



UNAM IZTACALA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Jatropha neopauciflora* Pax

**T E S I S P R O F E S I O N A L
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
ANA BERTHA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ**



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MÉXICO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia 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:

Dr. César Mateo Ortiz Flores

Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado.

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Biol. Luis Barbo Hernández Portilla.

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

UNAM PAPCA 2009-2010

UNAM PAPIIT 207808

Plantas útiles de San Rafael, Coxcatlán

(MGU/Useful Plants Project Mexico)

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM y a la FESI por haberme aceptado y permitido cumplir una de las metas más grandes de mi vida.

A los profesores que realizaron la evaluación y revisión de este trabajo cuyos comentarios y consejos fueron muy valiosos para la conclusión del mismo:

A la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez por ser un gran ser humano, gracias profesora por guiarme y apoyarme en todo mi trabajo y confiar en mí para seguir adelante en todos los planes que tenemos, pero sobre todo le agradezco la gran amistad que me ha brindado y el cariño que le tiene a Andrea. La queremos mucho.

A la Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado por el apoyo brindado en todo momento y por sus comentarios tan acertados acerca de mi trabajo. Gracias por la amistad que me ha brindado y por todos los consejos que he recibido de usted.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, por sus observaciones y consejos sobre mi trabajo y por brindarme su amistad. Gracias profesor por los momentos tan divertidos y por las muestras de cariño que ha tenido para mi hija.

Al Dr. Cesar Mateo Flores Ortiz y al Biol. Luis Barbo Hernández Portilla por sus comentarios y observaciones que enriquecieron de manera notable este trabajo.

DEDICATORIAS

Sin duda alguna esta tesis se la dedico a mi familia la cual siempre me ha amado y apoyado incondicionalmente a lo largo de toda mi vida.

***Papá** te agradezco todo el amor que he recibido de ti durante toda mi vida. Aunque he tenido errores en mi vida tu gran apoyo y protección siempre han estado a mi lado. Papi gracias por abrirme las puertas de tu casa y de tu corazón a mi hija y a mí cuando más te necesitaba, gracias por amar a Andrea como si fuera tu hija. TE AMO PAPÁ.*

***Mamá** tu sabes que eres mi mejor amiga, eres mi cómplice y consejera, sin tu gran comprensión y amor no hubiera podido llegar hasta donde he llegado. Te agradezco por haberme dado la vida y por comprender y apoyarme en las decisiones que he tomado en mi vida. Gracias por ver a mi hija como si fuera tuya. TE AMO MAMITA.*

***Andrea**, tú sabes todo lo que significas para mí, eres lo más grandioso y valioso que la vida me ha dado. Gracias hija por entenderme, por todas las veces que te dejé sola, por los cambios tan bruscos que has tenido en tu corta vida y por el amor que me tienes que es mi mayor tesoro. Sabes, estoy muy orgullosa de ti porque eres una niña muy inteligente que pudo entender las cosas y ver siempre para adelante, eres mi gran apoyo. TE AMO HIJA.*

***Patricia** has sido un gran apoyo en toda mi vida y aunque eres menor que yo, eres una mujer madura que ha sabido afrontar los problemas en su vida con valor y orgullo, gracias por darme a mi sobrinita Jimena y mi cuñado Adrián. TE QUIERO MUCHO.*

***Raúl**, aunque a veces tenemos fricciones, posiblemente por la diferencia de edad, yo te quiero mucho, y los dos sabemos que podemos contar el uno con el otro, porque finalmente para eso es la familia. TE QUIERO MUCHO.*

***Toño**, a pesar de que nuestras vidas son distintas, eres una persona importante para mí, pues tenemos en común un gran tesoro, nuestra hija, gracias por el apoyo que me has dado por 16 años, sabes que tú también cuentas conmigo.*

DEDICATORIAS

A mis grandes amigos de la carrera y de la vida, los cuales han sido un gran apoyo en las diferentes etapas de mi vida:

Mónica Núñez, Karla Gutiérrez y Erika Rosales, ustedes fueron mis primeras amigas en la carrera, les agradezco el apoyo y el cariño que tuvieron para mí, y aunque cada quien ya tomó caminos diferentes la amistad siempre va a existir.

Alonso Rincón y Juan Carlos Alcántar, gracias por todos los momentos buenos y malos que hemos pasado, nuestra amistad ha pasado por varias pruebas y afortunadamente seguimos siendo amigos.

Cindy Ortíz y Susana Angeles, amiguitas las quiero mucho, gracias por brindarme su amistad cuando más la necesitaba y por todos los momentos felices que hemos pasado juntas. Ustedes fueron un gran apoyo en mi carrera.

Miguel Ángel Trinidad, eres uno de mis mejores amigos, te has convertido en mi confidente, eres una gran persona que sabe escuchar a la gente. Te Quiero Mucho mugroso.

Lupita Eleno, Rebeca Rivera, Karla Martínez, Julieta Orozco, Melissa Miguel y Ricardo López, mis grandes amigos del laboratorio, los quiero mucho, gracias a ustedes mi tiempo en el laboratorio fue muy agradable, lleno de risas y sintiendo el apoyo de cada uno de ustedes día con día.

Marisol Calderón sabes que te quiero mucho, tu apoyo y consejos han sido muy valiosos, y aunque hemos tenido algunos problemas, sabemos que finalmente nuestra amistad es muy valiosa. Gracias por darme a mi sobrinita Fernanda.

Berenice Macedo, te aprecio mucho, sé que eres una mujer trabajadora y que has sabido salir adelante de alguna o de otra manera y te admiro por eso, sabes que siempre vas a contar con mi amistad. Gracias por darme a mi sobrinita Aideé.

Erika Ovilla, fuiste una pieza fundamental para mi vida. Te agradezco haberme enseñado el camino a la felicidad y lo importante que es perdonar y olvidar.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	6
OBJETIVO GENERAL.....	7
OBJETIVOS PARTICULARES.....	7
METODOLOGÍA.....	8
Colecta de la planta.....	8
Obtención de los extractos.....	8
Evaluación de la actividad antifúngica.....	8
Levaduras.....	9
Evaluación cualitativa.....	9
Hongos filamentosos.....	9
Evaluación cualitativa.....	9
Evaluación cuantitativa.....	9
Prueba de Toxicidad general.....	9
Pruebas estadísticas.....	10
Evaluación de la actividad Antioxiooxidante.....	10
Fraccionamiento Biodirigido.....	10
RESULTADOS.....	11
Colecta de la planta.....	11
Rendimiento del extracto.....	11
Actividad antifúngica.....	12
Evaluación cualitativa.....	12
Evaluación cuantitativa.....	13

Toxicidad general.....	25
Actividad antioxidante.....	28
Fraccionamiento Biodirigido.....	29
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	32
DISCUSIÓN.....	33
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	39
APÉNDICE 1. Descripción botánica de la planta estudiada.....	40
APÉNDICE 2. Síntesis bibliográfica del género <i>Jatropha</i>	41
APÉNDICE 3. Zona de colecta.....	45
APÉNDICE 4. Técnica de maceración.....	48
APÉNDICE 5. Método de difusión en agar.....	48
APÉNDICE 6. Inhibición del crecimiento radial.....	50
APÉNDICE 7. Método de Toxicidad general.....	52
APÉNDICE 8. Método de reducción del DPPH.....	53
REFERENCIAS.....	54

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Datos etnobotánicos de la especie.....	11
Cuadro 2. Rendimiento del extracto de <i>J. neopauciflora</i>	11
Cuadro 3. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de <i>J. neopauciflora</i>	12
Cuadro 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>R. solani</i>	13
Cuadro 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>R. lilacina</i>	15
Cuadro 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>F. sporotrichioides</i>	16
Cuadro 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>F. moniliforme</i>	18
Cuadro 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>F. moniliforme</i> CDBB-H-265.....	19
Cuadro 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>T. mentagrtophytes</i>	21
Cuadro 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>T. mentagrtophytes</i> CDBB-H-1112.....	22
Cuadro 11. Evaluación cuantitativa de los hongos.....	24
Cuadro 12. Porcentaje de muerte de <i>Artemia salina</i> de los extractos M1, M2, Hexano y Mh de <i>J. neopauciflora</i>	25
Cuadro 13. Toxicidad media de los diferentes extractos de <i>J. neopauciflora</i> ..	25
Cuadro 14. Actividad antioxidante media de los diferentes extractos de <i>J. neopauciflora</i>	28
Cuadro 15. Rendimiento del extracto M2 y actividad antifúngica sobre <i>T. mentagrophytes</i> CDBB-H-112.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>R. solani</i>	14
Figura 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>R. lilacina</i>	15
Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>F. sporotrichum</i>	17
Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>F. moniliforme</i>	18
Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>F. moniliforme</i> CDBB-H-265.....	20
Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>T. mentagrophytes</i>	21
Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de <i>J. neopauciflora</i> sobre <i>T. mentagrophytes</i> CDBB-H-1112.....	23
Figura 8. Porcentaje de muerte de <i>Artemia salina</i> con el extracto M1 de <i>J. neopauciflora</i>	26
Figura 9. Porcentaje de muerte de <i>Artemia salina</i> con el extracto M2 de <i>J. neopauciflora</i>	26
Figura 10. Porcentaje de muerte de <i>Artemia salina</i> con el extracto Hexánico de <i>J. neopauciflora</i>	27
Figura 11. Porcentaje de muerte de <i>Artemia salina</i> con el extracto Mh de <i>J. neopauciflora</i>	27
Figura 12. Porcentaje de reducción de los extractos de <i>J. neopuciflora</i> comparados con el control positivo (catequina).....	28
Figura 13. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción 41 de <i>J. neopuciflora</i>	32

RESUMEN

La medicina tradicional mexicana es una importante manifestación cultural, característica de la vida del país. Herederas de una larga tradición prehispánica, las culturas indígenas de México han preservado y difundido formas y procedimientos eficaces para resolver importantes problemas de salud de la población. México tiene uno de los mayores índices de especies endémicas, es decir, de aquéllas que sólo crecen en un territorio específico. Se calcula que 54.2% de las plantas vasculares de México son especies endémicas, entre éstas se encuentra *J. neopauciflora* Pax. Esta especie se utiliza en San Rafael, Coxcatlán, Puebla para tratar heridas e infecciones bucales, en piezas dentales flojas y en el tratamiento del pie de atleta. Con base en lo anterior el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de *J. neopauciflora*.

Utilizando 670 g. de la parte aérea de la planta y 45 g. de hoja se obtuvieron los extractos por el método de maceración. La actividad antifúngica se evaluó por el método de inhibición del crecimiento radial. Se realizaron pruebas de toxicidad general utilizando como modelo experimental las larvas nauplio II de *Artemia salina*. La actividad antioxidante se evaluó por el método de reducción del DPPH. Se realizó una cromatografía en columna con 25 g del extracto metanólico. Por los rendimientos obtenidos de los extractos, se puede decir que esta especie tiene en su mayoría compuestos de naturaleza polar, ya que el rendimiento del extracto hexánico fue menor en comparación con el metanólico crudo (M1) y el metanólico libre de compuestos no polares (M2).

M1 y M2 mostraron actividad antifúngica en todas las cepas ensayadas a excepción de *Aspergillus sp.* y *A. niger*, el extracto hexánico y el metanólico de hojas (Mh) no mostraron ninguna actividad. La cepa más sensible fue *T. mentagrophytes* con una $CF_{50} = 0.70$ mg/mL para M1 y $CF_{50} = 0.52$ mg/mL para M2 y fue la única cepa que alcanzó el 100% de inhibición con una CFM de 4 mg/mL.

En cuanto a la toxicidad general, el único extracto que presentó una toxicidad moderada fue Mh ($CL_{50} = 290$ ppm) mientras que los otros tres extractos presentaron una toxicidad fuerte ($CL_{50} = 17.42$ ppm para M1, $CL_{50} = 11.28$ ppm para M2, y una $CL_{50} = 41.66$ ppm para el extracto hexánico).

La actividad antioxidante de M1 mostró el valor de CA_{50} = 105 ppm, para M2 la CA_{50} fue de 109 ppm y por último para el extracto Mh la CA_{50} fue de 31.42 ppm. De la cromatografía en columna se obtuvieron 62 fracciones que fueron probadas en la cepa más sensible (*T. mentagrophytes*), mostrando que 43 fracciones tienen actividad.

La fracción 41 se sometió a una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas mostrando que ésta contiene arabinol, β -sitosterol y lupeol.

Estos resultados validan el uso de *Jatropha neopauciflora* dentro de la medicina tradicional de San Rafael municipio de Coxcatlán, Puebla.

INTRODUCCIÓN

El hombre ha hecho uso de los productos de la naturaleza desde tiempos inmemoriales, no sólo para satisfacer su necesidad de alimento, sino también con el fin de sanar sus enfermedades, cicatrizar sus heridas y elevar su estado de ánimo.

Aunque el uso de las hierbas con fines terapéuticos estaba asociada (y lo estuvo durante muchos siglos) a ritos mágicos y religiosos, y su carácter curativo se atribuyó a las fuerzas divinas, hay que resaltar que esta utilización estaba basada, por encima de todo, en un buen conocimiento de la planta, adquirido empíricamente y transmitido de padres a hijos a través de muchas generaciones (Trease y Evans, 1993).

Los primeros documentos escritos de la historia de la humanidad, con una antigüedad de más de 6000 años, incluyen ya descripciones de algunas hierbas medicinales. Los asirios por ejemplo, eran conocedores de 250 especies de plantas con propiedades curativas, los babilónicos utilizaban plantas como beleño y menta para curar sus enfermedades. Es notable también la importancia de las hierbas medicinales en la cultura mesopotámica, de la cual se conservan documentos conteniendo más de 250 especies distintas de plantas, entre las que se encuentran la adormidera, belladona, mandrágora, beleño, cáñamo, azafrán, tomillo, ajo, cebolla, regaliz, sen asafétida y mirra (Alonso, 2004).

Las culturas Asiáticas han mostrado desde sus albores un gran interés por la fitoterapia y han dejado valiosos escritos, como el herbario más antiguo conocido de unos 5000 años de antigüedad, que recopila y describe 1000 plantas medicinales (Trease y Evans, 1993).

Con respecto a la India, utilizaban a la *Rauwolfia* que curaba enfermedades mentales y la epilepsia, su principal substancia activa, la reserpina, se ha podido aislar y se usa hoy en día como tranquilizante y para disminuir la tensión. El hecho de que tanto chinos como hindúes hallaran remedios hace más de 4000 años para enfermedades como el asma y el resfriado común, las cuales eran tratadas con *Cannabis*, nos da idea del avanzado conocimiento que habían adquirido ambos pueblos en el uso de las propiedades terapéuticas de las plantas, que usaban como hierbas medicinales (Trease y Evans, 1993).

Muy interesante también es la aparición en esta época de los conceptos de prescripción y receta, esto es, la adquisición del conocimiento de la dosificación en cada tratamiento, no solo en virtud de mejorar su acción sino también para evitar posibles efectos nocivos en el organismo (Trease y Evans, 1993).

Entre los antiguos griegos, cuatro hombres contribuyeron de forma especial a la medicina botánica. Hipócrates, a fines del siglo V y principios del siglo IV a.C., mencionó una lista de 300 a 400 plantas medicinales. Hipócrates es notable, casi de un modo único, en no asociar la demonología a las propiedades curativas de las plantas. Aristóteles (384-322 a. C.) asignó a cada planta las propiedades y virtudes entonces conocidas. Teofrasto (372-287 a. C.), fundamentalmente botánico, describió muchas plantas griegas y extranjeras refiriéndose también a su uso. Su tratado "Historia de las plantas" tuvo una fundamental influencia en el desarrollo de la botánica y la medicina durante casi veinte siglos. Sin embargo, el escritor médico – botánico más influyente fue Dioscórides (primer siglo d. C.) cuya obra "De Materia Médica" no solo sienta las bases para los grandes herbarios europeos de la Edad Media, sino que se convirtió en el prototipo de nuestras grandes farmacopeas. La influencia de Dioscórides es abrumadora: hasta el Renacimiento, fue la autoridad infalible tanto en medicina como en botánica. Gran parte del conocimiento europeo de plantas surge directamente de los escritos de Dioscórides (Bruneton, 1991).

Dada la gran cantidad de plantas que se descubrieron en el Continente Americano, se hicieron los primeros herbarios americanos, el primero de los cuales fue el "Manuscrito Badiano". Muchas de las plantas, que los mexicanos utilizaban como alucinógenos, son de gran importancia en la medicina moderna, como el peyote y otras ricas en alcaloides (muy utilizadas por la ginecología actual). Siguiendo con México, en Coahuila se han encontrado restos de plantas como el cacto, peyote, mezcal y semillas de castaño mexicano utilizadas con fines médicos en lugares donde el hombre vivió hace 8000 años (Trease y Evans, 1993).

La medicina tradicional mexicana es una importante manifestación cultural, característica de la vida del país. Herederas de una larga tradición prehispánica, las culturas indígenas de México han preservado y difundido

formas y procedimientos eficaces para resolver importantes problemas de salud de la población. Las plantas medicinales son el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional mexicana, entre 70 y 80% de la población recurre a plantas para curar padecimientos que van de un simple resfriado hasta aquellos que pueden clasificarse de filiación cultural (aire, mal de ojo, etc.) incluyendo enfermedades de tipo gastrointestinal, dermatitis, etc. Sin embargo, de las más de 6000 especies usadas con fines terapéuticos en el país, sólo el 10% han sido estudiadas a nivel farmacológico, microbiológico y fitoquímico, esto es, que únicamente el 10% tiene una convalidación experimental de su uso popular (Aguilar et al., 1994).

