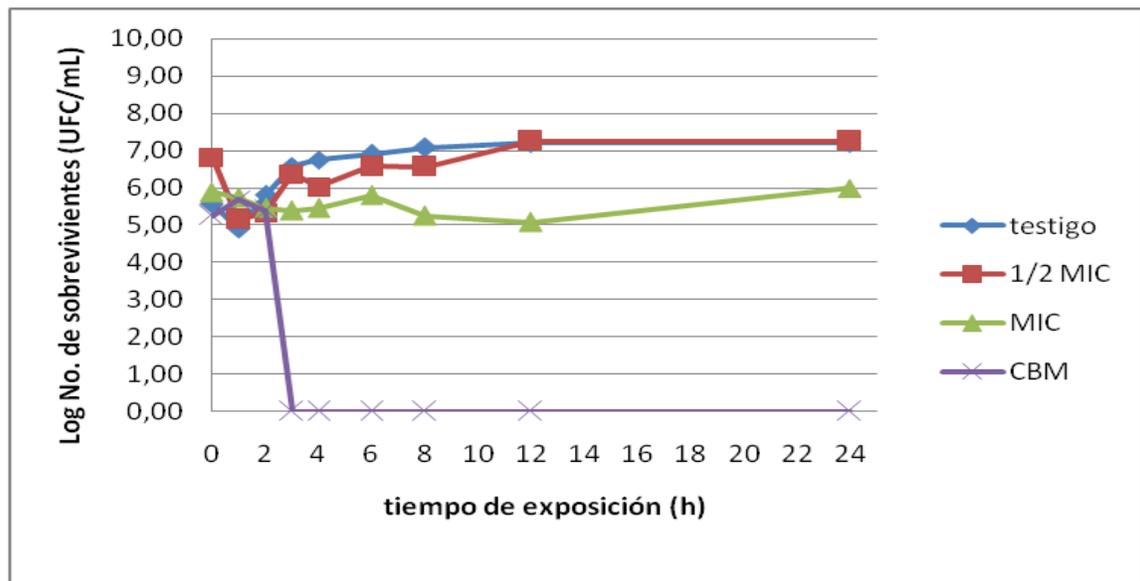


Figura 6: Actividad de la fracción 7 sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* Tor

Las Concentraciones utilizadas fueron: $\frac{1}{2}$ MIC=0.375 MIC=0.75 CBM= 1.00 mg/mL

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizó con las fracciones 5, 6 y 7 de la cromatografía en columna abierta (elegidas porque presentaron mayor actividad y mayor rendimiento) de estas fracciones se observa que presentan diversos compuestos como lo muestra el cuadro 8.

Cuadro 8: Compuestos presentes en las fracciones 5, 6 y 7.

No. Fracción	No. de compuestos	Tiempo de retención (min)	UV λ_{max} (nm)
5	1	2.637	236, 277
	2	6.339	278
6	1	2.632	236, 278
	1	2.629	236, 278
7	2	3.103	273
	3	6.391	236, 278

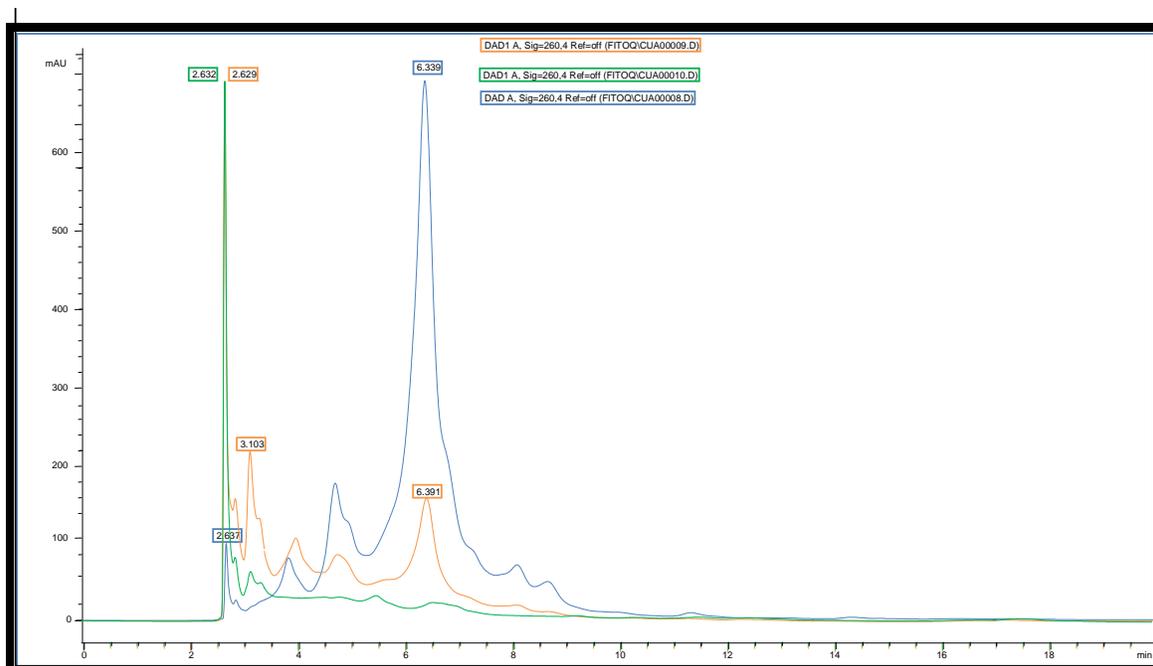


Figura 7: Comparación de los cromatogramas de las fracciones 5, 6 y 7.

Como se observa en la figura 7, los compuestos de las tres fracciones son muy similares tanto en tiempo de retención que oscila entre 2.632 y 6.391 como en el intervalo de la longitud de onda a la que absorben (236 a 278nm).

Actividad antifúngica

Evaluación cualitativa

En la realización del bioensayo cualitativo se observó que tanto el extracto M1 y M2 presentaron actividad antifúngica, siendo activos frente a sólo una de las cinco cepas (*T. mentagrophytes*). El extracto hexánico no mostró actividad antifúngica (Cuadro 9)

Cuadro 9: Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los extractos de *C. procera*.

Extracto	Cepas Fúngicas				
	Fs	Fm	An	Rz	Tm
M1	x	x	x	x	✓
M2	x	x	x	x	✓
Hexánico	x	x	x	x	x

Resultados obtenidos a partir de 3 repeticiones. ✓ = Inhibición x = No-inhibición
Fs = *Fusarium sporotrichum*, Fm = *Fusarium moniliforme*, An = *Aspergillus niger*,
Rz = *Rhizoctonia solani*, Tm = *Trichophyton mentagrophytes*,

Evaluación cuantitativa

Los resultados obtenidos sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *C. procera* sobre *T. mentagrophytes* se observan en el cuadro 10. La cepa presenta un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial en la concentración de 2 mg/mL de ambos extractos, sin embargo para alcanzar el 100% de inhibición es necesaria una concentración superior a 2 mg/mL.