La existencia de la medicina tradicional mexicana se debe sin duda a la gran diversidad biológica de nuestro país. México es reconocido como un país megadiverso en el cual están representados casi todos los tipos de vegetación del planeta. Se ha calculado que nuestro país contiene 10% de la flora del mundo (Aguilar et al., 1994.) La revisión minuciosa de la literatura, ha permitido estimar hasta la fecha una riqueza florística de 22 411 especies (sin incluir casi un millar adicional de especies introducidas, es decir, que no son nativas del país). Estas cifras ubican a México en el tercer lugar de la clasificación mundial por su número de plantas vasculares. Además, México tiene uno de los mayores índices de especies endémicas, es decir, de aquéllas que sólo crecen en un territorio específico. Se calcula que 54.2% de las plantas vasculares de México son especies endémicas (Magaña y Villaseñor, 2002).

Entre estas especies endémicas se encuentra *Jatropha neopauciflora* Pax, de la familia Euphorbiaceae, una de las más diversas entre las angiospermas. Su floración es durante el periodo de sequía, en el que la planta pierde sus hojas y sólo se observan sus flores de color rojo. Es un arbusto de porte robusto que alcanza alturas hasta de 2 m. Esta planta es usada en el tratamiento de heridas e infecciones bucales y cuando existen piezas dentales flojas (para amacizar) (Canales et al., 2006 y 2005b; Arias et al., 2001). Informes recientes han descrito la actividad antibacteriana del látex de la corteza de *J. neopauciflora* (Canales, 2005a) (Apéndice 1).

ANTECEDENTES

En general la familia Euphorbiaceae ha sido estudiada ampliamente e incluso son comercializadas para aliviar diferentes padecimientos, como es el caso de *Croton urucurana* (Gurgel, et. al., 2005), que fue probada en cinco hongos dermatofitos obteniendo resultados positivos en cuanto a la actividad antifúngica, *Phyllanthus amarus* es otra Euphorbiaceae que fue probada sobre *Microsporium gypseum* (Abad et al., 2007), el extracto clorofórmico de ésta especie presentó actividad significativa inhibitoria contra este hongo dermatofito. Ogunnusi y Dosumu en el 2008 realizaron estudios de toxicidad con cinco extractos de *Euphorbia kamerunica* mostrando que los extractos de ésta son altamente tóxicos.

El género *Jatropha* ha sido estudiado fitoquímicamente y en algunos casos se ha determinado la actividad biológica de los compuestos aislados como algunos péptidos cíclicos que actúan sobre la proliferación de células T y tienen actividad antimalaria (Baraguey et al., 2000) (Apéndice 2).

Kamergan y colaboradores (1997), realizaron estudios de toxicidad con *Jatropha curcas* utilizando un solvente de polaridad baja (éter de petróleo), obteniendo altos porcentajes de mortalidad. El extracto metanólico de las hojas de *Jatropha gaueri* mostraron una actividad antioxidante significativa (Can-Ake et al., 2004).

En particular sobre *J. neopauciflora* se han realizado escasos estudios fitoquímicos, como los realizados por García y Delgado (2006 a, b,) de los cuales obtuvieron sesquiterpenos de la corteza de esta planta, también se han reportado estudios donde se probó la actividad antibacteriana de esta especie (Canales 2005a).

Tomando en cuenta lo anterior y la información del estudio etnobotánico realizado por Canales et al., (2006), donde se menciona que *J. neopauciflora* es utilizada en San Rafael (Puebla) para aliviar enfermedades de posible origen microbiano es de esperar entonces que esta especie sintetice uno o varios compuestos con actividad antimicrobiana.

OBJETIVOS.

Objetivo General: Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de *Jatropha neopauciflora*.

Objetivos particulares:

1. Determinar el rendimiento de los extractos de diferente polaridad obtenidos mediante la técnica de maceración.
2. Evaluar cualitativamente y cuantitativamente la actividad antifúngica de los extractos de *J. neopauciflora* utilizando el método de difusión en agar Kirby - Baüer para levaduras y la técnica de inhibición del crecimiento radial para los hongos filamentosos.
3. Determinar la toxicidad general de los extractos activos usando el modelo de *Artemia salina*.
4. Evaluar la actividad antioxidante de los extractos de *J. neopauciflora* utilizando el método de reducción del DPPH.
5. Realizar un fraccionamiento biodirigido con el extracto que tuvo mayor actividad por medio de una cromatografía en columna abierta.
6. Separar las fracciones de diferente polaridad realizando cromatografías de placa fina.
7. Caracterizar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios en la fracción activa mediante una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en un Cromatógrafo de Gases (Modelo 6850) acoplado a un Espectro de Masas (Modelo 5975C), ambos marca Agilent Technologies, fabricados en China; columna HP-5MS (fabricada en USA) de 30 metros de longitud, 0.25 mm diámetro interno y película de 0.25 µm.

METODOLOGÍA

Colecta de material

La planta con la que se realizó este trabajo (*J. neopauciflora*) fue colectada en Agosto de 2008 en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, Puebla (Apéndice 3). Se depositó un ejemplar en el Herbario IZTA con el número MCM6.

Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos herbales, se tomaron 1000 g. de la parte aérea de la planta seca de *J. neopauciflora*; una vez cortada en pedazos pequeños se obtuvo el extracto metanólico mediante la técnica de maceración (Domínguez, 1973) (Apéndice 4). Se realizó una partición del extracto crudo metanólico con hexanos para determinar que polaridad presenta la actividad antifúngica y si ésta incrementa o disminuye. De esta forma se obtuvieron el extracto metanólico crudo (**M1**), el extracto metanólico libre de compuestos no polares (**M2**) y el extracto hexánico (**H**).

Evaluación de la actividad antifúngica.

Para la evaluación de la actividad antifúngica se utilizaron las siguientes cepas de hongos:

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.

Hongos filamentosos:

Aspergillus niger, *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium sporotrichioides* 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

Evaluación cualitativa.

La actividad antifúngica sobre levaduras se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 5). Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con Nistatina (10 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.

HONGOS FILAMENTOSOS

Evaluación cualitativa.

Para el análisis cualitativo se utilizó la técnica de inhibición del crecimiento radial (Apéndice 6) usando una concentración de 2000 µg por disco del extracto a probar y como control positivo Ketoconazol (7 µg) y como control negativo se utilizaron sensidiscos impregnados con 10µL de metanol (Wang y Bun, 2002).

Evaluación cuantitativa.

Para la determinación de la concentración fungicida media (CF₅₀) y la concentración fungicida mínima (CFM), se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial reportado por Wang y Bun, 2002 (Apéndice 6). Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 µg/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 Nauplio II de *Artemia salina* (Leach), siguiendo el método modificado de Niño et al. (2006) con las concentraciones: 1000, 100 y 10 µg/mL, los ensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 7).

Pruebas estadísticas

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

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 8). Se evaluó el extracto a diferentes concentraciones (2-30 ppm).

Fraccionamiento Biodirigido.

Se realizó una cromatografía en columna abierta, donde la fase estacionaria fue sílica gel de malla 70-230 μm .

La cromatografía en columna abierta se realizó con 25 g. del extracto activo, la fase móvil consistió en mezclas de solvente en orden creciente de polaridad.

RESULTADOS.

Colecta de la planta.

La planta de *Jatropha neopauciflora* fue colectada en Agosto de 2008 en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, Puebla. Los datos de la especie se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Datos etnobotánicos de la especie.

Nombre científico	<i>Jatropha neopauciflora</i>
Nombre común	Sangre de grado
Familia	Euphorbiaceae
Parte utilizada	Parte aérea y látex
Forma de uso	Tópica

Rendimiento del extracto.

Los extractos obtenidos de la parte aérea de *J. neopauciflora* (metanólico crudo M1, metanólico libre de compuestos no polares M2, hexánico y metanólico de la hoja Mh) se muestran en el cuadro 2. M2 tuvo un mayor rendimiento en comparación con el extracto hexánico, lo cual indica que esta especie presenta una mayor cantidad de compuestos con polaridad alta.

Cuadro 2. Rendimiento del extracto de *J. neopauciflora*

Extracto	Rendimiento (g)	%
M1	31.73	4.73
M2	30.43	4.54
Hexánico	1.30	0.19
Mh	6.90	15.23

El rendimiento en % de *J. neopauciflora* se calculó con respecto a 670 g. de la parte aérea. Para la hoja se calculó con base en 45.3 g.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Evaluación cualitativa.

Los resultados obtenidos de la evaluación antifúngica cualitativa demostraron que tanto el extracto M1 como M2 tienen actividad antifúngica sobre las mismas cepas, ya que la inhibición se presentó en las mismas cepas para los dos extractos. El extracto hexánico y Mh no presentaron actividad sobre ninguna cepa fúngica ensayada.

Cuadro 3. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de *J. neopauciflora*.

Planta	Extracto	Cepas Fúngicas								
		Rs	RI	Fs	Fm	FmC	Tm	TmC	Asp	An
Parte aérea de <i>J. neopauciflora</i>	M1	√	√	√	√	√	√	√	×	×
	M2	√	√	√	√	√	√	√	×	×

Resultados obtenidos a partir de tres repeticiones √ = Inhibición × = No inhibición

Rs= *Rhizoctonia solani*, RI= *Rhizoctonia lilacina*, Fs= *Fusarium sporotrichioides*, Fm= *Fusarium moniliforme*, FmC= *Fusarium moniliforme* CDBB-H-265, Tm= *Trichophyton mentagrophytes*, TmC= *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112, Asp= *Aspergillus sp.*, An= *Aspergillus niger*.

En cuanto a las levaduras, ningún extracto presentó actividad sobre *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*.

Evaluación Cuantitativa.

Rhizoctonia solani.

Los porcentajes de inhibición de las concentraciones evaluadas para los dos extractos (M1 y M2) sobre *R. solani* se muestran en el cuadro 4, observando que el extracto M1 tuvo mayor porcentaje de inhibición (64.6%) respecto a M2 (53.3%) en la concentración más alta (2 mg/mL). En la figura 1 se observa el comportamiento de los dos extractos sobre *R. solani*. La $CF_{50} = 1.352$ mg/mL para M1 y para M2 la $CF_{50} = 1.519$ mg/mL. Se realizó una prueba de t para comparar las pendientes y no existen diferencias significativas en las tazas de inhibición de los extractos M1 y M2 ($T = 1.09$, $p > .05$) sobre *R. solani*.

Cuadro 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *R. solani*

Concentración (mg/mL)	M1 % Inhibición	M2
0.25	0 ± 0.00	0 ± 0.00
0.50	36 ± 0.57	0 ± 0.00
0.75	40 ± 1.00	9.3 ± 1.15
1.00	42.6 ± 0.57	46.6 ± 0.00
1.50	46.6 ± 0.00	53.3 ± 1.00
2.00	64.6 ± 0.57	53.3 ± 1.00

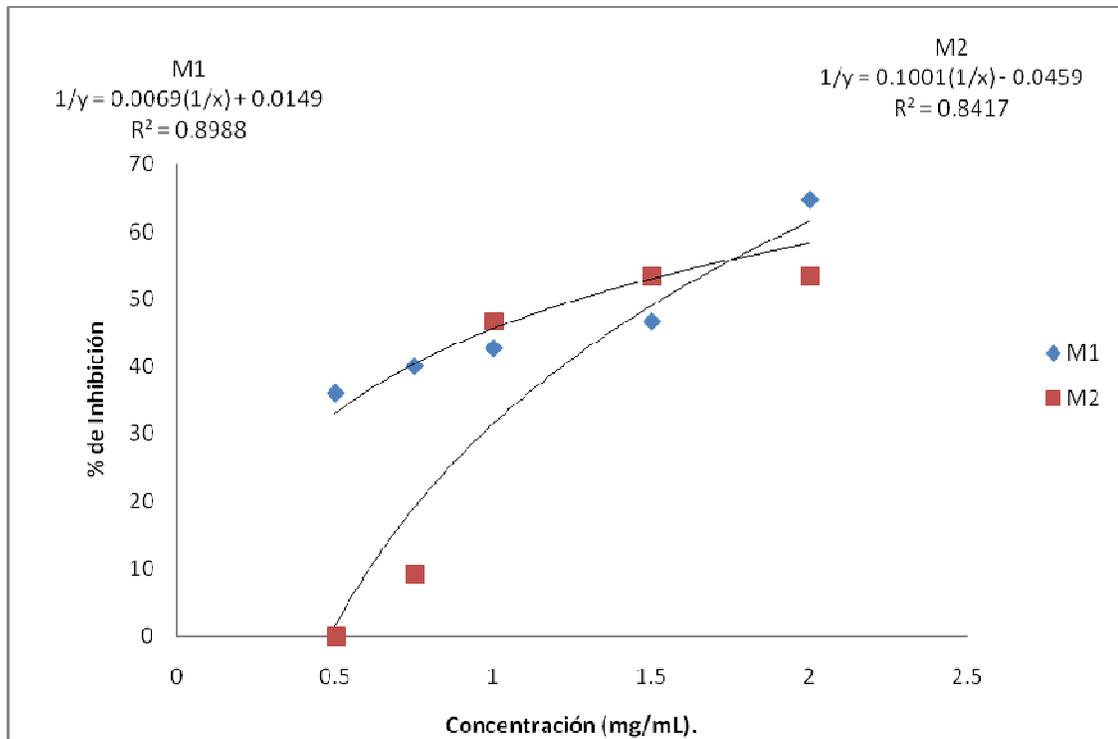


Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *Rhizoctonia solani*.

***Rhizoctonia lilacina*.**

El porcentaje de inhibición en *R. lilacina* es muy similar en los dos extractos, aunque ninguno alcanza el 100% de inhibición (Cuadro 5). La CF_{50} de M1 es de 0.556 mg/mL y para M2 es de 0.462 mg/mL.

La tasa de inhibición de los dos extractos no presentó diferencias significativas, ya que el comportamiento de los extractos fue muy parecido ($T=.256$ $p>.05$).

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *R. lilacina*.

Concentración (mg/mL)	M1 % Inhibición	M2
0.25	33.3 ± 1.73	42.6 ± 0.57
0.50	46.6 ± 0.00	46.6 ± 0.00
0.75	58.0 ± 1.15	46.6 ± 0.00
1.00	58.0 ± 0.57	60.0 ± 1.00
1.50	64.6 ± 0.57	64.6 ± 0.57
2.00	71.3 ± 0.57	73.3 ± 0.00

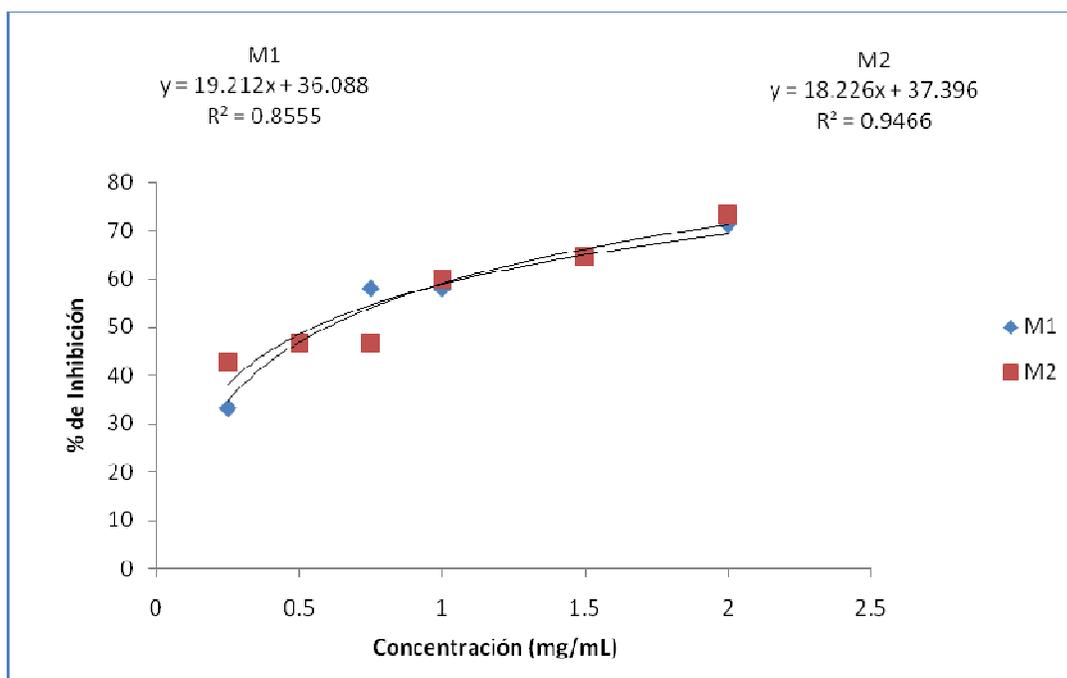


Figura 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *R. lilacina*.

Fusarium sporotrichioides

El extracto M1 presentó mayor porcentaje de inhibición sobre *F. sporotrichioides* (Cuadro 6). La prueba de T mostró que no hay diferencias significativas entre M1 y M2 sobre *F. sporotrichioides* (2.54 $p > .05$), sin embargo la concentración fungicida media fue menor en M1 ($CF_{50} = 1.510$ mg/mL) que en M2 ($CF_{50} = 3.83$ mg/mL).