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

Cuadro 10: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *Cyrtocarpa procera* sobre *Trichophyton mentagrophytes* .

Concentración (mg/ mL)	M1	M2
0.125	22.22 ± 0.57	17.77 ± 1.15
0.25	46.66 ± 0.00	11.11 ± 1.15
0.50	66.66 ± 0.00	11.11 ± 1.15
0.75	66.66 ± 1.00	26.66 ± 1.00
1.00	82.22 ± 0.57	55.55 ± 0.57
1.50	68.88 ± 0.57	60.00 ± 2.00
2.00	86.66 ± 0.00	73.33 ± 1.00

Respecto al porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *T. mentagrophytes*, en este cuadro se aprecia claramente que el extracto M1 de *C. procera* a una concentración de 2 mg/mL alcanza a inhibirlo en un 86.66 %.

Los valores de la CF₅₀ de los extractos M1 y M2 son: 0.3347 y 1.25 mg/mL respectivamente, estos valores se muestran en la figura 8, donde se observa que la especie fúngica *T. mentagrophytes* cuando se somete a los extractos M1 y M2 de *C. procera*, presenta CF₅₀ diferentes pues la más baja fue la de M1 al inhibir un 50% con una concentración menor en comparación al extracto M2, ya que se necesita tres veces más la concentración del extracto M1 para inhibir en un 50% a esta cepa fúngica.

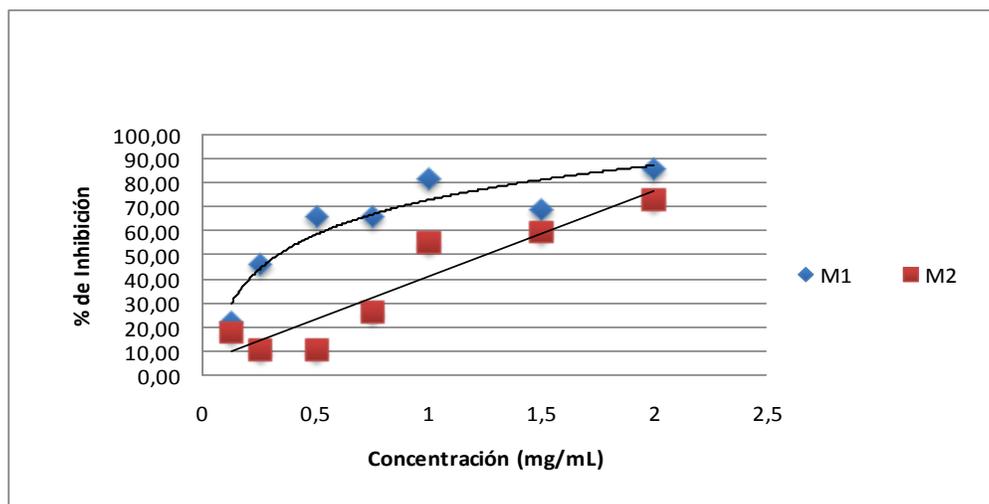


Figura 8: Determinación de la CF_{50} del extracto M1 y de M2 de *C. procera* sobre *T. mentagrophytes*

Toxicidad general

El resultado sobre el porcentaje de muerte de *Artemia salina* del extracto M1 de *C. procera* se observan en el cuadro 11. El extracto M1 resultó ser altamente tóxico, puesto que no sobrevivió ninguna larva nauplio II de *A. salina* en ninguna de las concentraciones ensayadas.

Cuadro 11: Toxicidad general del extracto M1 de *C. procera* sobre *Artemia salina*.

Concentración (mg/mL)	<i>C. procera</i> % de muerte
1.0	100
0.10	100
0.01	100

Actividad Antioxidante

Los valores de la actividad antioxidante de M1 y M2 son 4.62 y 4.78 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Figura 9), estas concentraciones de los extractos se necesitan para reducir en un 50% al

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth (Chupandilla)

compuesto DPPH. Los valores son muy semejantes sin embargo el extracto crudo requiere menor concentración para reducir el DPPH. Y comparando estos resultados con la quercetina (4.6 µg/mL), el extracto M1 es un buen antioxidante.

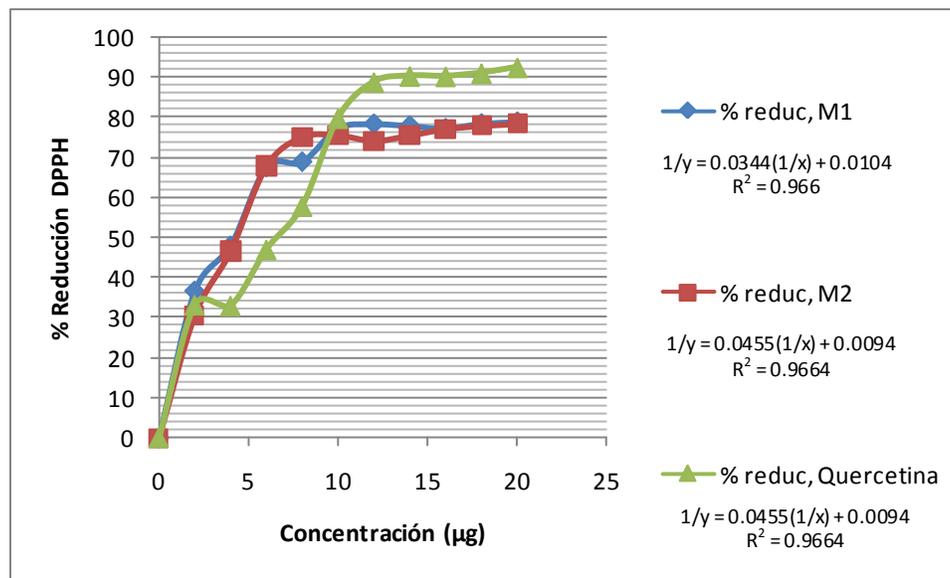


Figura 9 Comparación del % de reducción de los extractos M1 y M2 de *C. procera*

Detección de metabolitos secundarios

De acuerdo a las pruebas colorimétricas hechas para los extractos M1, M2 y la fracción 7 resultaron ser positivos para cloruro férrico y alfa-naftol (presencia de fenoles y carbohidratos respectivamente); para Dragendorff y Mayer que detectan presencia de alcaloides resultó negativo.

DISCUSIÓN

La especie *C. procera*, es utilizada en forma de infusión para combatir enfermedades gastrointestinales como la gastritis, además de afección en los riñones, diabetes, diarreas; para curar heridas y llagas y así obtener una cicatrización más rápida; esta especie es utilizada en particular dentro de la medicina tradicional de San Rafael Coxcatlán, Puebla y en otros estados de la República Mexicana (Canales et. al., 2005 y 2006; Argueta y Cano, 1994). Los resultados obtenidos

en este estudio coinciden con lo reportado dentro de la medicina tradicional, pues se encontró que los extractos de la corteza del árbol presentan actividad antibacteriana y antifúngica, por lo que, el presente trabajo valida el uso medicinal tradicional de esta especie.

Respecto al rendimiento de los extractos de *C. procera*, el extracto crudo (M2) fue el que tuvo mayor rendimiento con un 12.55% en comparación al extracto hexánico 0.47% (Cuadro 3, Figura 1). Estos resultados indican que la corteza presenta en mayor cantidad compuestos de naturaleza polar. Para *C. procera* aún no se han determinado los principios activos, sin embargo, para la familia *Anacardiaceae* se han aislado compuestos como, polifenoles, flavonas, triterpenoides (Maiga et al., 2006; Ojewole, 2005) por lo que es posible que alguno de estos tipos de metabolitos secundarios esté presente en la corteza de *C. procera*, pues pertenece a la misma familia.

De acuerdo a los resultados de la actividad antibacteriana el extracto hexánico no presentó actividad sobre ninguna de las especies bacterianas ensayadas. Por otro lado los extractos M1 y M2, fueron activos tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, siendo las primeras las más sensibles, en particular *S. lutea* (Cuadro 4, Figura 2). Se sabe que de manera natural dentro del tracto respiratorio superior y digestivo del hombre existen gran cantidad de bacterias que no causan ninguna enfermedad, sin embargo, cuando la persona se encuentra inmunodeprimida, alguno de estos microorganismos pueden ser oportunistas y ocasionar enfermedades un ejemplo de estas cepas es *S. aureus* típicamente asociada a enfermedades del tracto respiratorio superior; *B. subtilis* causante de infecciones en ojos, oídos tracto urinario y tracto respiratorio. La gran variedad de trastornos gastrointestinales de origen infeccioso son generalmente causados por bacterias Gram negativas como *Vibrio cholerae* y las *Salmonellas*, las cuales se manifiestan con diarreas, vómitos y deshidrataciones (Chart, 2002; Foster, 2000; Mims et al, 1999).

Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana muestran que la fracción 7 en comparación con los extractos M1 y M2 de *C. procera* presenta los mayores halos de inhibición frente a las bacterias de tipo Gram positivo, esto es debido a que conforme se van purificando los compuestos la actividad aumenta considerablemente; esto se observa en los cuadros 4 y 7 (Domínguez, 1973).

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procerca* Kunth (Chupandilla)*

Sobre las diferencias existentes entre la sensibilidad de las cepas bacterianas a los extractos, de acuerdo a los resultados del análisis de varianza de dos factores (ANOVA), se mostró que no existen diferencias significativas ($P < 0.05$; $F = 1.8$), sin embargo si se ve una mayor actividad de los extractos sobre las bacterias Gram positivas (Cuadro 3, Figura 2), esto, probablemente se debe a la composición estructural de las bacterias y a la susceptibilidad de cada cepa al extracto probado, ya que los péptido glucanos en el caso de las bacterias Gram positivas se encuentran inmersos en una matriz compuesta de ácidos teicoicos, teicurónicos y lipoteicos; confiriéndole a la pared celular una carga negativa neta, que es necesaria para que la célula pueda asimilar cationes divalentes, esta característica la hace más sensible a los compuestos polares, a diferencia de las Gram negativas en las que la membrana es más resistente a los disolventes orgánicos y menos permeable a las moléculas de carácter hidrofóbico (Cimanga et al., 2002; Gros et al., 1985; Nikaido y Nakae., 1979).

Los resultados cualitativos sobre la actividad antibacteriana, fueron confirmados al obtener los valores de la CMI y CBM. En la determinación de la CMI y CBM de los extractos M1, M2 y la fracción 7, (Cuadros 5 y 8) resultaron ser más sensibles las bacterias Gram positivas, es decir, que se requieren concentraciones menores para inhibir su crecimiento (CMI y CBM: < 0.125 - 2 mg/mL), a diferencia de las bacterias de tipo Gram negativo (CMI y CBM: 0.25 - $>> 2$ mg/mL), las cuales requieren de mayores concentraciones de los extractos probados para inhibir su crecimiento. Se observó que la fracción 7 es más activa ya que los valores obtenidos de CMI y CBM fueron menores para todas las especies bacterianas (cuadro 8). Probablemente lo anterior se debe a que los compuestos responsables de la actividad antibacteriana se encuentran en mayor concentración, resultado de la cromatografía abierta (Katzung y Trevor 1997), lo que permite un mayor efecto a menor concentración a diferencia de los extractos M1 y M2.

Con respecto a las curvas de crecimiento (figura 3, 4, 5 y 6) un antimicrobiano se puede clasificar según su efecto como bactericida o bacteriostático; el extracto M2 resultó ser bacteriostático frente a las bacterias *S. epidermidis* y *V. cholerae* Tor, en todas las concentraciones ensayadas (0.25 , 0.5 y 0.75 mg/mL y 0.125 , 0.25 y 0.75 mg/mL respectivamente), mientras que en la

fracción 7 se observó que a concentraciones iguales ó menores a CMI el efecto es bacteriostático y a concentraciones iguales a CBM el efecto es bactericida a las 3 y 8 horas (Gram positiva y Gram negativa respectivamente). De acuerdo con Davis et al. (1996) la acción bactericida depende de la lesión irreversible de un elemento celular que no puede ser sustituido, como el ADN o la cubierta celular, otro punto de acción bactericida son las proteínas requeridas para la síntesis de ARN y los ribosomas.

Además de saber el efecto del extracto otro punto importante es su impacto, pues de acuerdo con la actividad de la fracción 7 sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis* y *V. cholerae* Tor, resulta ser de múltiples impactos, ya que la curva se inclina cerca del origen, antes de adoptar una dirección lineal, es decir, que antes de que se produzca la inactivación es necesario que se acumulen varios impactos (Davis et al., 1996); para *S. epidermidis* son requeridos 9 impactos y para *V. cholerae* Tor, 11 impactos (Figuras 5 y 6).

En cuanto a la actividad antifúngica, se encontró en el presente trabajo que los extractos M1 y M2 fueron activos en un hongo dermatofito (*T. mentagrophytes*); estos resultados son interesantes y de gran relevancia ya que *T. mentagrophytes* es causante del pie de atleta (Myrvin y Weiser, 1991) y utilizando concentraciones mayores a 2.0 mg/mL de los extractos antes mencionados se puede alcanzar el 100% de inhibición (Cuadro 11).