Cuadro 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *F. sporotrichioides*

Concentración (mg/mL)	M1 % Inhibición	M2 % Inhibición
0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.50	24.4 ± 0.57	24.4 ± 0.57
0.75	33.3 ± 0.00	33.3 ± 0.00
1.00	42.6 ± 0.57	33.3 ± 0.00
1.50	49.3 ± 0.57	37.8 ± 0.57
2.00	53.3 ± 0.00	46.6 ± 0.00

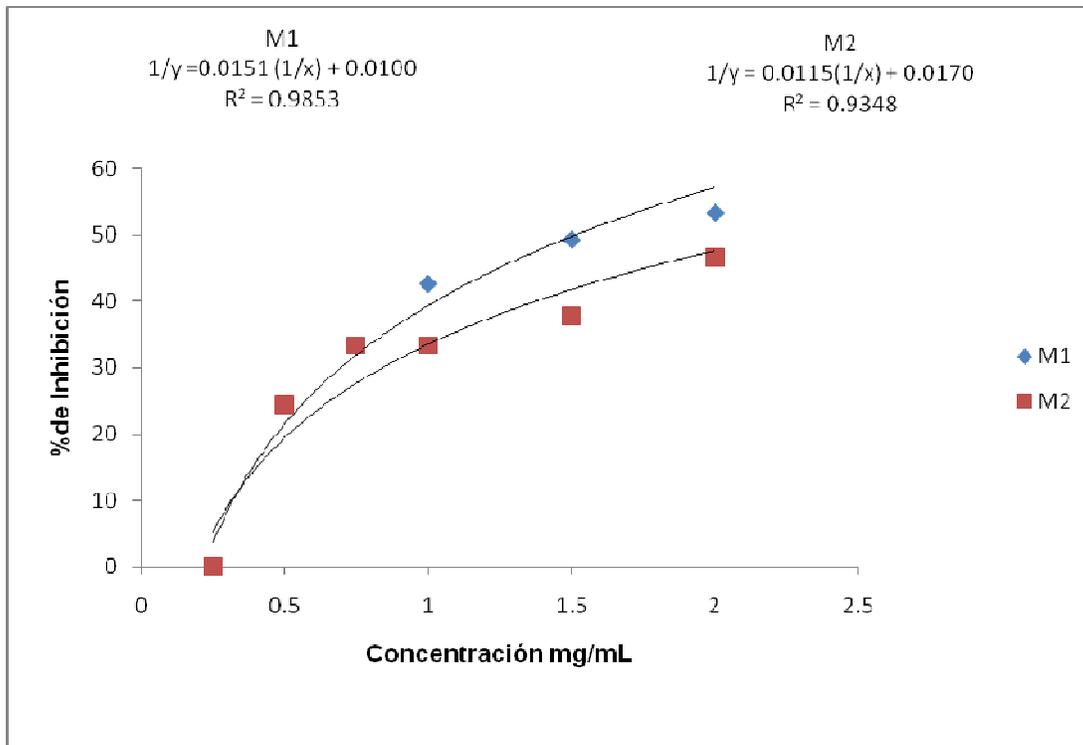


Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *F. sporotrichioides*.

Fusarium moniliforme

La cepa de *F. moniliforme* presentó mayor sensibilidad con el extracto M2 con un 60% de inhibición (Cuadro 7).

El extracto M1 presentó una $CF_{50} = 1.625$ mg/mL y para M2 la CF_{50} fue de 0.818 mg/mL (Fig. 4).

La inhibición de *F. moniliforme* fue más rápida con el extracto M2, aunque la prueba de T indica que no hay diferencias significativas ($T = -.51$ $p > .05$) (Fig.4).

Cuadro 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *F. moniliforme*

Concentración (mg/mL)	M1 % Inhibición	M2
0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.50	33.3 ± 1.00	42.6 ± 0.57
0.75	38.0 ± 1.15	46.6 ± 0.00
1.00	40.0 ± 1.00	53.3 ± 0.57
1.50	49.3 ± 1.52	56.0 ± 0.57
2.00	56.0 ± 1.15	60.0 ± 1.00

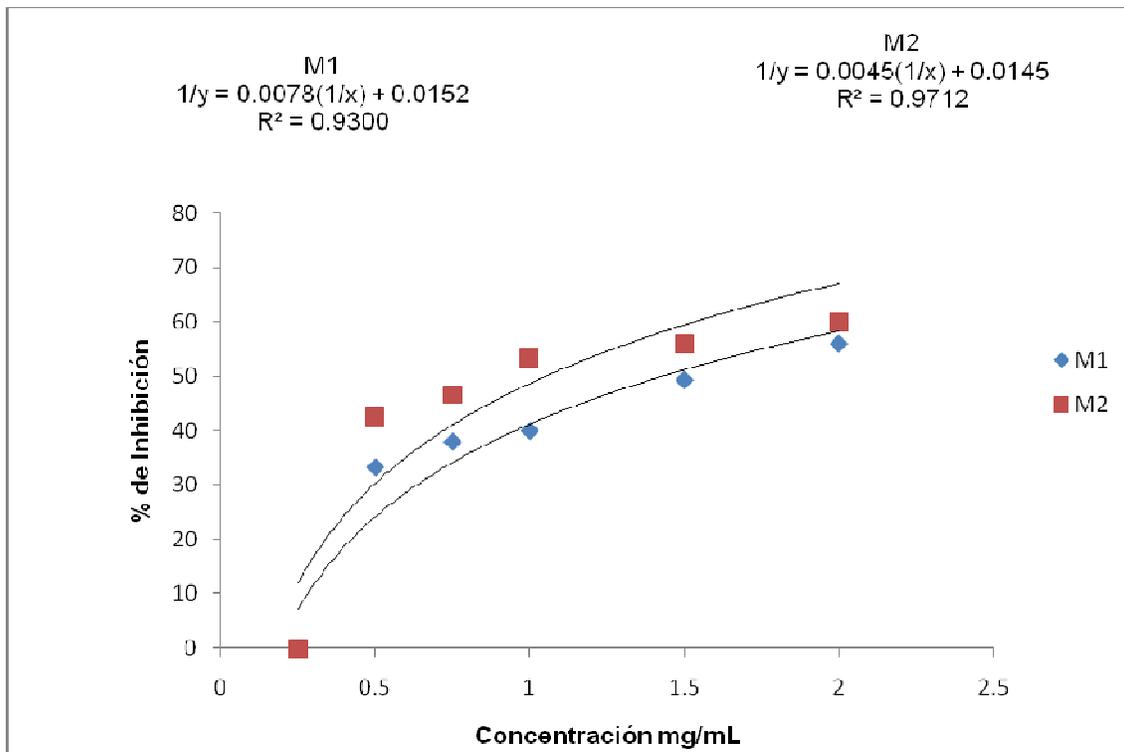


Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *F. moniliforme*.

***Fusarium moniliforme* CDBB-H-265.**

A pesar que el extracto M1 mostró menor porcentaje de inhibición en las concentraciones bajas, al final tuvo el mismo porcentaje en la concentración de 2 mg/mL con un 44.6% (Cuadro 8). La CF_{50} = 2.318 mg/mL para M1 y la CF_{50} = 6.85 mg/mL para M2. Los extractos M1 y M2 no presentaron diferencias significativas en las tasas de inhibición para *F. moniliforme* CDBB-H-265 (T = .63 $p > .05$).

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *F. moniliforme* CDBB-H-265.

Concentración (mg/mL)	M1	M2
	% Inhibición	
0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.50	0.00 ± 0.00	26.6 ± 0.00
0.75	16.0 ± 0.57	31.1 ± 0.57
1.00	18.0 ± 0.57	36.0 ± 0.57
1.50	33.3 ± 0.00	38.0 ± 0.57
2.00	44.6 ± 0.57	44.6 ± 0.57

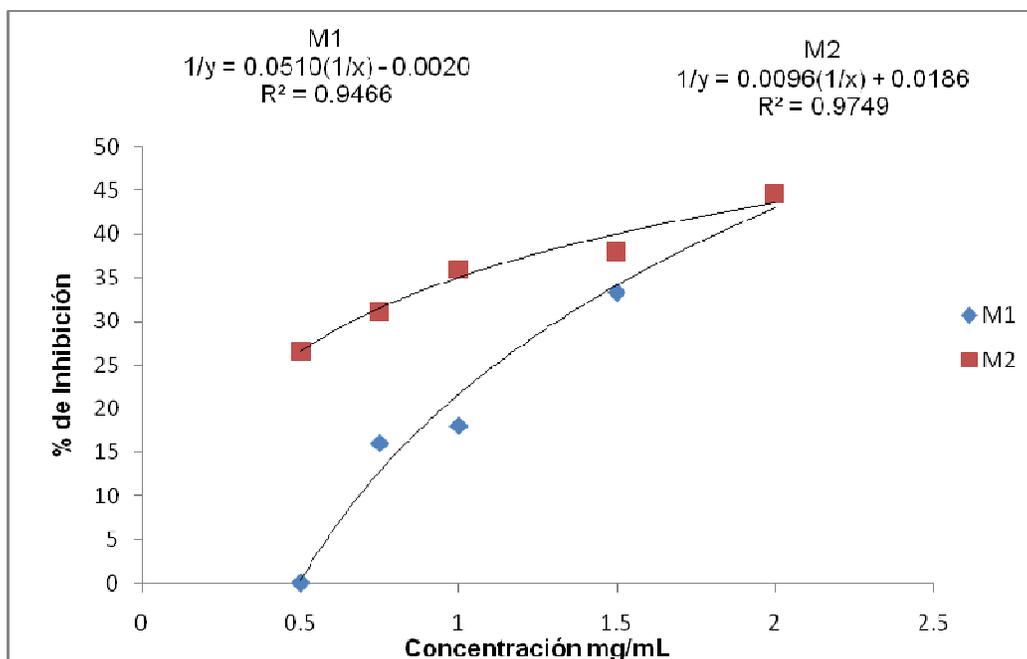


Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *F. moniliforme* C.

Trichophyton mentagrophytes

En el cuadro 9 se observa que para *T. mentagrophytes* el extracto M2 tuvo mayor porcentaje de inhibición en la mayoría de las concentraciones. La CF_{50} = 2.3820 mg/mL para M1 y CF_{50} = 1.2070 mg/mL para M2.

El extracto M2 tuvo una mayor tasa de inhibición (26.46), alcanzando un porcentaje de 60%. Aunque no hay diferencias significativas con respecto a M1 ($T = -.93$ $p > .05$) (Fig.6).

Cuadro 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *T. mentagrophytes*.

Concentración (mg/mL)	M1	M2
0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.50	24.4 ± 0.57	36.0 ± 0.57
0.75	33.3 ± 0.00	40.0 ± 0.00
1.00	33.3 ± 0.00	48.8 ± 0.57
1.50	38.0 ± 1.15	49.3 ± 0.57
2.00	56.0 ± 0.57	60.0 ± 0.00

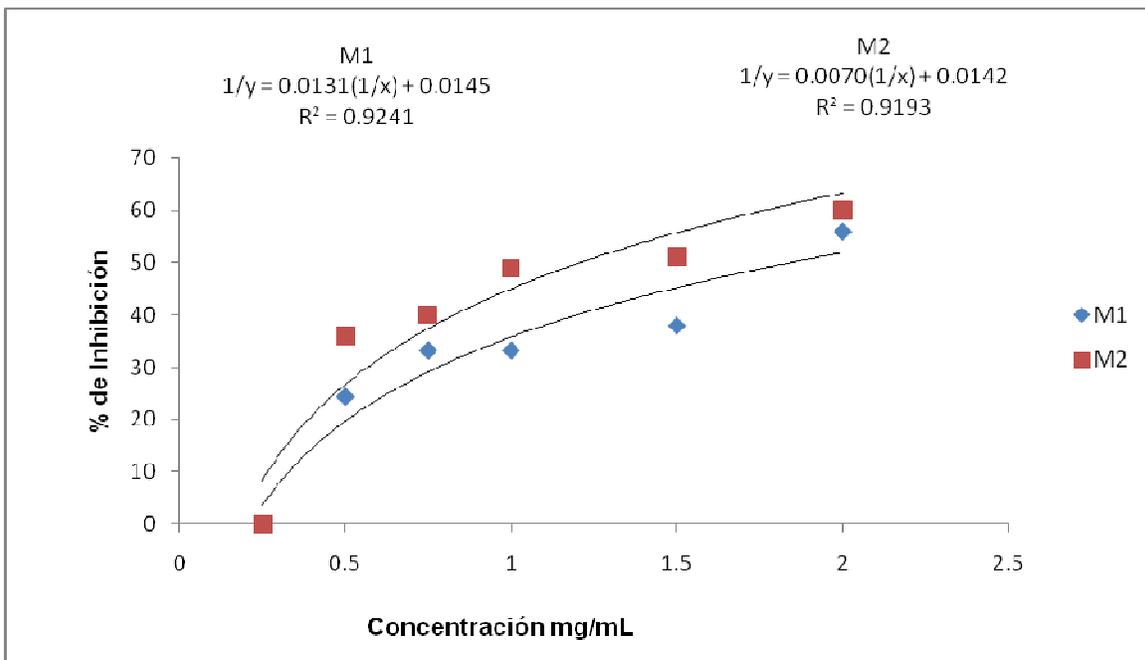


Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *T. mentagrophytes*.

***Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112**

Fue la única cepa que tuvo el 100% de inhibición con los dos extractos con una concentración de 4 mg/mL (Cuadro 10).

Para el extracto M1, la CF_{50} = 0.7069 mg/mL, y para M2, la CF_{50} = 0.526 mg/mL.

En la figura 7 se observa que M2 tiene mayor porcentaje de inhibición, pero la prueba de T indicó que no hay diferencias significativas ($T = -.93$ $p > .05$).

Cuadro 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112.

Concentración (mg/mL)	M1 % Inhibición	M2 % Inhibición
0.25	31.3 ± 0.57	31.3 ± 0.57
0.50	36.0 ± 0.57	46.6 ± 0.00
0.75	44.6 ± 0.57	53.3 ± 1.00
1.00	49.3 ± 0.57	69.3 ± 0.57
1.50	71.3 ± 0.57	86.6 ± 0.00
2.00	78.0 ± 0.57	91.33 ± 0.57
4.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00

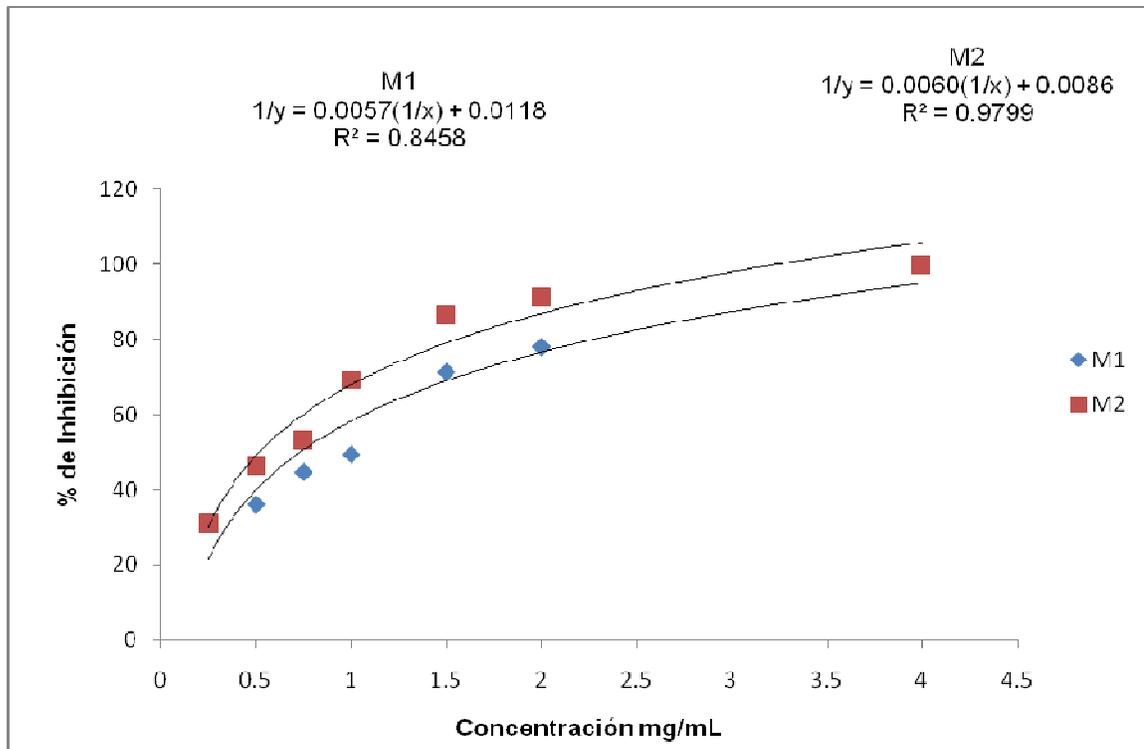


Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112

Es importante resaltar que el ensayo se realizó con concentraciones más altas de extracto, (4, 5, 6, 7 y 8 mg/mL), observando que ninguna cepa alcanzó el 100% de inhibición a excepción de *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112, que con una concentración de 4mg/mL, se obtuvo el 100% de inhibición en los dos extractos. En las otras cepas a partir de 2 mg/mL se mantuvo el mismo porcentaje de inhibición, aún aumentando la concentración del extracto.