Al determinar la concentración fungicida media (CF₅₀) para *T. mentagrophytes* utilizando los extractos M1 y M2, se obtuvo que para inhibir el 50% del crecimiento radial de dicho hongo se requiere una menor concentración (0.3347 mg/mL) del extracto crudo (M1) de *C. procera*, en comparación al extracto M2 de esta especie (Figura 8). Posiblemente estos resultados tienen que ver con la sinergia de los compuestos no polares y polares (Katzung y Trevor, 1997) contenidos en la corteza de *C. procera* al presentar una mayor actividad el extracto crudo sobre el extracto M2.

Con respecto al fraccionamiento biodirigido del extracto M2, las fracciones que presentaron actividad se muestran en el cuadro 7, las fracciones más activas y con mayor rendimiento (5, 6 y 7) se sometieron a una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se compararon los

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

compuestos que cada fracción presentaba (cuadro 9 y figura 7). En general los compuestos son muy parecidos entre las fracciones ya que a la longitud de onda a la que absorben es de 236 a 278 nm, esto datos hacen suponer la presencia de fenoles ya que estos compuestos tienen un pico de absorbancia de 270 nm (Olsen, 2003); Cowan (1999) reporta a los fenoles y polifenoles con acción antimicrobiana, antioxidante, antiviral y antifúngica; la presencia de fenoles se comprueba con el resultado positivo aplicando cloruro férrico, pues este compuesto al detectar fenoles vira al color azul (Domínguez, 1973).

Para reducir en un 50% al compuesto DPPH se necesitan 4.6 y 4.7 $\mu\text{g/mL}$ de M1 y M2 respectivamente, estas pequeñas diferencias se deben a la partición que se le hizo al extracto crudo, separando los compuestos no polares de los polares, por este motivo probablemente la CI_{50} del extracto M2 aumentó ligeramente, lo cual es un probable indicador de la existencia de algún (os) compuesto (s) de naturaleza no polar con actividad antioxidante (Sacchetti et al., 2005). Estos resultados son de gran importancia ya que al comparar el extracto M1 con la quercetina que es un antioxidante por excelencia tiene una CI_{50} de 4.6, lo cual nos indica que el extracto M1 podría ser un buen antioxidante al tener una CI_{50} de 4.62, esta comparación se muestra en la figura 12.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la toxicidad general del extracto M1 de *C. procera* se encontró que de acuerdo con Padmaja et al. (2002), el extracto crudo de *C. procera* es altamente tóxico pues aún utilizando cantidades pequeñas como 0.010mg/mL del extracto M1, no sobrevivió ninguna larva nauplio II de *A. salina*, resultados que concuerdan con Rodríguez-López et al. (2006) pues también encontraron una toxicidad significativa en *Artemia salina*. Debido a que los habitantes de la localidad de San Rafael utilizan la corteza en forma de infusión (Canales, 2005), sólo se determinó la toxicidad general con el extracto M1 ya que es el extracto que más se asemeja a la forma de uso tradicional.

Es de suma importancia tomar en cuenta los aspectos de actividad antimicrobiana, toxicidad general y antioxidante de una especie vegetal como la corteza de *C. procera*, estudios etnobotánicos (Canales et al., 2005 y 2006) han demostrado que la comunidad de San Rafael, ocupa en gran

medida esta especie para aliviar sus enfermedades de probable origen bacteriano, la base de un buen antibiótico es saber sobre qué tipo de bacterias va a actuar, cuál es la concentración mínima inhibitoria que se necesita en un periodo de 6 a 24 hrs etc, aquí radica la importancia de separar los compuestos causantes de la actividad antibacteriana, para que con la ayuda de estudios más específicos crear un nuevo medicamento, además de tener la seguridad de que las concentraciones empleadas y la misma infusión de la corteza o incluso el nuevo medicamento no son tóxicos al ingerirlos. La actividad antioxidante hoy en día tiene un gran impacto, pues diversos estudios epidemiológicos muestran que la ingesta de productos con elevada acción antioxidante está vinculada con una baja incidencia de enfermedades vinculadas con el estrés oxidativo (Sies, 1997), pues los antioxidantes son sustancias que nos ayudan a neutralizar radicales libres, protegiendo de este modo a nuestras células, contribuyendo a mejorar nuestras defensas, y retrasando el proceso de envejecimiento cutáneo. Cabe destacar que la actividad antioxidante está muy relacionada con la capacidad cicatrizante de un medicamento ya que combaten los radicales libres y esto aunado con una buena actividad antibacteriana es de gran relevancia pues esta propiedad protege de infecciones oportunistas de carácter bacteriano y precisamente la corteza de la Chupandilla se emplea para lavar heridas y llagas, y lograr una cicatrización más rápida (García, 1984), por lo que en este trabajo se demuestra que *C. procera* tiene una corteza de actividad completa y eficaz.

Lo antes mencionado valida el empleo de la corteza de la Chupandilla en la medicina tradicional, ya que además de presentar compuestos con actividad antibacteriana es un especie adecuada para combatir procesos infecciosos por *T. mentagrophytes*.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico crudo (M1), metanólico libre de compuestos no polares (M2) y la fracción 7 de *Cyrtocarpa procera* presentan actividad antibacteriana y antioxidante.
- La fracción 7 fue la que presentó mayor actividad antibacteriana.
- Los extractos M1 y M2 presentan un efecto bacteriostático y la fracción 7 tiene un efecto bactericida.
- El extracto M1 y M2 presenta actividad antifúngica sobre *T. mentagrophytes*.
- Los extractos de *C. procera* son altamente tóxicos para la larva nauplio II de *Artemia salina*.

PERSPECTIVAS

Es importante continuar el estudio de *C. procera* debido a que su uso como planta medicinal no solamente se limita para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, sino que se podría utilizar para otro tipo de afecciones, por lo que se propone realizar los siguientes estudios.

1. Seguir realizando estudios para la evaluación de otras actividades biológicas como antitumoral, cicatrizante y antiparasitarios.
2. Seguir purificando la fracción 7 para aislar los compuestos puros para así caracterizar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana.

3. Ampliar el estudio toxicológico utilizando especies de mayor complejidad como moscas (*Drosophila melanogaster*) y ratas.

APÉNDICE 1

Descripción botánica de la planta estudiada.

***Cyrtocarpa procera* (Kunth).**

Nombre común:

Chupandilla, copalcojote. Estado de México: chucum-pum. michoacán: chucumpuz, chupandia. Nayarit: chocote, puei (cora) (Argueta y Cano 1994). Puebla: Chupandilla (Canales, 2005)

Botánica y ecología:

Árbol de 6 metros de altura o más alto, cubiertos con vellos. Las hojas parecen plumas; tienen un soporte que las une a los tallos, alados. Presentan racimos de flores blancas. Los frutos están cubiertos de pelos y miden 2 cm. de largo (Argueta y Cano, 1994) (Figura 10).

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*



Figura 10: *Cyrtocarpa procera*.

Originario de México. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado entre los 600 y los 1100 msnm. Planta silvestre, asociada a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino y de pino. (Argueta y Cano, 1994) (Figura 11).

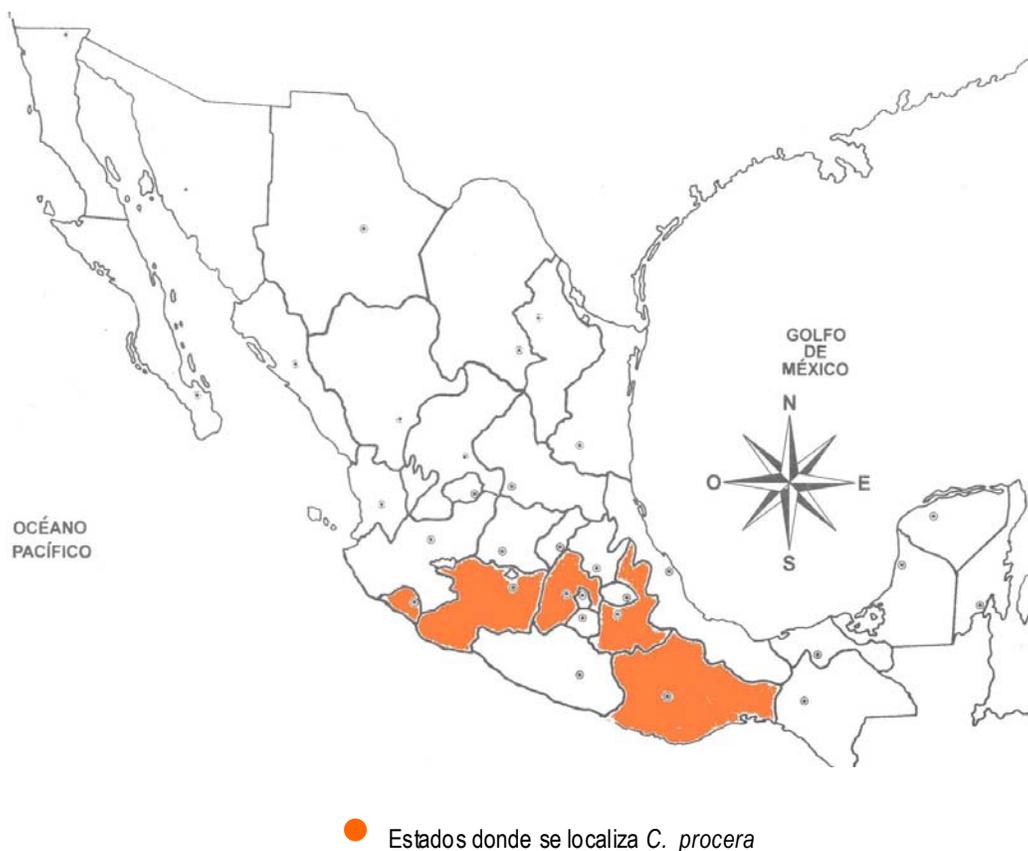


Figura 11: Mapa de la distribución geográfica de *Cyrtocarpa procera*.

Etnobotánica y antropología:

Se usa comúnmente, en el Estado de México para resolver trastornos del aparato digestivo, tales como diarrea rebelde y disentería. La corteza es la parte de la planta que más se utiliza. Preparada en cocimiento junto con cuachalalate (*Juliania adstringens* (Schltdl) Schltdl) se emplea para lavar heridas y llagas, y lograr una cicatrización más rápida; administrada por vía oral, se usa para quitar el dolor de cintura en Nayarit. Se recomienda masticarla para curar el dolor de muelas y la tos, en Michoacán. Otros usos medicinales que recibe se refiere a bajar la fiebre y contra la lepra. Se le atribuyen propiedades afrodisíacas y astringentes (García, 1984).

Historia:

En el siglo XVI, Francisco Hernández relata: “el fruto es muy astringente y destila una baba sumamente glutinosa; ésta, untada, cura las fiebres, se administra contra las disenterías y las

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth (Chupandilla)*

diarreas. Para el siglo XX Maximino Martínez la mencionó como eficaz contra la lepra (Argueta y Cano, 1994).

Existen varios datos que sugieren que *Cyrtocarpa procera* tiene un efecto antidiarreico, antiinflamatorio, contra la tos, etc. la población la utiliza para estos malestares y otros.

APÉNDICE 2:

Zona de colecta

La corteza de *C. procera* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m. (Figura 12).

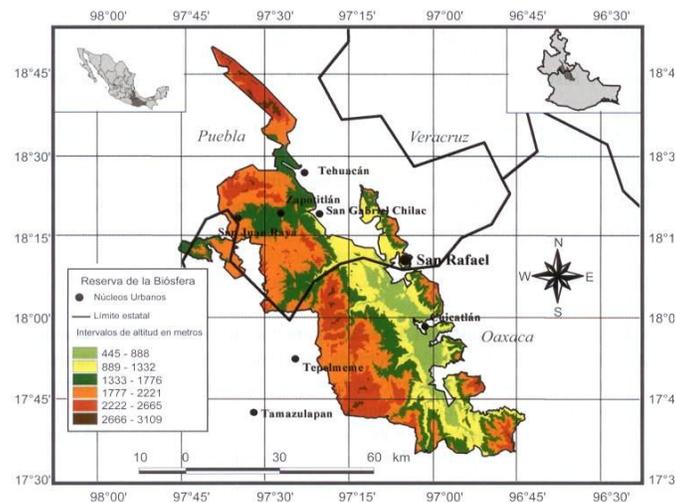


Figura 12: Ubicación geográfica del poblado de San Rafael

Clima

El clima es de tipo Bs (h') w" (w) de acuerdo con la clasificación de Koeppen, modificado por García (1981), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22 °C, variando entre 25 °C en abril y mayo, y 18 °C en enero (Medina, 2000). Valiente

(1991) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación casi duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

Hidrografía

El sureste de Puebla se encuentra irrigado por el Río Salado. La parte sur del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es drenado por el Río Grande o Tomellín, que fluye al norte desde Oaxaca; uniéndose cerca de Quitepec los dos forman el Río de Santo Domingo, el cual corta la Sierra Madre de Oaxaca en dirección este y eventualmente se vuelve el Río Papaloapan. El Río Tehuacán encuentra su camino al oeste del Cerro Colorado, para entrar en el Valle de México cerca de San Diego, Chalma. Este pequeño río el cual se convierte en el Río Salado, se une por un número de cortas ramificaciones alcanzando la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste (Salcedo-Sánchez, 1997).