En cuanto a *Aspergillus sp.*, y *Aspergillus niger*, ninguno de los dos extractos presentó actividad antifúngica, a pesar que también se probaron en concentraciones más altas de 2 mg/mL (4, 5, 6, 7 y 8 mg/mL).

En el cuadro 11 se muestra la CF₅₀ de los extractos M1 y M2, comparados con el ketoconazol (control positivo). La cepa más sensible a los dos extractos fue *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112 con una CF₅₀ = 0.765 mg/mL para M1 y CF₅₀ = 0.526 mg/mL para M2.

Cuadro 11. Evaluación cuantitativa de los hongos.

Cepa fúngica	M1	M2	Ketoconazol
	CF ₅₀	CF ₅₀	CF ₅₀
	mg/mL	mg/mL	µg/mL
<i>R. solani</i>	1.352	1.519	19.677
<i>R. lilacina</i>	0.556	0.462	21.566
<i>F. sporotrichioides</i>	1.510	3.83	3.90
<i>F. moniliforme</i>	1.625	0.818	7.55
<i>F. moniliforme</i> CDBB-H-265.	2.318	6.85	3.473
<i>T. mentagrophytes</i>	2.382	1.207	-
<i>T. mentagrophytes</i> CDBB-H-1112	0.765	0.526	1.166
<i>Aspergillus sp</i>	Sin actividad	Sin actividad	9.757
<i>Aspergillus niger</i>	Sin actividad	Sin actividad	15.297

CF₅₀ = concentración fungicida media.

TOXICIDAD GENERAL

La evaluación de toxicidad general, se realizó con los extractos M1, M2, Hexano y Mh de *J. neopauciflora* sobre la larva nauplio II de *Artemia salina*. En el cuadro 12 se muestran los resultados obtenidos, observando que el mayor porcentaje de muerte en las tres concentraciones se tiene en los extractos M1 y M2.

Cuadro 12. Porcentaje de muerte de *Artemia salina* de los extractos M1, M2, Hexano y Mh de *J. neopauciflora*

CONCENTRACIÓN		% DE MUERTE			
ppm	M 1	M2	HEXANO	Mh	
1000	100	100	97	100	
100	77	87	54	37	
10	37	47	23	30	

En el cuadro 13 se tienen los datos calculados de la toxicidad media para cada uno de los extractos ensayados. Estos datos fueron obtenidos con base a los modelos calculados.

Cuadro 13. Toxicidad media de los diferentes extractos de *J. neopauciflora*

Extracto	CL ₅₀ (ppm)	Toxicidad
M1	17.42	Fuerte
M2	11.286	Fuerte
Hexánico	41.66	Fuerte
Mh	289.61	Moderada

Toxicidad según el criterio de Niño et al. (2006).

Control positivo: Ácido gálico (CL₅₀= 321.5 ppm).

El extracto M1 obtuvo una CL₅₀ de 17.42 ppm, mostrando que el extracto tiene una toxicidad fuerte según el método modificado de Niño et. al., 2006 (Fig. 8).

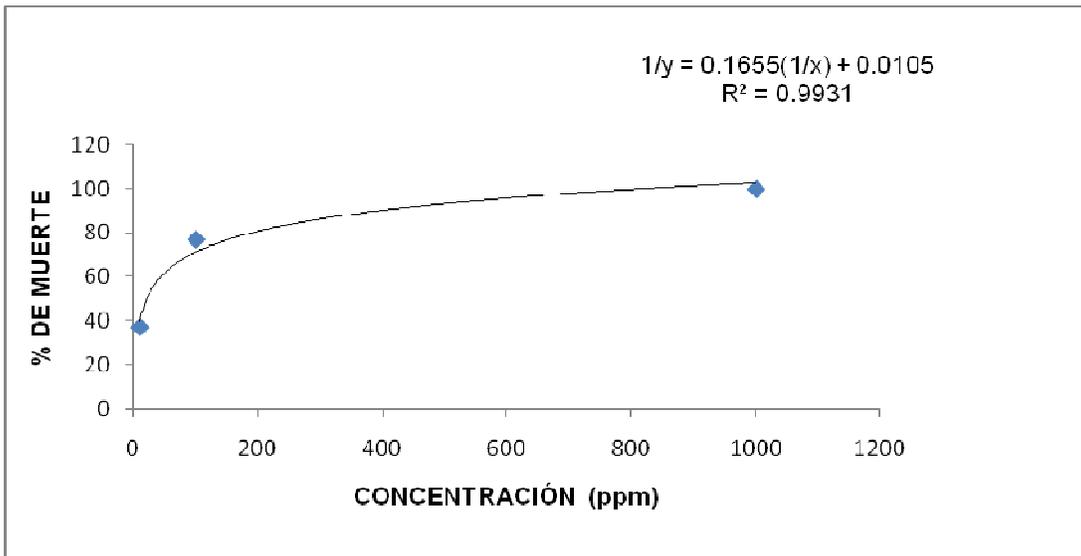


Figura 8. Porcentaje de muerte de *Artemia salina* con el extracto M1 de *J. neopauciflora*

El extracto M2 tuvo un mayor porcentaje de muerte en las tres concentraciones en comparación con todos los extractos, y su CL₅₀ de 11.286 ppm, muestra que el extracto es de toxicidad fuerte (Fig. 9).

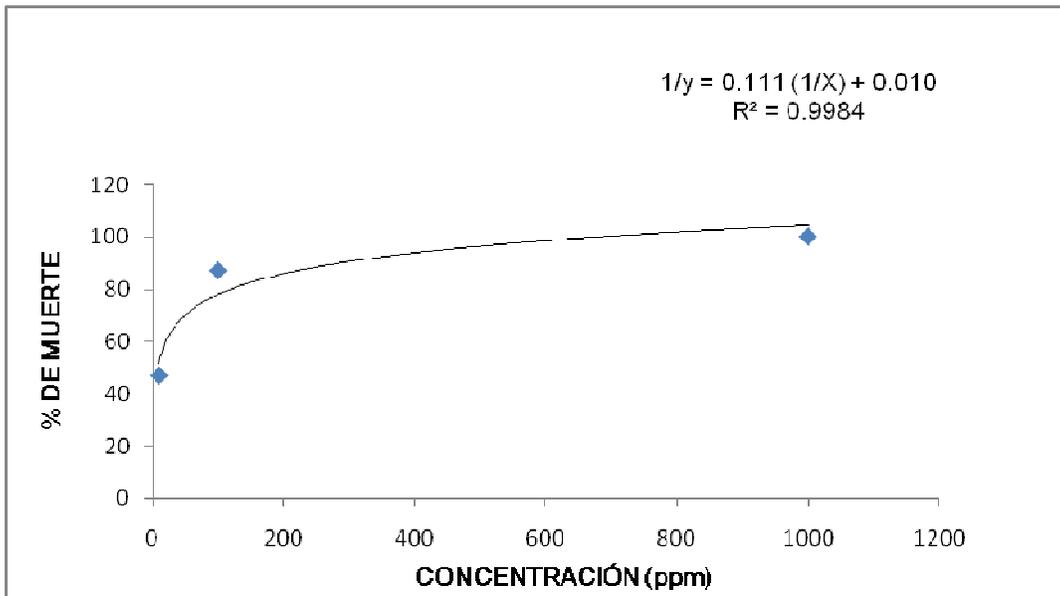


Figura 9. Porcentaje de muerte de *Artemia salina* con el extracto M2 de *J. neopauciflora*.

La CL₅₀ del extracto hexánico es de 41.66 ppm. mostrando que este extracto es de toxicidad fuerte (Fig. 10).

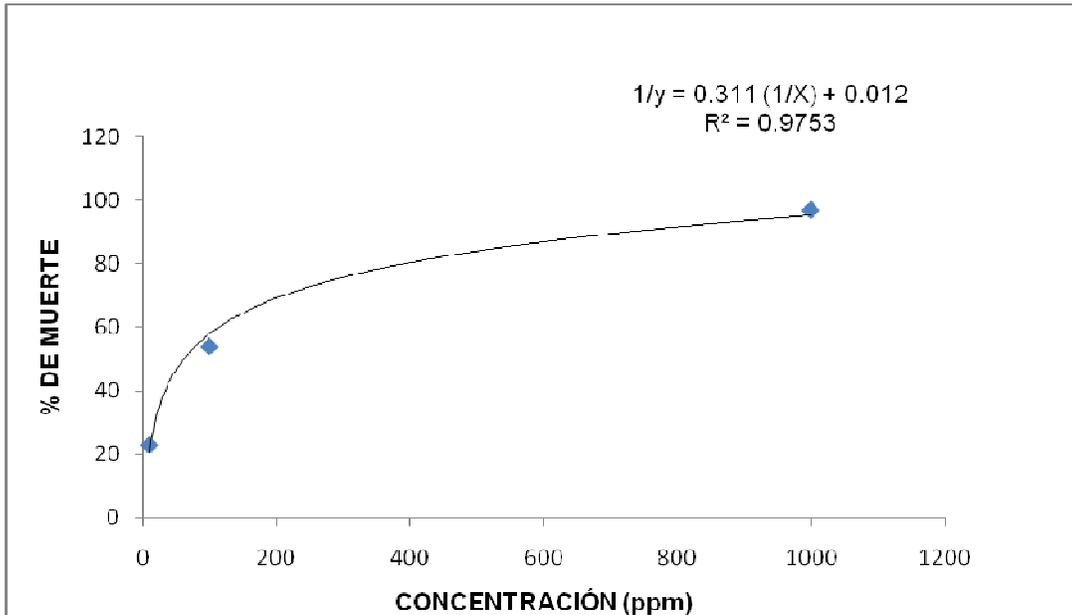


Figura 10. Porcentaje de muerte de *Artemia salina* con el extracto Hexánico de *J. neopauciflora*

Para la hoja de *J. neopauciflora* la toxicidad que presenta es moderada, la CL₅₀ fue de 289.61 ppm. (Fig. 11).

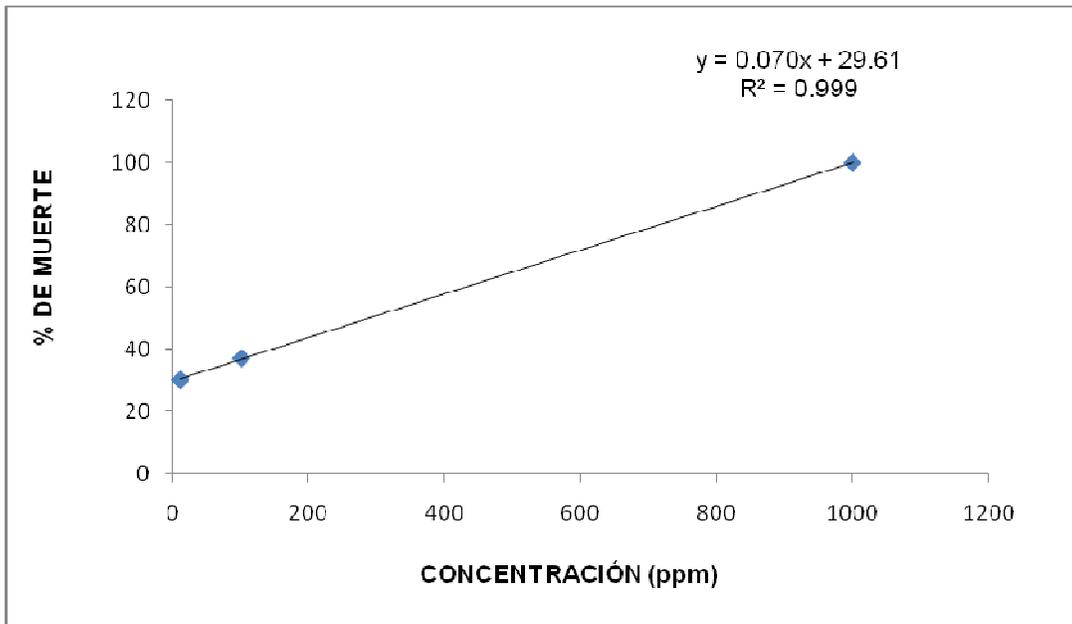


Figura 11. Porcentaje de muerte de *Artemia salina* con el extracto Mh de *J. neopauciflora*

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo con los extractos M1, M2 y Mh de *J. neopauciflora* (Cuadro 14). Los valores de la CA₅₀ fueron obtenidos con base a los modelos calculados con los datos graficados en la figura 12.

Cuadro 14. Actividad antioxidante media de los diferentes extractos de *J. neopauciflora*.

Extracto	CA ₅₀ (mg/mL).
M1	105
M2	108.8
Mh	31.42

Control positivo: Catequina (CA₅₀=2.83 mg/mL).

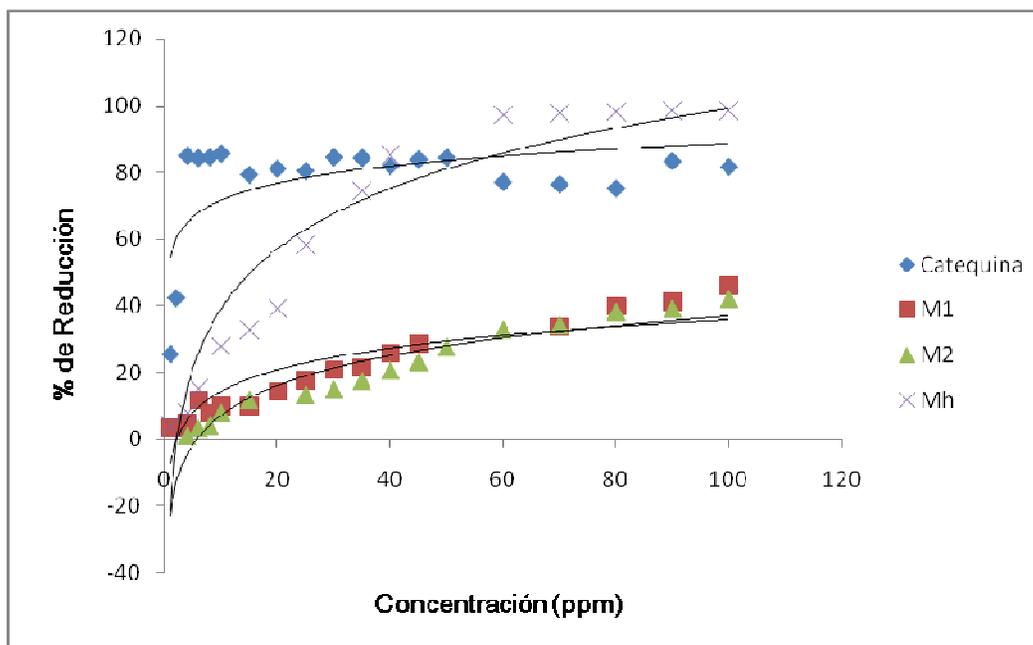


Fig.12. Porcentaje de reducción de los extractos de *J. neopauciflora* comparados con el control positivo (catequina).

El extracto Mh fue el que presentó mejor actividad antioxidante en comparación con M1 y M2 ya que presentó una CA₅₀ de 31.42 ppm.

FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO

De la cromatografía en columna abierta del extracto M2, se obtuvieron 48 fracciones de las cuales 32 mostraron actividad antifúngica sobre *T. mentagrophytes*. En el cuadro 12 se muestra el rendimiento y la actividad en cada fracción.

Cuadro 15. Rendimiento del extracto M2 y actividad antifúngica sobre *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112.

Fase móvil	Fracción	Rendimiento (gr).	Actividad
H	1	2.3311	√
	2	0.3944	√
H9: AcOEt 1	3	0.3540	√
H8: AcOEt 2	4	0.0984	√
	5	0.1924	√
	6	0.0683	√
H7: AcOEt 3	7	0.1358	√
	8	0.3699	√
	9	0.0298	√
H7:AcOEt 3	10	0.0736	√
	11	0.3507	√
	12	0.0230	×
	13	0.0651	√
	14	0.1249	√
	15	0.1334	√

	16	0.2687	√
H6:AcOEt	17	0.1104	×
H5:AcOEt	18	0.1262	√
H4:AcOEt	19	0.1327	√
	20	0.1606	×
	21	0.0521	√
H3: AcOEt	22	0.328	×
H2: AcOEt	23	0.3465	√
	24	0.4194	×
	25	0.2297	×
	26	0.1323	×
H1:AcOEt	27	0.0479	×
	28	0.0463	×
	29	0.2111	×
	30	0.0556	√
AcOEt	31	0.1236	√
AcOEt9:MeOH	32	0.2372	√
	33	0.5823	×
	34	0.4217	√
	35	0.418	√
	36	0.2984	√

	37	0.2461	√
	38	0.0177	√
AcOEt 8:MeOH 2	39	0.1971	√
	40	0.3026	√
	41	0.7459	√
AcOEt 7:MeOH 3	42	0.0186	√
	43	0.2148	×
	44	0.1808	×
AcOEt 6:MeOH 4	45	0.1728	×
AcOEt 5:MeOH 5	46	0.0926	×
MeOH	47	1.1605	√
	48	3.2775	×

Actividad = √ Sin actividad = ×

H: hexano, AcOEt: acetato de etilo, MeOH: metanol.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La fracción 41 al presentar uno de los mayores rendimientos, mayor actividad en las pruebas cualitativas sobre *T. mentagrophytes*, y la formación de cristales, fue sometida a una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, mostrando que esta fracción contiene β - sitosterol, lupeol y arabinitol (Fig. 13).

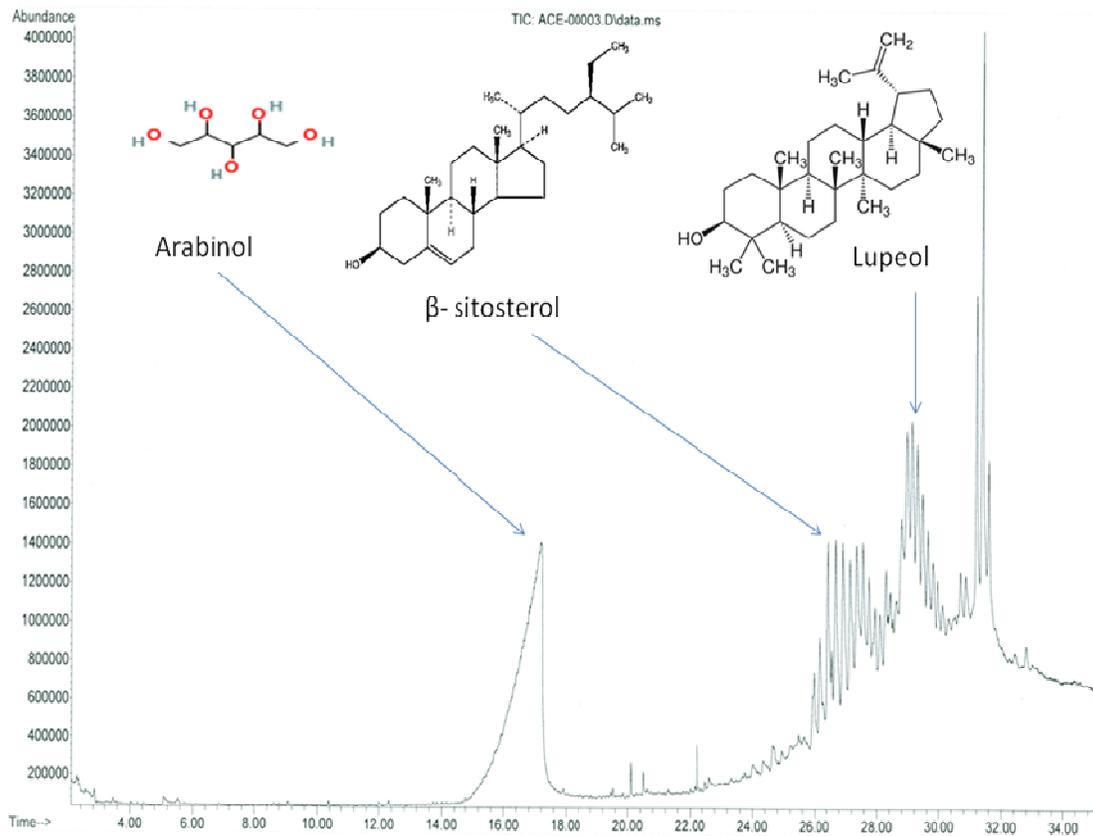


Fig. 13. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción 41 de *J. neopauciflora*.

RESULTADOS.

Colecta de la planta.

La planta de *Jatropha neopauciflora* fue colectada en Agosto de 2008 en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, Puebla. Los datos de la especie se presentan en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Datos etnobotánicos de la especie.

Nombre científico	<i>Jatropha neopauciflora</i>
Nombre común	Sangre de grado
Familia	Euphorbiaceae
Parte utilizada	Parte aérea y látex
Forma de uso	Tópica

Rendimiento del extracto.

Los extractos obtenidos de la parte aérea de *J. neopauciflora* (metanólico crudo M1, metanólico libre de compuestos no polares M2, hexánico y metanólico de la hoja Mh) se muestran en el cuadro 2. M2 tuvo un mayor rendimiento en comparación con el extracto hexánico, lo cual indica que esta especie presenta una mayor cantidad de compuestos con polaridad alta.

Cuadro 2. Rendimiento del extracto de *J. neopauciflora*

Extracto	Rendimiento (g)	%
M1	31.73	4.73
M2	30.43	4.54
Hexánico	1.30	0.19
Mh	6.90	15.23

El rendimiento en % de *J. neopauciflora* se calculó con respecto a 670 g. de la parte aérea. Para la hoja se calculó con base en 45.3 g.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Evaluación cualitativa.

Los resultados obtenidos de la evaluación antifúngica cualitativa demostraron que tanto el extracto M1 como M2 tienen actividad antifúngica sobre las mismas cepas, ya que la inhibición se presentó en las mismas cepas para los dos extractos. El extracto hexánico y Mh no presentaron actividad sobre ninguna cepa fúngica ensayada.

Cuadro 3. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de *J. neopauciflora*.

Planta	Extracto	Cepas Fúngicas								
		Rs	RI	Fs	Fm	FmC	Tm	TmC	Asp	An
Parte aérea de <i>J. neopauciflora</i>	M1	√	√	√	√	√	√	√	×	×
	M2	√	√	√	√	√	√	√	×	×

Resultados obtenidos a partir de tres repeticiones √ = Inhibición × = No inhibición

Rs= *Rhizoctonia solani*, RI= *Rhizoctonia lilacina*, Fs= *Fusarium sporotrichioides*, Fm= *Fusarium moniliforme*, FmC= *Fusarium moniliforme* CDBB-H-265, Tm= *Trichophyton mentagrophytes*, TmC= *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112, Asp= *Aspergillus sp.*, An= *Aspergillus niger*.

En cuanto a las levaduras, ningún extracto presentó actividad sobre *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*.

Evaluación Cuantitativa.

Rhizoctonia solani.

Los porcentajes de inhibición de las concentraciones evaluadas para los dos extractos (M1 y M2) sobre *R. solani* se muestran en el cuadro 4, observando que el extracto M1 tuvo mayor porcentaje de inhibición (64.6%) respecto a M2 (53.3%) en la concentración más alta (2 mg/mL). En la figura 1 se observa el comportamiento de los dos extractos sobre *R. solani*. La $CF_{50} = 1.352$ mg/mL para M1 y para M2 la $CF_{50} = 1.519$ mg/mL. Se realizó una prueba de t para comparar las pendientes y no existen diferencias significativas en las tasas de inhibición de los extractos M1 y M2 ($T = 1.09$, $p > .05$) sobre *R. solani*.

Cuadro 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *R. solani*

Concentración (mg/mL)	M1 % Inhibición	M2
0.25	0 ± 0.00	0 ± 0.00
0.50	36 ± 0.57	0 ± 0.00
0.75	40 ± 1.00	9.3 ± 1.15
1.00	42.6 ± 0.57	46.6 ± 0.00
1.50	46.6 ± 0.00	53.3 ± 1.00
2.00	64.6 ± 0.57	53.3 ± 1.00

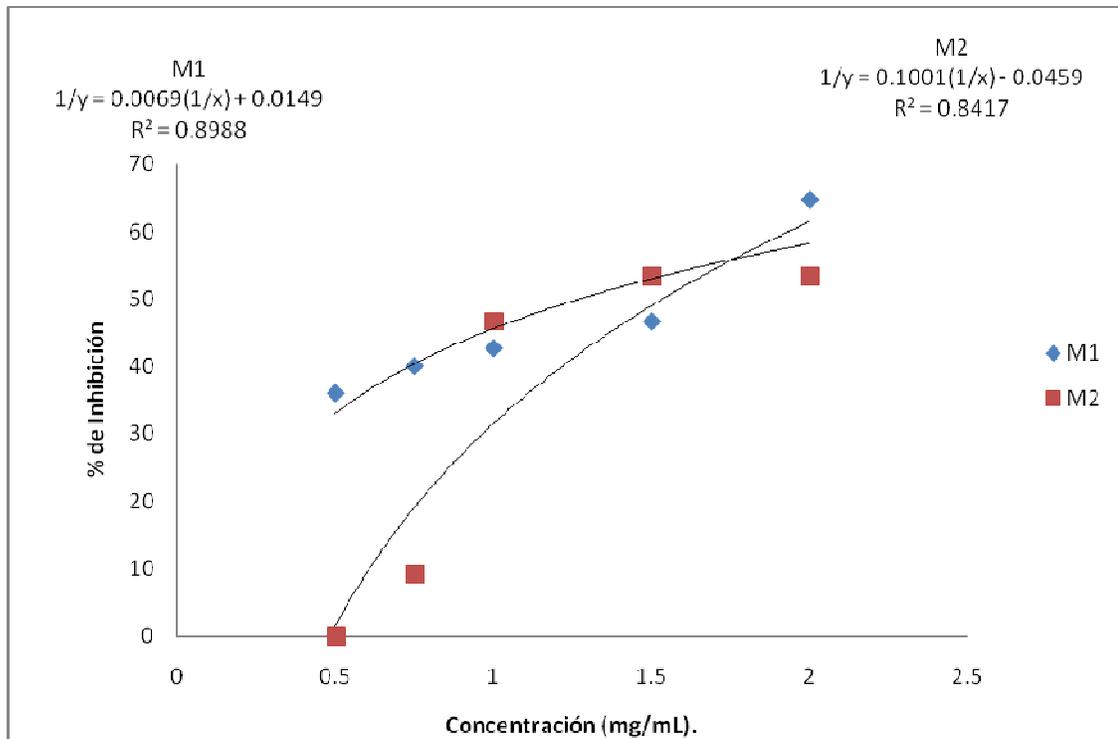


Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *Rhizoctonia solani*.

Rhizoctonia lilacina.

El porcentaje de inhibición en *R. lilacina* es muy similar en los dos extractos, aunque ninguno alcanza el 100% de inhibición (Cuadro 5). La CF₅₀ de M1 es de 0.556 mg/mL y para M2 es de 0.462 mg/mL.

La tasa de inhibición de los dos extractos no presentó diferencias significativas, ya que el comportamiento de los extractos fue muy parecido (T=.256 p>.05).

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *R. lilacina*.

Concentración (mg/mL)	M1 % Inhibición	M2
0.25	33.3 ± 1.73	42.6 ± 0.57
0.50	46.6 ± 0.00	46.6 ± 0.00
0.75	58.0 ± 1.15	46.6 ± 0.00
1.00	58.0 ± 0.57	60.0 ± 1.00
1.50	64.6 ± 0.57	64.6 ± 0.57
2.00	71.3 ± 0.57	73.3 ± 0.00

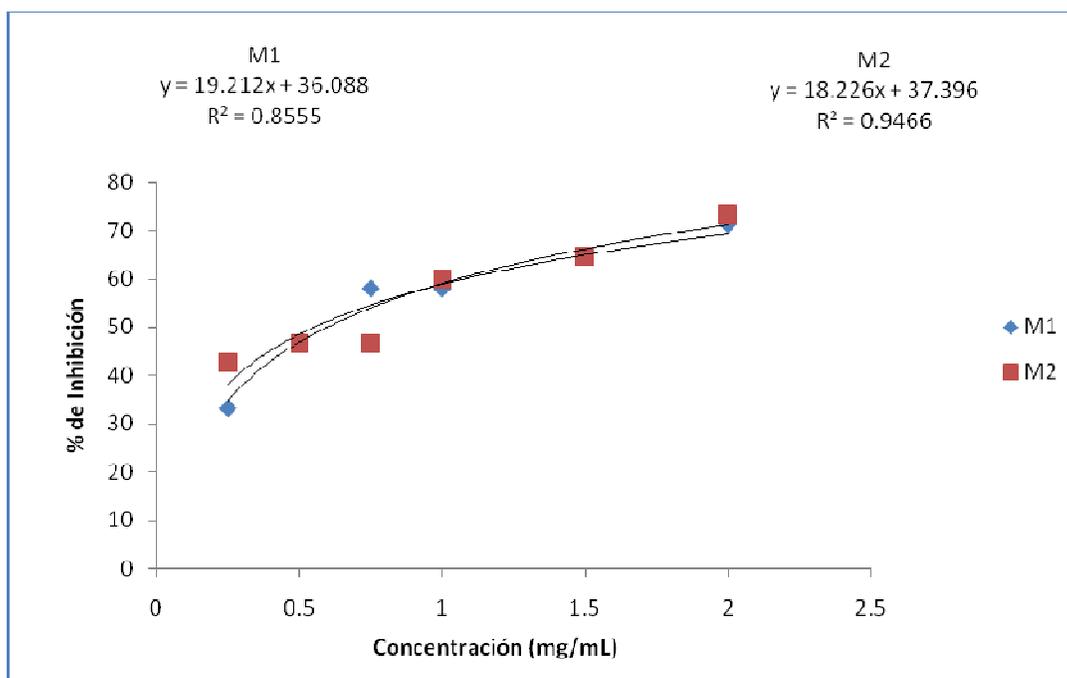


Figura 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *R. lilacina*.

Fusarium sporotrichioides

El extracto M1 presentó mayor porcentaje de inhibición sobre *F. sporotrichioides* (Cuadro 6). La prueba de T mostró que no hay diferencias significativas entre M1 y M2 sobre *F. sporotrichioides* (2.54 $p > .05$), sin embargo la concentración fungicida media fue menor en M1 ($CF_{50} = 1.510$ mg/mL) que en M2 ($CF_{50} = 3.83$ mg/mL).

Cuadro 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *F. sporotrichioides*

Concentración (mg/mL)	M1 % Inhibición	M2
0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.50	24.4 ± 0.57	24.4 ± 0.57
0.75	33.3 ± 0.00	33.3 ± 0.00
1.00	42.6 ± 0.57	33.3 ± 0.00
1.50	49.3 ± 0.57	37.8 ± 0.57
2.00	53.3 ± 0.00	46.6 ± 0.00

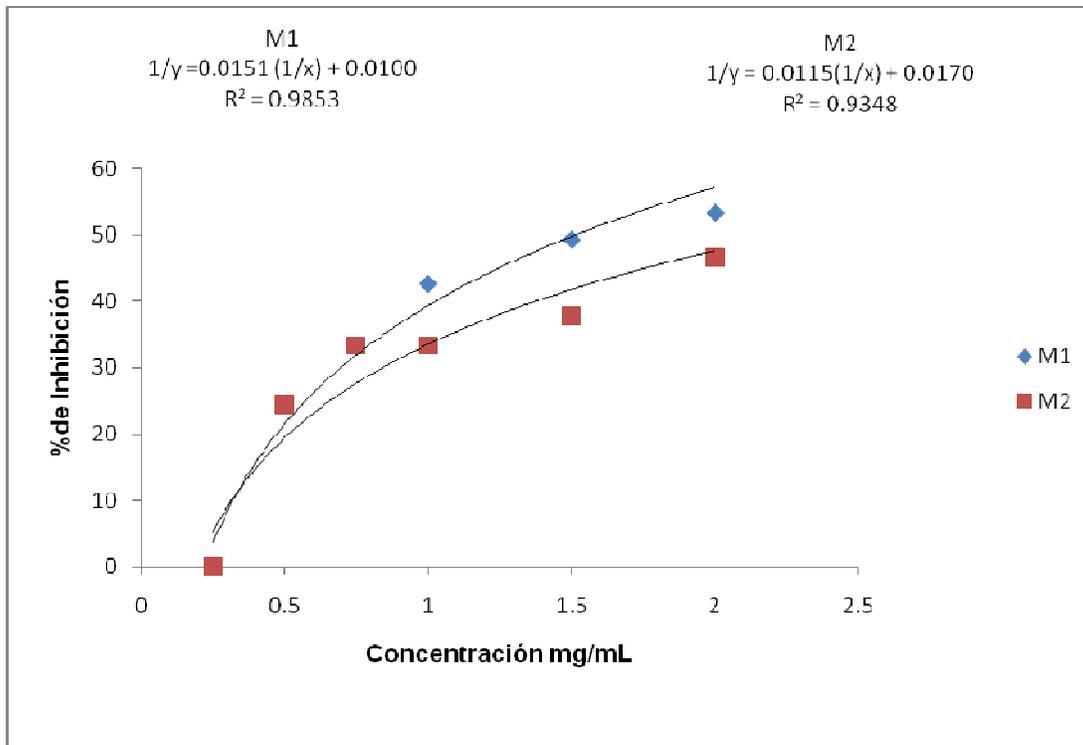


Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *F. sporotrichioides*.

Fusarium moniliforme

La cepa de *F. moniliforme* presentó mayor sensibilidad con el extracto M2 con un 60% de inhibición (Cuadro 7).

El extracto M1 presentó una $CF_{50} = 1.625$ mg/mL y para M2 la CF_{50} fue de 0.818 mg/mL (Fig. 4).

La inhibición de *F. moniliforme* fue más rápida con el extracto M2, aunque la prueba de T indica que no hay diferencias significativas ($T = -.51$ $p > .05$) (Fig.4).