Edafología

El origen del suelo data del periodo Cuaternario, era Cenozoica. Los suelos en las regiones están pobremente desarrollados y pueden ser divididos en dos grandes tipos: regosoles, predominantemente calcáreos y regosoles éutricos y xerosoles, predominantemente xerosoles háplicos.

Vegetación

La vegetación predominante es un bosque tropical caducifolio, donde *Escontria chiotilla* (F. A. C. Weber) Rose y *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg son particularmente abundantes (Valiente-Banuet et al., 2000).

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

Fernández (1999), reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael: Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).

Chiotillal de *Escontria chiotilla*, en el nivel próximo al cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal de esta región, con una alta densidad arbustiva.

Cuajotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* Ramírez, *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouquieria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fructicosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.

Fouqueria con especies dominantes como *Fouquieria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Senna wisliseni* (DC), *Mimosa luisiana* (Brandege) y *Sanvitalia fructicosa*. 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 herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fructicosa*.

En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael (Rosas, 2003), se determinó un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias botánicas, de las cuales 368 especies fueron registradas con uno o más usos (18% son usadas como plantas medicinales). Las familias con un mayor número de especies fueron Asteraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae, que corresponden a las familias más representativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

La población.

La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) (Secretaría de Salud, 2001). La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importante es la

agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

APÉNDICE 3:

Técnica de Maceración.

Se tomó la corteza seca, molida y triturada de la planta y se le agregó un solvente de polaridad alta, en este caso se utilizó metanol. Una vez obtenido el extracto, se destiló el exceso de solvente a presión reducida. El extracto obtenido se colocó en charolas de vidrio para completar la evaporación del solvente, finalmente se calculó el rendimiento total por diferencia de peso (Domínguez, 1973).

APÉNDICE 4:

Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer:

(Vanden Berghe y Vlietinck, 1991).

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los preparados herbales y las fracciones producto de las separaciones cromatográficas, la metodología es la siguiente:

Medio:

Para los ensayos con las cepas bacterianas se utilizó como medio de cultivo estándar el agar Müeller-Hinton (Bioxon 110-1), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Para el caso de los hongos se utilizó agar PDA. Es importante que el medio alcance en la placa 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

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

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

Bacterias:

Con un asa de siembra estéril se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias del microorganismo a ensayar (esta misma metodología se sigue para las levaduras *C. albicans* y *C. neoformans*). Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Müeller-Hinton (Bioxon 260) para bacterias y para levaduras se usa caldo Sabouraud, se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incuba el tubo de cultivo a 37°C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/mL (este procedimiento se realiza por cada microorganismo a desafiar).

El estándar 0.5 de McFarland se prepara añadiendo 0.5 mL de cloruro de bario a 99.5 mL de H₂SO₄ 0.36 N (Hendrickson, 1987, citado por Ávila, 1996). La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o en su defecto con un espectrofotómetro (Spectrónic 21 Milton Roy) a 660 nm.

Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina al 0.9 % hasta igualarlas. 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 Müeller-Hinton (Bioxon 110-1). Previamente se deja que la placa alcance una temperatura ambiente; es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se siembra mediante estría por lo menos en tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, la placa de Müller-Hinton está lista para la aplicación de las muestras a las que se les evaluará su actividad antibacteriana.

Hongos:

Se tomó con una pipeta pasteur un botón de 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Se depositará el botón del micelio dentro de una caja de petri con agar PDA. Una vez que el micelio ha crecido alrededor de 10 mm de diámetro se colocarán los sensidiscos con una concentración de 2000µg del extracto a probar. El cultivo se incubará a 23 °C, para determinar si hay actividad será cuando el micelio no crece más allá de la zona de difusión de la muestra a probar formando un medio círculo alrededor del sensidisco y si el hongo crece sobre los sensidiscos no hay inhibición.

Aplicación de sustancias:

Se utilizarán sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel whatman del N° 5 (los sensidiscos se utilizarán para evaluar biológicamente los extractos y las fracciones separadas mediante cromatografía). En todos los casos se hicieron diluciones necesarias para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto (2 mg por sensidisco).

Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocan manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril.

Preparación de las muestras:

Para el bioensayo el vehículo fue metanol. En cuanto a la evaluación de las fracciones los sensidiscos se impregnaron con las soluciones valoradas de la muestra hasta que se llegó a la concentración deseada de sustancia (2 mg) por disco; en este caso se utilizó metanol para

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

solubilizar los compuestos, para posteriormente impregnar los discos dejando evaporar el solvente durante 12 horas.

Controles negativos:

Para los bioensayos preliminares se utilizan sensidiscos con 10 μ L de metanol, dejándolo evaporar durante 12 hrs. al igual que los experimentales.

Control positivo:

Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales en sensidiscos con 25 μ g de Cloramfenicol para el caso de las bacterias y Ketoconazol (7 μ g) en el caso de los hongos.

Incubación:

Bacterias:

Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad. Se colocan en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35 °C, sin mayor tensión de CO₂. Es preciso evitar presión de CO₂ debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida de agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Asimismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición. Se incuban siempre placas con discos sin sustancias a evaluar como control (control negativo).

Hongos:

Los hongos fueron cultivados en una caja de petri con 20 ml de agar PDA, se colocaron en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 23 °C, sin mayor tensión de CO₂.

APÉNDICE 5:

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

Método de macrodilución en agar (Koneman 1996)

a) Preparación de reactivos y diluciones:

Las disoluciones antimicrobianas de trabajo se prepararon diluyendo la droga en el agar de Mueller-Hinton según las concentraciones deseadas (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/mL). El agar se esterilizó en tubos de ensayo de 13 por 100 mm con tapa de rosca o con tapones de algodón. Se colocó la cantidad necesaria del extracto para obtener la concentración requerida. Después de mezclar bien el contenido se transfirió a una caja de Petri.

Inoculación e incubación de los tubos:

Se preparó un inóculo que contiene 10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colonia/mL) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utiliza el estándar 0,5 de MacFarland). Incubar los tubos a 35°C durante 24 horas. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO₂ a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo. Con un hisopo se puntearon los microorganismos en todas las concentraciones a ensayar.

b) Interpretación de resultados:

La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Una turbidez muy ligera o un pequeño botón de desarrollo o turbidez definida se considera evidencia de que la droga ha sido capaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

c) Determinación de la concentración bactericida mínima

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un organismo se realizó la prueba de actividad bactericida que emplea el mismo sistema de dilución en agar. En aquellas cajas en donde

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

se observó un descenso drástico de la población bacteriana (99.9 % de inhibición), se denominó Concentración Bactericida Mínima (CBM).

Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1996)

La microtécnica de dilución en caldo sigue el mismo principio que el método de dilución en caldo, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos (bacterias y levaduras) a los antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica (placas de Elisa) la microplaca se preparó colocando 50 µL de caldo Müller-Hinton para bacterias y caldo Sabouraud para levaduras con la concentración deseada del compuesto a probar.

Se preparó una suspensión bacteriana con un asa de siembra estéril tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de los microorganismos a ensayar. Se sumergió el asa en 10 mL de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260), se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retiró el asa de siembra. Incubar el tubote cultivo a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/mL, de esta suspensión se tomaron 100 µL y se le adicionaron 99.9 ml de solución salina al 0.9% obteniendo así una concentración de 10^5 bacterias/mL. Cada concavidad se inocula con 50 µL de esta suspensión bacteriana.

Una vez inoculada la placa se tapó para evitar la desecación y se incuba por 24 hrs. a 37 °C, pasado este tiempo se le añaden 50 µl de una solución de cloruro de tetrazolio al 0.08% a cada concavidad, se incuba por 30 min. a 37°C. en las concavidades donde se desarrolla el organismo, el colorante es reducido a formazan de color rojo, produciéndose un botón rojo en el fondo del microtubo. Donde no hay desarrollo bacteriano la solución permanece clara.

APÉNDICE 6:

Actividad de los extractos sobre la curva de crecimiento (Ávila, 1996)

1. Se preparó un tubo por lo menos para cada uno de los extractos, para el muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora durante los cuatro primeros tiempos, después durante dos horas, durante 5 horas y finalmente a las 24 horas.
2. Se preparó y rotuló un tubo sin antídoto que sirve como control del desarrollo
3. Se preparó el inóculo con aproximadamente 1×10^8 bacterias/ml en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación)
4. Se inoculó con ayuda de una micropipeta 100 μ L de la suspensión de bacterias en los tubos que contenían los extractos, estos tendrán la concentración de CMI y sus múltiplos medios; esto es, la mitad del CMI y CBM. La concentración final es de aproximadamente de 1×10^5 bacterias/ mL de caldo en cada tubo. Se incubará en una estufa sin presión de CO_2
5. Se muestreó cada hora las primeras 4 horas, después cada dos horas dos tiempos, posteriormente cada cuatro horas dos tiempos y finalmente hasta las 24 horas. La duración del experimento fue de 24 horas
6. Se graficó el logaritmo del número de sobrevivientes en el eje de las "Y" contra el tiempo de incubación del eje de las "X", para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la muerte de la bacteria, se prolongará la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas (Davis et al, 1996).

APÉNDICE 7:

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 20 mL de agar de papa dextrosa, en el cual se inoculará un botón de 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Después que el micelio se ha desarrollado, se colocan discos previamente impregnados con el compuesto activo, la preparación de los discos es igual a la técnica de difusión en agar. Si el primer ensayo es con un extracto crudo, se recomienda usar concentraciones grandes de activo (1-2 mg por disco). Los discos se colocan a una distancia de 30 mm del límite micelial

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

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 agregó 10 µL del solvente empleado para disolver el problema, dejándolos evaporar durante 12 horas (al igual que los experimentales).

Controles positivos

Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 7µg/disco de Ketoconazol.

Interpretación de resultados

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

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

El ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo en cajas petri (60 X 15 mm), que contenían 6 ml de agar papa dextrosa, con las siguientes concentraciones del extracto a probar 2.00, 1.50, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL., posteriormente se colocó una pequeña cantidad de micelio en el centro de la caja.

Incubación

Las placas fueron incubadas a 23°C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se desarrolló.

Controles positivos

Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales incluyendo en el agar las siguientes concentraciones de Ketoconazol. 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.70, 3.50, 7.00, 14.00, 28.00 µg.

Interpretación de resultados.

Los resultados se reportaron en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento, la cual corresponde a CFM; mientras que la concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la CF₅₀. El cálculo de la CF₅₀ se realizó con un modelo matemático.

APÉNDICE 8:

Método de toxicidad general (Método modificado de Niño et. al., 2006)

El ensayo se realizó con larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach). En frascos de vidrio transparentes se colocaron 10 mL de NaCl al 0.5%; posteriormente se colocaron 10 larvas por frasco. La concentración del problema a ensayar son 1000, 100 y 10 ppm (1.0, 0.10, 0.01 mg/mL).

Control Negativo.

Como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), el cual fue el solvente empleado para disolver el problema, se empleó el mismo volumen en que se disolvió la concentración más alta del extracto o compuesto a evaluar (500 µL).

Incubación

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procerca* Kunth (Chupandilla)*

Los cultivos se mantienen iluminados (luz blanca) a una temperatura de 23-25°C durante 24 horas.

Interpretación de resultados

Se cuentan el número de larvas sobrevivientes, las cuales deberán desplazarse de la misma manera que el grupo testigo.

La concentración letal media (CL₅₀) se determinará para cada extracto interpolándolo en gráficas de porcentaje de mortalidad contra la concentración en mg/mL y a través del análisis de regresión lineal.

La actividad tóxica general se considera débil cuando la LC₅₀ está entre 1000 y 500 ppm (0.5 y 1 mg/mL), moderada cuando la LC₅₀ está entre 100 y 500 ppm (0.1 y 0.5 mg/mL), y señalado como fuerte cuando al LC₅₀ se extiende a partir de la 0 a 100 ppm (0 a 1 mg/mL)

APÉNDICE 9:

Método de Reducción del Radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) (Método modificado de Murillo, 2006).

La actividad antioxidante se evaluó midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-30 ppm), por medio de espectrometría UV-VIS.

Aplicación de Sustancias

En una placa de ELISA se adicionan 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (2-30 ppm) por triplicado, el solvente utilizado es metanol grado HPLC. Posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionan 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 100 µM; inmediatamente se protege de

la luz y se mantiene en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA (Método modificado de Murillo, 2006).

Control Negativo

Pozos con 200 µL de metanol.

Control Positivo

Se utiliza quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Interpretación de Resultados

Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C-E/C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del control positivo

E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPPH + compuesto problema).

Debido a que los datos se comportaron como una hipérbola rectangular la ecuación se ajustó sacando los inversos de X y Y, en la ecuación de hipérbola rectangular.