Cuadro 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *F. moniliforme*

Concentración (mg/mL)	M1 % Inhibición	M2
0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.50	33.3 ± 1.00	42.6 ± 0.57
0.75	38.0 ± 1.15	46.6 ± 0.00
1.00	40.0 ± 1.00	53.3 ± 0.57
1.50	49.3 ± 1.52	56.0 ± 0.57
2.00	56.0 ± 1.15	60.0 ± 1.00

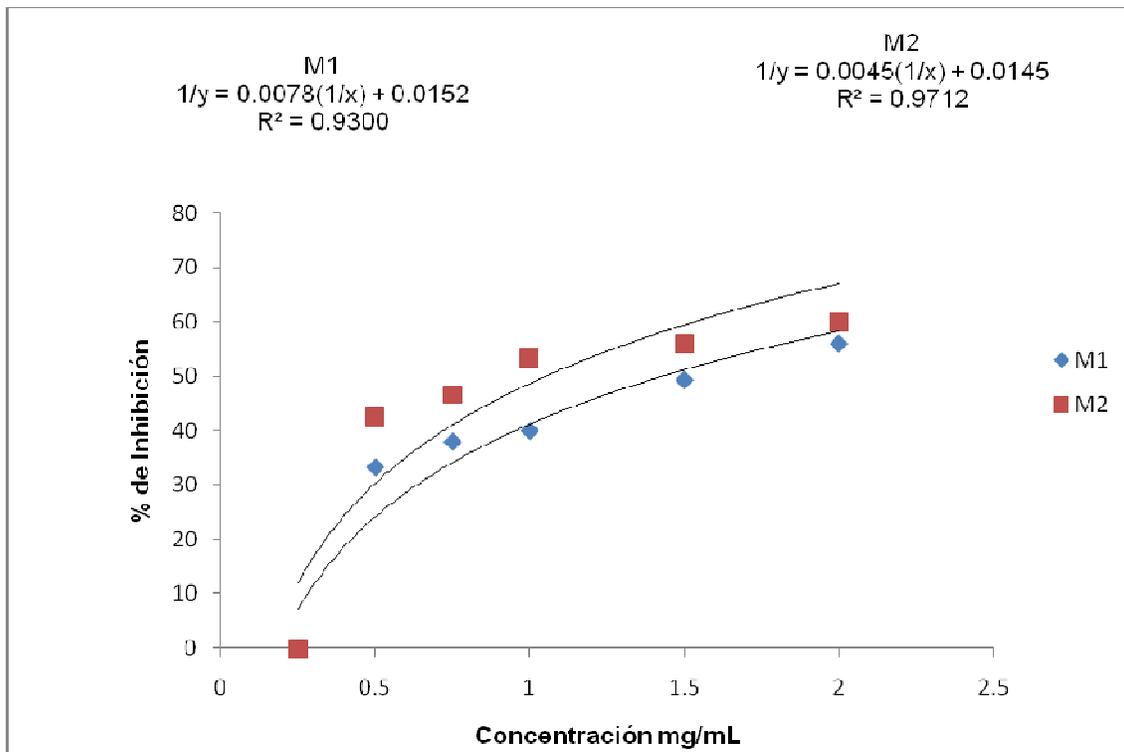


Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *F. moniliforme*.

***Fusarium moniliforme* CDBB-H-265.**

A pesar que el extracto M1 mostró menor porcentaje de inhibición en las concentraciones bajas, al final tuvo el mismo porcentaje en la concentración de 2 mg/mL con un 44.6% (Cuadro 8). La CF_{50} = 2.318 mg/mL para M1 y la CF_{50} = 6.85 mg/mL para M2. Los extractos M1 y M2 no presentaron diferencias significativas en las tasas de inhibición para *F. moniliforme* CDBB-H-265 (T = .63 $p > .05$).

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *F. moniliforme* CDBB-H-265.

Concentración (mg/mL)	M1	M2
	% Inhibición	
0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.50	0.00 ± 0.00	26.6 ± 0.00
0.75	16.0 ± 0.57	31.1 ± 0.57
1.00	18.0 ± 0.57	36.0 ± 0.57
1.50	33.3 ± 0.00	38.0 ± 0.57
2.00	44.6 ± 0.57	44.6 ± 0.57

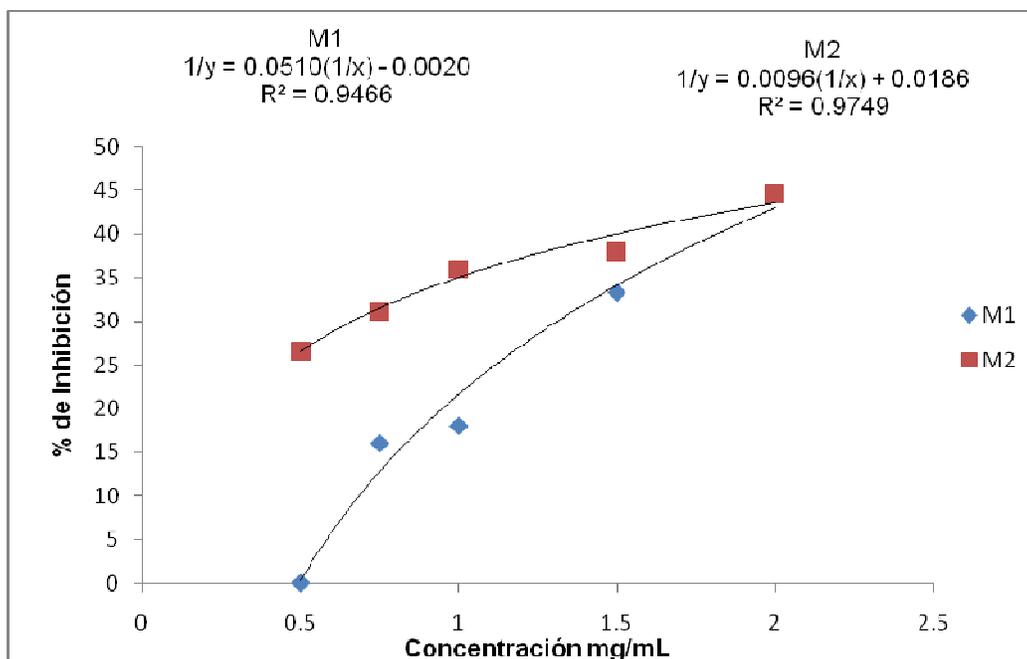


Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *F. moniliforme* C.

Trichophyton mentagrophytes

En el cuadro 9 se observa que para *T. mentagrophytes* el extracto M2 tuvo mayor porcentaje de inhibición en la mayoría de las concentraciones. La CF_{50} = 2.3820 mg/mL para M1 y CF_{50} = 1.2070 mg/mL para M2.

El extracto M2 tuvo una mayor tasa de inhibición (26.46), alcanzando un porcentaje de 60%. Aunque no hay diferencias significativas con respecto a M1 ($T = -.93$ $p > .05$) (Fig.6).

Cuadro 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *T. mentagrophytes*.

Concentración (mg/mL)	M1	M2
0.25	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
0.50	24.4 ± 0.57	36.0 ± 0.57
0.75	33.3 ± 0.00	40.0 ± 0.00
1.00	33.3 ± 0.00	48.8 ± 0.57
1.50	38.0 ± 1.15	49.3 ± 0.57
2.00	56.0 ± 0.57	60.0 ± 0.00

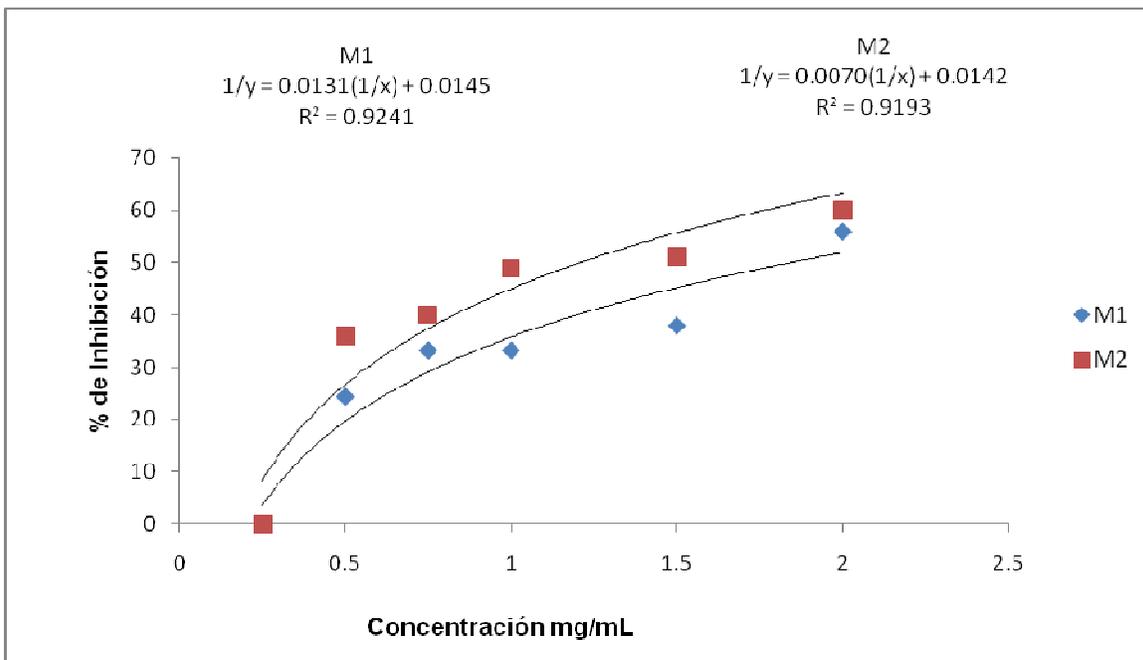


Figura 6. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *T. mentagrophytes*.

***Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112**

Fue la única cepa que tuvo el 100% de inhibición con los dos extractos con una concentración de 4 mg/mL (Cuadro 10).

Para el extracto M1, la CF_{50} = 0.7069 mg/mL, y para M2, la CF_{50} = 0.526 mg/mL.

En la figura 7 se observa que M2 tiene mayor porcentaje de inhibición, pero la prueba de T indicó que no hay diferencias significativas ($T = -.93$ $p > .05$).

Cuadro 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112.

Concentración (mg/mL)	M1	M2
	% Inhibición	
0.25	31.3 ± 0.57	31.3 ± 0.57
0.50	36.0 ± 0.57	46.6 ± 0.00
0.75	44.6 ± 0.57	53.3 ± 1.00
1.00	49.3 ± 0.57	69.3 ± 0.57
1.50	71.3 ± 0.57	86.6 ± 0.00
2.00	78.0 ± 0.57	91.33 ± 0.57
4.00	100 ± 0.00	100 ± 0.00

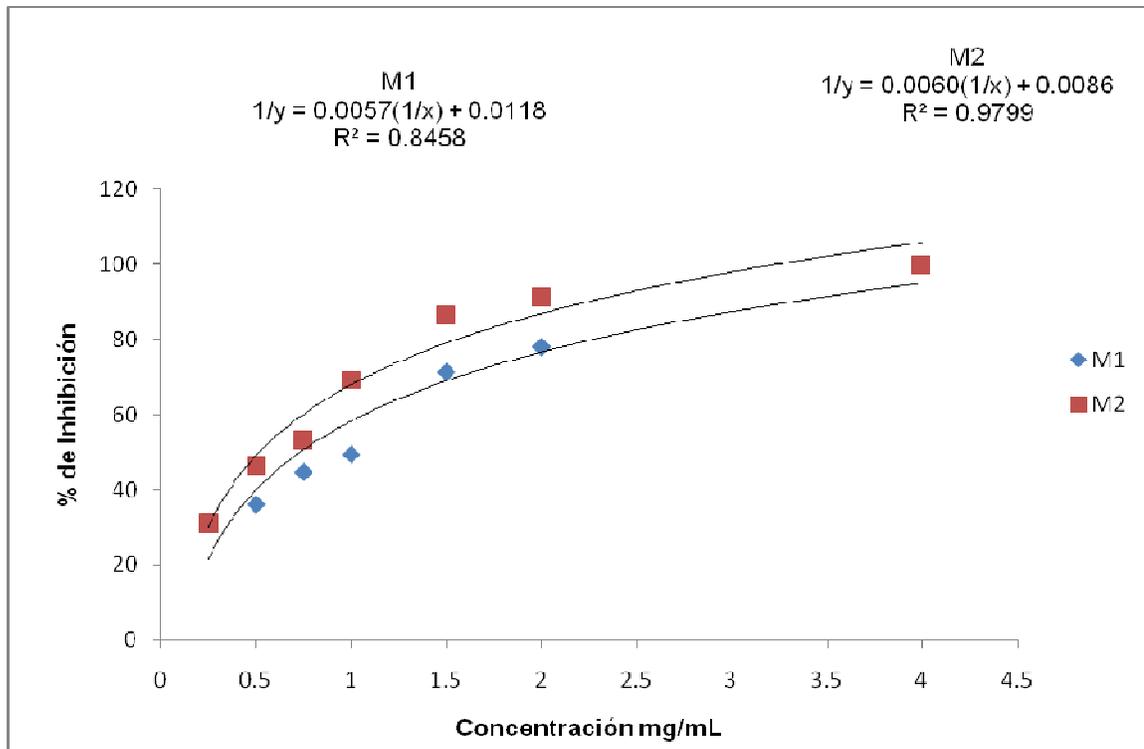


Figura 7. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos M1 y M2 de *J. neopauciflora* sobre *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112

Es importante resaltar que el ensayo se realizó con concentraciones más altas de extracto, (4, 5, 6, 7 y 8 mg/mL), observando que ninguna cepa alcanzó el 100% de inhibición a excepción de *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112, que con una concentración de 4mg/mL, se obtuvo el 100% de inhibición en los dos extractos. En las otras cepas a partir de 2 mg/mL se mantuvo el mismo porcentaje de inhibición, aún aumentando la concentración del extracto.

En cuanto a *Aspergillus sp.*, y *Aspergillus niger*, ninguno de los dos extractos presentó actividad antifúngica, a pesar que también se probaron en concentraciones más altas de 2 mg/mL (4, 5, 6, 7 y 8 mg/mL).

En el cuadro 11 se muestra la CF₅₀ de los extractos M1 y M2, comparados con el ketoconazol (control positivo). La cepa más sensible a los dos extractos fue *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112 con una CF₅₀ = 0.765 mg/mL para M1 y CF₅₀ = 0.526 mg/mL para M2.

Cuadro 11. Evaluación cuantitativa de los hongos.

Cepa fúngica	M1	M2	Ketoconazol
	CF ₅₀	CF ₅₀	CF ₅₀
	mg/mL	mg/mL	µg/mL
<i>R. solani</i>	1.352	1.519	19.677
<i>R. lilacina</i>	0.556	0.462	21.566
<i>F. sporotrichioides</i>	1.510	3.83	3.90
<i>F. moniliforme</i>	1.625	0.818	7.55
<i>F. moniliforme</i> CDBB-H-265.	2.318	6.85	3.473
<i>T. mentagrophytes</i>	2.382	1.207	-
<i>T. mentagrophytes</i> CDBB-H-1112	0.765	0.526	1.166
<i>Aspergillus sp</i>	Sin actividad	Sin actividad	9.757
<i>Aspergillus niger</i>	Sin actividad	Sin actividad	15.297

CF₅₀ = concentración fungicida media.

TOXICIDAD GENERAL

La evaluación de toxicidad general, se realizó con los extractos M1, M2, Hexano y Mh de *J. neopauciflora* sobre la larva nauplio II de *Artemia salina*. En el cuadro 12 se muestran los resultados obtenidos, observando que el mayor porcentaje de muerte en las tres concentraciones se tiene en los extractos M1 y M2.

Cuadro 12. Porcentaje de muerte de *Artemia salina* de los extractos M1, M2, Hexano y Mh de *J. neopauciflora*

CONCENTRACIÓN		% DE MUERTE			
ppm	M 1	M2	HEXANO	Mh	
1000	100	100	97	100	
100	77	87	54	37	
10	37	47	23	30	

En el cuadro 13 se tienen los datos calculados de la toxicidad media para cada uno de los extractos ensayados. Estos datos fueron obtenidos con base a los modelos calculados.

Cuadro 13. Toxicidad media de los diferentes extractos de *J. neopauciflora*

Extracto	CL ₅₀ (ppm)	Toxicidad
M1	17.42	Fuerte
M2	11.286	Fuerte
Hexánico	41.66	Fuerte
Mh	289.61	Moderada

Toxicidad según el criterio de Niño et al. (2006).

Control positivo: Ácido gálico (CL₅₀= 321.5 ppm).

El extracto M1 obtuvo una CL₅₀ de 17.42 ppm, mostrando que el extracto tiene una toxicidad fuerte según el método modificado de Niño et. al., 2006 (Fig. 8).

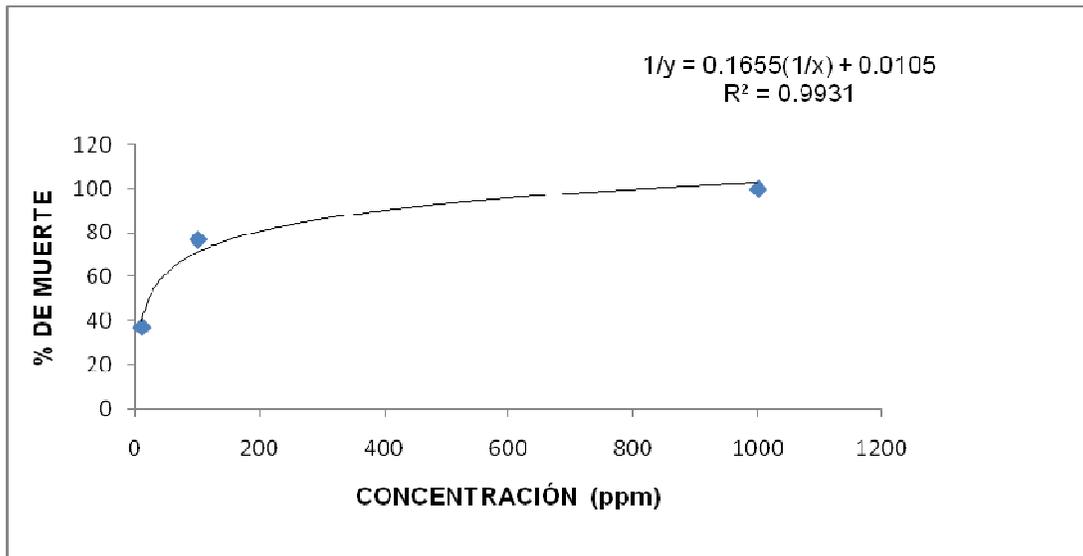


Figura 8. Porcentaje de muerte de *Artemia salina* con el extracto M1 de *J. neopauciflora*

El extracto M2 tuvo un mayor porcentaje de muerte en las tres concentraciones en comparación con todos los extractos, y su CL₅₀ de 11.286 ppm, muestra que el extracto es de toxicidad fuerte (Fig. 9).

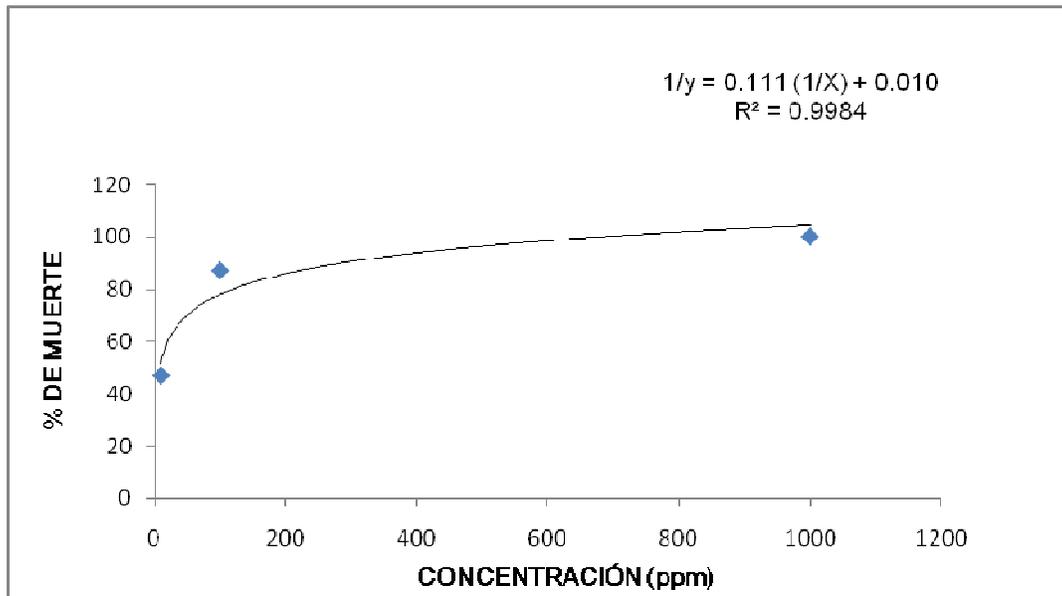


Figura 9. Porcentaje de muerte de *Artemia salina* con el extracto M2 de *J. neopauciflora*.

La CL₅₀ del extracto hexánico es de 41.66 ppm. mostrando que este extracto es de toxicidad fuerte (Fig. 10).

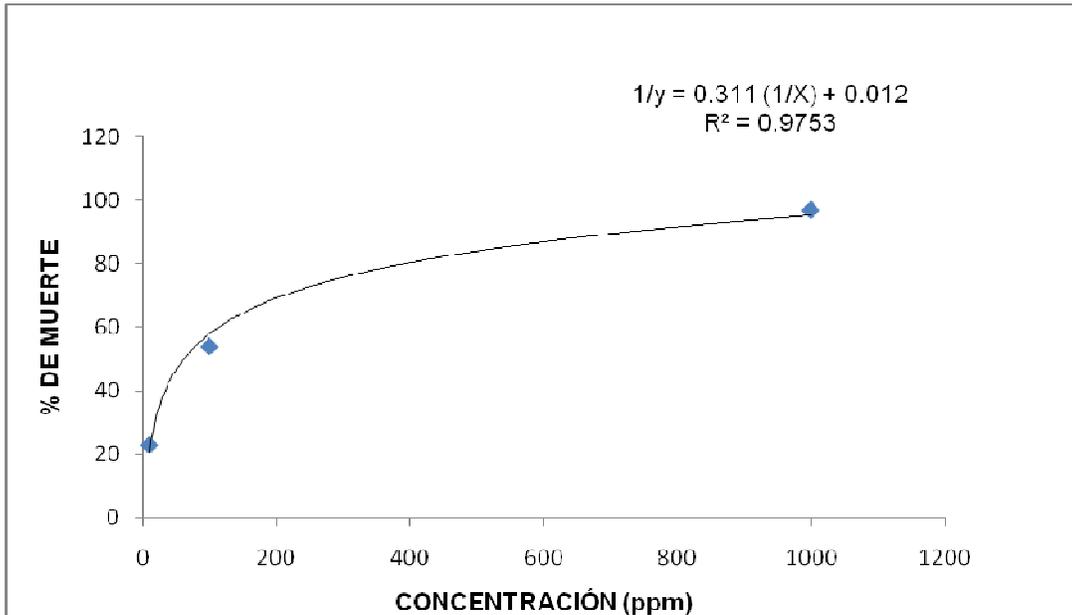


Figura 10. Porcentaje de muerte de *Artemia salina* con el extracto Hexánico de *J. neopauciflora*

Para la hoja de *J. neopauciflora* la toxicidad que presenta es moderada, la CL₅₀ fue de 289.61 ppm. (Fig. 11).

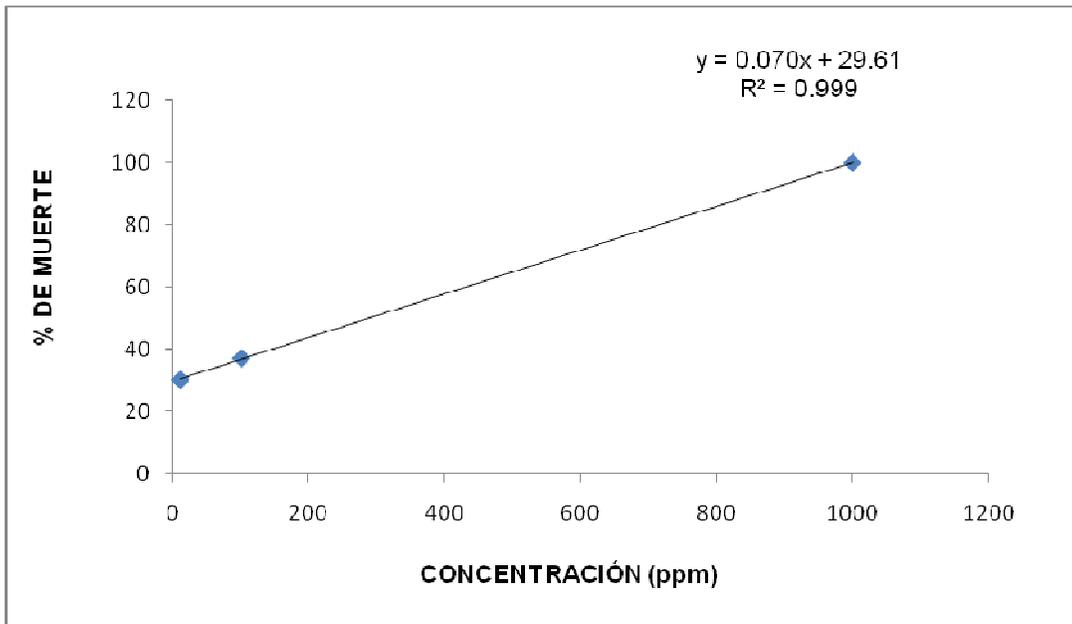


Figura 11. Porcentaje de muerte de *Artemia salina* con el extracto Mh de *J. neopauciflora*

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo con los extractos M1, M2 y Mh de *J. neopauciflora* (Cuadro 14). Los valores de la CA₅₀ fueron obtenidos con base a los modelos calculados con los datos graficados en la figura 12.

Cuadro 14. Actividad antioxidante media de los diferentes extractos de *J. neopauciflora*.

Extracto	CA ₅₀ (mg/mL).
M1	105
M2	108.8
Mh	31.42

Control positivo: Catequina (CA₅₀=2.83 mg/mL).

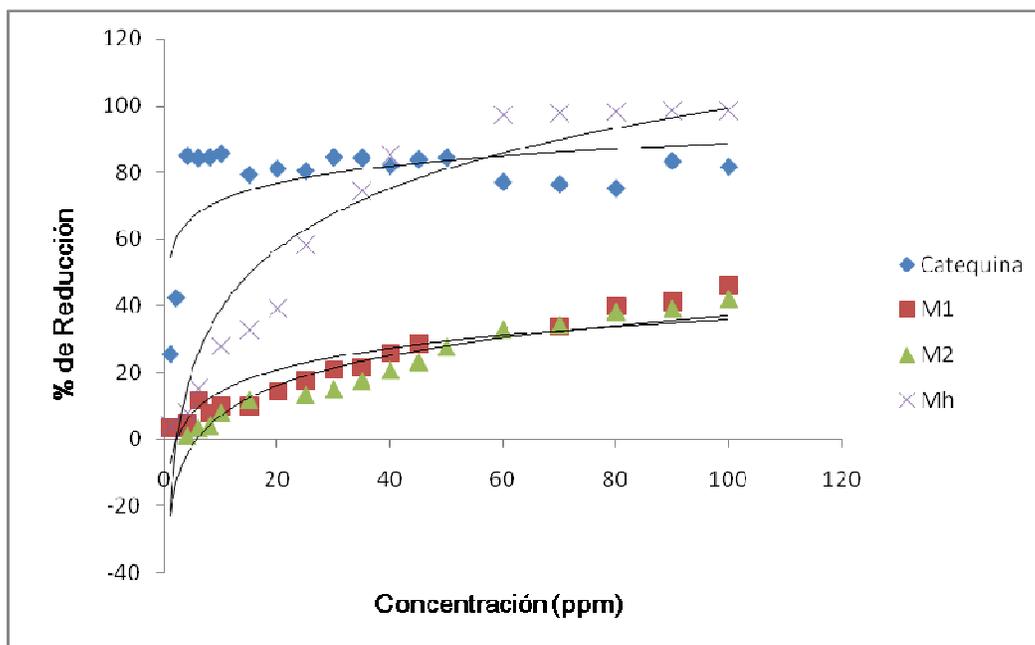


Fig.12. Porcentaje de reducción de los extractos de *J. neopauciflora* comparados con el control positivo (catequina).

El extracto Mh fue el que presentó mejor actividad antioxidante en comparación con M1 y M2 ya que presentó una CA₅₀ de 31.42 ppm.

FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO

De la cromatografía en columna abierta del extracto M2, se obtuvieron 48 fracciones de las cuales 32 mostraron actividad antifúngica sobre *T. mentagrophytes*. En el cuadro 12 se muestra el rendimiento y la actividad en cada fracción.

Cuadro 15. Rendimiento del extracto M2 y actividad antifúngica sobre *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112.

Fase móvil	Fracción	Rendimiento (gr).	Actividad
H	1	2.3311	√
	2	0.3944	√
H9: AcOEt 1	3	0.3540	√
H8: AcOEt 2	4	0.0984	√
	5	0.1924	√
	6	0.0683	√
H7: AcOEt 3	7	0.1358	√
	8	0.3699	√
	9	0.0298	√
H7:AcOEt 3	10	0.0736	√
	11	0.3507	√
	12	0.0230	×
	13	0.0651	√
	14	0.1249	√
	15	0.1334	√

	16	0.2687	√
H6:AcOEt	17	0.1104	×
H5:AcOEt	18	0.1262	√
H4:AcOEt	19	0.1327	√
	20	0.1606	×
	21	0.0521	√
H3: AcOEt	22	0.328	×
H2: AcOEt	23	0.3465	√
	24	0.4194	×
	25	0.2297	×
	26	0.1323	×
H1:AcOEt	27	0.0479	×
	28	0.0463	×
	29	0.2111	×
	30	0.0556	√
AcOEt	31	0.1236	√
AcOEt9:MeOH	32	0.2372	√
	33	0.5823	×
	34	0.4217	√
	35	0.418	√
	36	0.2984	√

	37	0.2461	√
	38	0.0177	√
AcOEt 8:MeOH 2	39	0.1971	√
	40	0.3026	√
	41	0.7459	√
AcOEt 7:MeOH 3	42	0.0186	√
	43	0.2148	×
	44	0.1808	×
AcOEt 6:MeOH 4	45	0.1728	×
AcOEt 5:MeOH 5	46	0.0926	×
MeOH	47	1.1605	√
	48	3.2775	×

Actividad = √ Sin actividad = ×

H: hexano, AcOEt: acetato de etilo, MeOH: metanol.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

La fracción 41 al presentar uno de los mayores rendimientos, mayor actividad en las pruebas cualitativas sobre *T. mentagrophytes*, y la formación de cristales, fue sometida a una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, mostrando que esta fracción contiene β -sitosterol, lupeol y arabinol (Fig. 13).

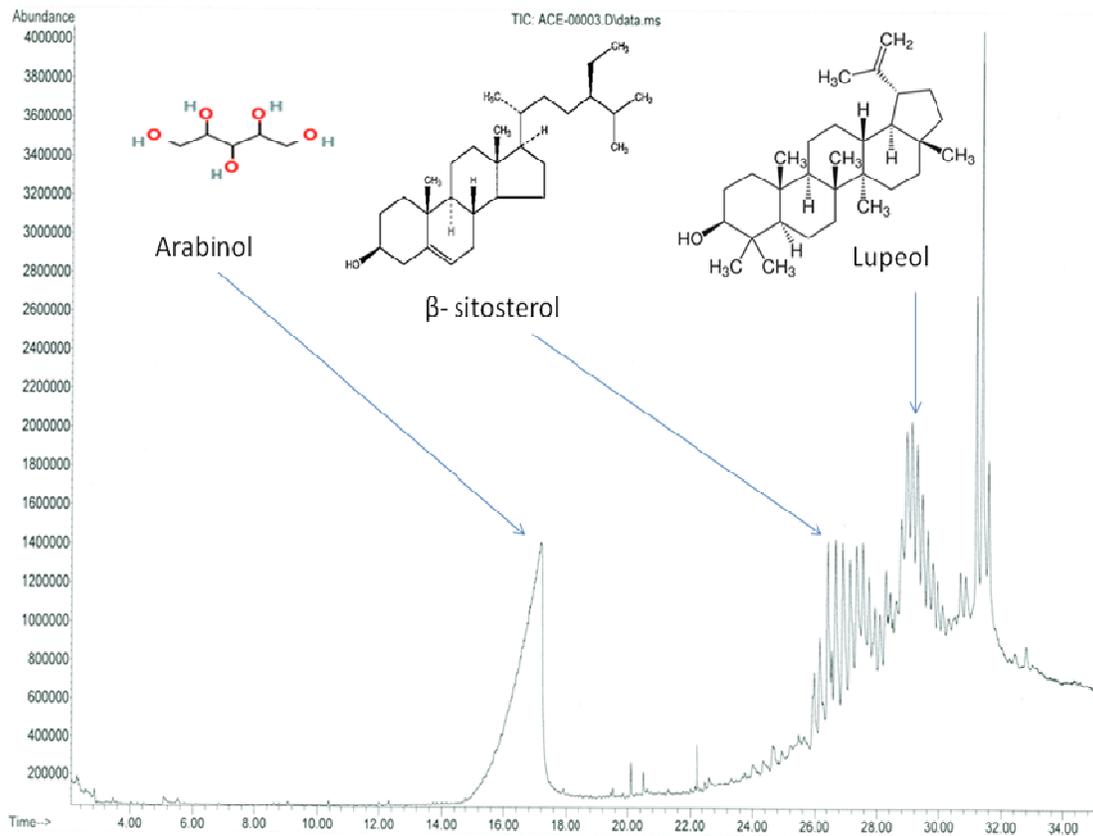


Fig. 13. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de la fracción 41 de *J. neopauciflora*.

DISCUSIÓN.

En las últimas décadas se ha observado no sólo un notable aumento de las infecciones causadas por hongos en todo el mundo sino un incremento de la resistencia farmacológica que han mostrado varias especies de hongos a los diferentes antimicóticos que se utilizan en la práctica médica. Esta situación ha llevado a la búsqueda de nuevos antifúngicos de origen natural. En las plantas, se han identificado una serie de moléculas con actividad contra diferentes géneros y especies de hongos de importancia clínica para los humanos, convirtiéndose en una alternativa para el desarrollo y la formulación de nuevos fármacos antimicóticos con menores efectos secundarios, mayor espectro de acción y menor costo que los disponibles actualmente para el tratamiento de las infecciones por hongos (Mesa, et al., 2004).