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procerá* Kunth
(Chupandilla)*

REFERENCIAS

1. Aguilar, A. y Camacho, J. R. 1984. Uso popular de las plantas medicinales y su distribución por aparatos y sistemas. Archivos de Investigación Médica. México suplemento. 6:13-14.
2. Ankli, A., M. Heinrich., P. Bork, L. Wolfram, P. Bauerfeind, R. Brun, C. Schmid, C. Weiss, R. Bruggisser, J. Gertsch, M. Wasescha y O. Sticher. 2002. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. Journal of Ethnopharmacology 79, 43-52.
3. Argueta, V. A. y Cano, A. J. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México. 1193 pp.
4. Ávila, A. J. G. 1996. Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional Purepecha. Tesis de Maestría. UNAM. Cuautitlán, México. 104 pp.
5. Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A., Lira, R., 2005. Informat consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, Mexico. Journal of Ethnopharmacology 97, 429–439.
6. Canales, M. M. M. 2005. Base Fitoquímica del Uso Tradicional de Plantas para el Tratamiento de Enfermedades de Posible Origen Bacteriano en San Rafael Coxcatlán, Puebla. Tesis de Doctorado, FES-Iztacala. UNAM. México. DF. 145 pp.
7. Canales, M. M. M. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. Acta Botánica Mexicana 75, 21-43.
8. Chart, H. 2002. Escherichia. Greenwood, D., Slack, C. B. R y Peutherer F. J. En: A guide to microbial infections: medical Microbiology pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control. Edición 16°. Editorial. Churchill Livingstone. 265-267 pp.

9. Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., De Brune, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L. y Vlietinck, A. J. 2002. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils from some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology* 79, 213-220.
10. Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology 12 (4), 564-582.
11. Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N y Ginsberg, H.S. 1996. *Tratado de Microbiología*. 4ª edición. Editorial Masson, S.A. Barcelona. 1559 pp.
12. Domínguez, A. X. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Primera edición. Editorial Limusa. México. 3-17 pp.
13. Fernández, B. Ma. 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. UNAM, México. 98 pp.
14. Foster, T. J. 2000. *Staphylococcus*. En: Samuel Baron. *Medical microbiology. Section I bacteriology*. Capítulo 12. Cuarta edición. Graduate school of biomedical sciences. University of Texas Medical Branch. USA.
15. Frei, B., M. Baltisberger, O. Sticher y M. Heinrich. 1998. Medical ethnobotany of the Zapotecs of the Isthmus-Sierra (Oaxaca, Mexico): Documentation and assessment of indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology* 62, 149-165.
16. García, E., 1981. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Instituto de Geografía, UNAM, México. 252 pp.

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

17. García, G. 1984. Plantas medicinales de la vertiente sur de La Sierra de Pachuca, Hidalgo. Tesis de Licenciatura, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, México 188 pp.
18. Gros, G. E. Pomilio, A. 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.
19. Harborne, J. B. 1973. Phytochemical Methods. Ed. Chapman and Hall. USA 40 pp.
20. Heinrich, M., Ankli, A., Frei, B. y Weimann, C. 1998. Medicinal plants in Mexico: healers consensus and cultural importance. *Social Science and Medicine* 47, 1859-1871.
21. Katzung, G. B., Trevor. J. A. 1997. Farmacología: auto evaluación y repaso. 2° edición. Editorial. El manual moderno. México. México. 851 pp.
22. Koneman, W. E. 1996. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México 439 pp.
23. Maiga, A., Malterud, KE., Diallo, D., Paulsen BS. 2006. Antioxidant and 15-lipoxygenase inhibitory activities of the Malian medicinal plants *Diospyros abyssinica* (Hiem) F. White (Ebenaceae), *Lannea velutina* A. Rich (Anacardiaceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Afzel) Benth. (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 8, 132-137.
24. Medina, S. J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis Licenciatura Biología. UNAM, Facultad de Ciencias, México. 1-6, 35 pp.
25. Miller, A., Solomon, P.H. 2001. Writing Reaction Mechanisms in Organic Chemistry. 2 ed. Ed., San Diego, California, Harcourt Academic Press. 250 pp.

26. Mims, C., Playfair, J., Roitt, I., Wakelín, D., Williams, R. 1999. *Microbiología Médica*. Ed. Harcourt. Barcelona. España. 430-540 pp.
27. Myrving, Q. N., Weissner, R. S. 1991. *Bacteriología y Micología médica*. Ed. Interamericana McGraw-Hill. México. 362-370, 650-658 pp.
28. Murillo, F. 2006. Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas. *Revista Tecnología*. Alfa Editores Técnicos. 27 pp.
29. Nikaido, H y Nakae, T. 1979. The outer membrane of gram-negative bacteria. *Advances in microbial physiology* 20, 163-250.
30. Niño, J., Correa Y. M. y Mosquera, O. M. 2006. Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of 11 Solanaceae Plants from Colombia Biodiversity. *Pharmaceutical Biology* 44 (1), 14-18.
31. Ojewole, J. A. 2005. Antiinflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Mangifera indica* Linn. (Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology* 27(8), 547-54.
32. Olsen, D. E. 2003. *Métodos ópticos de análisis*. Ed. Reverté. México, DF. 535 p.
33. Padmaja, R., Arun, PC. Prashanth, D., Deepak, M., Amit, A., Anjana, M. 2002. Brine shrimp letality bioassay of selected Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 73, 508-510.
34. Rodríguez-López, V., Aguirre-Crespo., Salazar, R., Estrada-Soto, S. 2006. Identification of fatty acid esters and hydrocarbon derivatives from *Cyrtocarpa procera* Kunth by GC-MS. *Natural Product Research* 20 (1), 1-7.

*Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* Kunth
(Chupandilla)*

35. Rosas, L. R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalnepantla, México. 94 pp.
36. Rzedowski, J. y Equihua, M. 1987. Atlas cultural de México. Ed. Secretaría de Educación Pública. Instituto Nacional de Antropología e Historia. Dpo. Editorial Planeta. México. 14-16 pp.
37. Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry* 91, 621-632.
38. Salcedo-Sánchez, B. 1997. Insectos precortesianos de la cuenca de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de licenciatura, Biología, UNAM. Facultad de Ciencias. 6-10 pp.
39. Secretaría de Salud. Censo de Población. 2001. Casa de salud de la comunidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ayuntamiento de Coxcatlán, Puebla, México. 10 pp.
40. Trease, G. E. y Evans, W. Ch. 1987. *Farmacognosia*. 13ª edición. Editorial Interamericana McGrawhill, México. 901 pp.
41. Valiente, B. L. 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis UNAM, México. 65 pp.
42. Valiente- Banuet, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arizmendi, M. C., Ortega-Ramírez, J., Soriano, J. A. 2000. La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 67, 25-75.

43. Vanden Berghe, D. A., Vlietinck, A. J. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: Methods in plant biochemistry. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P. M. Academic Press. New York, USA. 47-71 pp.

44. Vivanco, J. M., Cosío, E., Víctor, M., Loyola-Vargas y Flores, H. E. 2005. Mecanismos químicos de defensa de las plantas. Scientific American Latinoamerica 1, 68-75 pp.

45. Wang, H., Bun, T. N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin -like protein from kiwi fruits. Phytochemistry 61, 1-6.