El látex e infusiones de la parte aérea de *Jatropha neopauciflora* es utilizada en San Rafael Coxcatlán, Puebla para el tratamiento de heridas e infecciones bucales, cuando existen piezas dentales flojas y contra el pie de atleta y el mal olor que este produce (Canales et al., 2006; Arias et al., 2001). Además, el género *Jatropha* ha sido reportado por tener actividad antibacteriana, anticancerígena, e insecticida por varios autores como Canales et al. (2005b), Mothana et al. (2005), Hamza et al. (2006). Es importante resaltar que el tipo de vegetación en donde se registran más especies de *Jatropha* en Puebla es el bosque tropical caducifolio seguido por el matorral xerófilo, estos tipos de vegetación tienen un gran porcentaje de especies de éste género que son endémicas en México (Rodríguez, et al., 2009). Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la especie *J. neopauciflora* inhibe el crecimiento de hongos mostrando una toxicidad general fuerte y actividad antioxidante.

Por los rendimientos obtenidos, se observa que esta planta tiene en su mayoría compuestos de naturaleza polar, ya que el rendimiento del extracto hexánico fue menor en comparación con M1 y M2 (Cuadro 2). Aunado a lo anterior, se ha reportado que esta especie presenta una gran cantidad de látex en sus tallos y los compuestos presentes en éste en su mayoría también son de naturaleza polar. El látex fue sometido a extracción con hexanos y el rendimiento de este extracto fue muy pobre (Canales, 2005b).

En cuanto a la actividad antifúngica, los extractos M1 y M2 mostraron actividad en todas las cepas ensayadas a excepción de *Aspergillus sp.* y *Aspergillus niger*, esto se debe al desarrollo de mecanismos de resistencia a los antimicóticos por estas dos cepas, explicadas en parte porque la mayoría de los fármacos son fungistáticos y por la administración prolongada de los tratamientos en el tiempo, que permite la selección de clones resistentes. Entre los mecanismos de resistencia utilizados por los hongos es importante hacer referencia a la sobreproducción de blancos enzimáticos, la implementación de vías metabólicas alternas y la producción de bombas de flujo externo que expulsan los medicamentos al espacio extracelular (Loeffler y Stevens, 2003). El extracto hexánico no presentó actividad en ninguna cepa ensayada, esto se debe a que los compuestos activos responsables de la actividad antifúngica son de naturaleza polar. Sin embargo, a pesar de que el extracto Mh es de naturaleza polar (metanólico) tampoco mostró actividad antifúngica, lo cual indica que la actividad se localiza principalmente en el extracto metanólico del tallo.

Los extractos M1 y M2 mostraron un comportamiento similar en todas las cepas ensayadas (Cuadro 11), no hubo diferencias significativas entre los extractos.

La cepa más sensible a los extractos fue *T. mentagrophytes*, un hongo dermatofito, con una $CF_{50} = 0.70$ mg/mL para M1 y $CF_{50} = 0.52$ mg/mL para M2 y fue la única cepa que alcanzó el 100% de inhibición con una CFM de 4 mg/mL (Cuadros 10 y 11; Figura 7), estos resultados concuerdan con la información etnobotánica, ya que se reporta que esta planta se utiliza para el tratamiento contra el pie de atleta, y el hongo responsable de esta infección es *T. mentagrophytes* (Arias et al., 2001),

Es importante mencionar que los extractos tienen una concentración elevada en comparación con el control positivo, esto se debe a que el ketoconazol es un compuesto puro y que los extractos son una mezcla de compuestos, y que tal vez el o los principios activos responsables de la actividad pueden estar en concentraciones muy pequeñas. También se esperaría que los extractos tengan el mismo mecanismo de acción que el ketoconazol, que siendo del grupo de los azoles actúa a nivel de la membrana citoplasmática inhibiendo la

enzima citocromo P-450 que interviene en la síntesis del ergosterol, que es el mayor esterol de la membrana celular del hongo (Escobar y Zuluaga, 2004).

Otras plantas de la familia Euphorbiaceae también han sido estudiadas para probar su actividad antifúngica, como es el caso de *Croton urucurana* (Gurgel et al., 2005), que fue probada en cinco hongos dermatofitos: *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum canis* y *Epidermophyton floccosum*, utilizando el método de difusión en agar, los resultados fueron positivos con una CF_{50} de 1.25-2.5 mg/mL. *Phyllanthus amarus* es otra Euphorbiaceae que fue probada sobre un hongo dermatofito (*Microsporum gypseum*), el extracto clorofórmico de la parte aérea de ésta planta presentó una actividad significativa inhibitoria contra este hongo dermatofito (Abad, et al., 2007). Estos estudios respaldan los resultados obtenidos en este trabajo, pues las dos especies mencionadas tuvieron actividad antifúngica sobre hongos dermatofitos al igual que *J. neopauciflora* sobre *T. mentagrophytes*.

Para la evaluación de la toxicidad general de *J. neopauciflora* se llevó a cabo el ensayo de letalidad de *Artemia salina*, el cual se basa en la posibilidad de causar la muerte de larvas de este crustáceo cultivadas en el laboratorio, siendo esta una herramienta útil y sencilla para la determinación preliminar de toxicidad de extractos de plantas. Este método determina el valor de la concentración letal media (CL_{50}) del extracto en medio salino (Fernández-Calienes et al., 2009).

El único extracto que presentó una toxicidad moderada fue Mh con una CL_{50} de 290 ppm, mientras que los otros tres extractos presentaron una actividad fuerte (CL_{50} de 17.42 ppm para M1, CL_{50} de 11.28 ppm para M2, y una CL_{50} de 41.66 ppm para el extracto hexánico) (Cuadro 12), posiblemente sea porque el tallo de la planta está más expuesto a depredadores y por tal motivo la planta debe crear mecanismos de defensa. Además los extractos que tuvieron actividad antifúngica (M1 y M2) presentaron una toxicidad fuerte, este dato es importante, ya que si el tallo de la planta se utilizara para aliviar infecciones por hongos, es necesario dosificar su uso para que no existan reacciones secundarias dañinas en el ser humano.

Cabe mencionar que el 100% de muerte en los extractos de toxicidad fuerte se obtuvo con 1000 ppm, estos resultados se asemejan a las pruebas de toxicidad

que se realizaron con el tallo *Euphorbia kamerunica*, utilizando cinco extractos diferentes (hexánico, éter dietílico, acetato de etilo, metanol y acuoso) mostrando que los extractos de ésta, son altamente tóxicos a la concentración mencionada (Ogunnusi, 2008). En este mismo trabajo también se menciona que el extracto hexánico de *E. kamerunica* a 10 ppm tuvo un 90% de mortalidad, mientras que *J. neopauciflora* con el mismo extracto y concentración solo tuvo el 23% de mortalidad.

Karmegan y colaboradores (1997), realizaron estudios de toxicidad con el extracto de las hojas frescas de *Jatropha curcas* utilizando un solvente de polaridad baja (éter de petróleo), obteniendo altos porcentajes de mortalidad a altas concentraciones del extracto.

Los datos anteriores muestran que la toxicidad en la familia Euphorbiaceae es fuerte, aunque el grado de toxicidad puede variar dependiendo la parte de la planta que se utilice y del solvente para la obtención del extracto.

Por otro lado se sabe que en un proceso infeccioso, el sistema inmunitario responde mediante diversas reacciones de defensa generando radicales libres que son sustancias oxidantes que inhiben el crecimiento de los microorganismos causantes de la enfermedad. Estos compuestos oxidantes, que son radicales libres (como el peróxido de hidrógeno,) también afectan a las células del humano, por lo cual se consideró pertinente evaluar la actividad antioxidante de esta especie.

Los radicales libres son protagonistas de numerosas enfermedades que provocan reacciones en cadena, estas reacciones solo son eliminadas por la acción de otras moléculas en estos procesos tóxicos en el organismo, los llamados sistemas antioxidantes defensivos. Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas (Céspedes y Sánchez 2000).

El estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, es por ello que el uso de antioxidantes en farmacología es estudiado de forma intensiva, actualmente existen diversos métodos para determinar la actividad antioxidante, los cuales se basan en su capacidad para captar radicales libres. Entre ellos se encuentra el uso del 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH•), el cual consiste en un radical con un electrón desapareado y es de

color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm. Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH• (Ramos et al., 2008).

La actividad antioxidante de M1 mostró el valor de CA₅₀ de 105 ppm., para M2 la CA₅₀ fue de 109 ppm y por último para el extracto Mh la CA₅₀ fue de 31.42 ppm. (Cuadro 13, Figura 12). Los resultados muestran que el extracto Mh que es de polaridad alta, tiene una mejor actividad antioxidante ya que necesita menor cantidad de extracto para reducir el DPPH•, este resultado coincide con un estudio cualitativo sobre *Jatropha gaueri*, ya que el extracto metanólico de las hojas mostró una actividad antioxidante significativa y la presencia de β-sitosterol (Can-Ake, et al., 2004).

Como el extracto M2 fue el que tuvo la mejor actividad antifúngica, se realizó una cromatografía en columna con 25 g. de este extracto. Esta técnica se emplea para separar los componentes individuales de una mezcla y, en ciertos casos, para identificar un compuesto comparando su comportamiento cromatográfico con el de sustancias conocidas empleadas como patrón (Gutierrez y Droguet, 2002).

De esta cromatografía se obtuvieron 51 fracciones, de las cuales 43 fracciones mostraron actividad, las cuales van de una polaridad baja a la más alta. Estos resultados muestran que el o los compuestos responsables se encuentran distribuidos desde la polaridad más baja (hexano) hasta la polaridad más alta (metanol) (García y Delgado, 2006).

Por su rendimiento y actividad en las pruebas cualitativas sobre *T. mentagrophytes*, la fracción 41 fue sometida a una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Entre los compuestos que se obtuvieron de esta cromatografía se encuentra el β-sitosterol, el cual es un compuesto químico que pertenece al grupo de los fitosteroles. Gubitzy y colaboradores (1999), reportaron la presencia de β-sitosterol en tallo, hoja, raíz y semilla de *J. curcas*. En el extracto metanólico de las hojas de *Jatropha gaueri* también se reportó la presencia de este compuesto (Can-Ake, et al., 2004). Por todo lo anterior, es de suponerse que el

β -sitosterol se encuentra presente en el género *Jatropha*, y está distribuido en todas las partes de esta planta.

El lupeol fue otro compuesto que se obtuvo de esta cromatografía, este terpeno posee una amplia gama de propiedades medicinales como son: potente antioxidante, anti- mutagénico y por tener efectos anti- inflamatorios y anti- artríticos (Rodríguez-Gamboa, et. al., 2001).

Adebowale y colaboradores (2006), al realizar un estudio sobre la composición química de *J. curcas*, observaron la presencia de lupeol en las semillas de esta planta.

El género *Colliguaja*, de la familia Euphorbiaceae también presenta entre otros, la presencia de este terpeno (Bittner et al., 2001). Por esta información, podría suponerse que el lupeol se encuentra distribuido en la familia Euphorbiaceae, y que por las referencias revisadas, este terpeno probablemente podría ser uno de los responsables de la actividad antioxidante.

Finalmente, arabinitol fue otro compuesto presente en esta cromatografía, el cual se ha reportado que participa en mantener el equilibrio osmótico en los vegetales (Bittner et al., 2001). Lo antes mencionado es razonable de considerar para *J. neopauciflora*, ya que habita en zonas donde el clima es árido con lluvias en verano (García, 1981).

CONCLUSIONES

- Los extractos M1 y M2 presentaron actividad antifúngica sobre siete cepas de hongos filamentosos.
- El extracto Mh fue el único que presentó una toxicidad moderada, a diferencia de los demás extractos que presentaron una toxicidad alta.
- De los tres extractos evaluados, el que presentó una mejor actividad antioxidante fue el extracto Mh.
- El extracto M2 presentó β -sitosterol, lupeol y arabinol.

PERSPECTIVAS

- Continuar con el estudio fitoquímico con la finalidad de aislar y elucidar la estructura química de los compuestos responsables de las actividades biológicas evaluadas.
- Realizar investigaciones sobre la actividad anticancerígena de esta especie.
- Determinar si *J. neopauciflora* sintetiza en mayor concentración los metabolitos secundarios activos, bajo condiciones de estrés.

APÉNDICE 1

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA PLANTA ESTUDIADA.

FAMILIA:

Euphorbiaceae

NOMBRE CIENTÍFICO:

Jatropha neopauciflora Pax.

NOMBRE COMÚN:

"Sangre de grado"



Jatropha neopauciflora pertenece a la familia Euphorbiaceae, que es una de las más grandes con más de 200 géneros y 7000 especies. Su floración es durante el periodo de sequía, en el que la planta pierde sus hojas y sólo se observan sus flores de color rojo. Es un arbusto de porte robusto que alcanza alturas hasta de 2 metros (Arias et al., 2001). La mayoría de las plantas de la familia se distinguen por la combinación de savia lechosa (látex) y el fruto de 3-celdas. En muchas especies el látex es venenoso o al menos altamente irritante y las semillas también poseen propiedades purgativas, o en gran cantidad son venenosas (Standley y Steyermark, 1949). Dentro de esta familia algunos miembros contienen antraquinonas, triterpenoides, epoxiácidos grasos y ácidos grasos insaturados. Los alcaloides cuando están presentes suelen ser del tipo aporfina, piridina, indol, quinoleína o tropano (Trease y Evans, 1993). El género *Jatropha* está formado por hierbas, arbustos y árboles, cuenta con alrededor de 115 especies distribuidas en las regiones tropicales de ambos hemisferios (Standley y Steyermark, 1949). *J. neopauciflora* es utilizada en San Rafael Coxcatlán, Puebla para aliviar los "granitos que salen dentro de la boca a los niños, las postemillas, una muela que duele a causa de caries, se usa también en casos de fuegos en los labios (herpes simple), también se aplica sobre las heridas, y en la elaboración de jabones para problemas de caída de pelo (Arias, et al. 2001 y Canales 2005a, 2006). Lo que utiliza la gente de San Rafael Coxcatlán, Puebla para aliviar todas las enfermedades antes mencionadas es el látex que es de color rojo, que obtienen haciendo una herida al tallo de la planta de donde inmediatamente empieza a salir, lo toman con un dedo y lo untan en la región afectada.

APÉNDICE 2. SÍNTESIS BIBLIOGRÁFICA DEL GÉNERO *Jatropha*.

Compuestos aislados de diferentes especies de *Jatropha*.

Especie	Compuesto	Parte usada	Actividad	Lugar de colecta	Autor
<i>J. curcas</i>	5-hidroxi-pirrolidin-2-ona pirimidina -2,4 diona	Extracto de hojas AcOEt	Anti-inflamatorio (edema en rata)	Managua, Nicaragua	Staubmann, et al., 1999b.
<i>J. curcas</i>	Flavonoide: apigenina y su glicósido vitexina e isovitexina. Los esteroides: estigmasterol, β -D-sitosterol y su β -D-glicósido.	Hojas	No reportada	No reportado	Chhabra, 1990.
<i>J. curcas</i>	Curcaciclina (octapéptido cíclico).	A Látex	Inhibición moderada de la proliferación de células T.	Jepara, Indonesia	Van den Berg et al., 1995.
<i>J. curcas</i>	Curcaciclina (nonapéptido cíclico)	B Látex	Actividad rotamasa de la ciclofilina	No reportado	Auvin et al., 1997.
<i>J. curcas</i>	Heudolotinone (dinoditerpeno).	Extracto de la parte aérea .	No reportada	Dhanasri, Andhra Pradesh, India	Ravindranath et al., 2003.
<i>J. curcas</i>	Esteresas JEA y JEB Lipasa JL.	Semillas	Hidroliza triglicéridos de cadena corta y larga.	Managua, Nicaragua.	Staubmann et al., 1999a.
<i>J. curcas</i>		Látex	Cicatrizante	Lima, Perú	Villegas et al., 1997.
<i>J. curcas</i> y <i>J. gossypifolia</i>		Extracto de hoja con AcOEt.	Antibacteriano	Trinidad y Tobago	Chariandy et al., 1999.
<i>J. curcas</i>	Triterpenos cíclicos: estigmasterol, estigmast-5-en-3 β , 7 β - diol, colest-5-en-3 β ,7 diol, campesterol, β - sitosterol, 7-keto- β - sitosterol.	Hojas y retoños	No reportada	India	Gubitz et al., 1999.

<i>J. curcas</i>	B-sitosterol y su β -D-glucósido, mamesina, propacina, los curculatiranoa Ay B y los curcusones A-D; además los diterpenoides jatrolol y jatrololone A y B, la cumarina tomentina, el cumarin- lignano jatrolin y taraxerol.	Raíz	No reportada	India	Gubitz et al., 1999.
<i>J. curcus</i>		Extracto metanólico de raíz	Inhibe la diarrea inducida con aceite de castor.	India	Mujumdar et al., 2000
<i>J. curcus</i>		Extracto de hojas con éter de petróleo	Larvicida sobre el mosquito <i>Culex quinquefasciatus</i>	India	Karmegam et al., 1997.
<i>J. dioica</i> Cerv. <i>J. spathulata</i> (Ortega) Muell.		Extracto acuoso de raíz	Antibiótico sobre <i>S. aureus</i>	No reportado	García, 1984; Reiche, 1912; Dominguez, 1980 citados en Argueta, 1994.
<i>J. dioica</i>	Diterpenos: citlaltiriona, jatrololone, riolosatriona. Esterol: β - sitosterol	Raíz	No reportada	No reportado	Dominguez, 1980; Martínez, 1946; Villarreal, 1988 citados en Argueta, 1994.
<i>J. dioica</i>	Taninos	Látex	No reportada	No reportado	Dominguez, et al., 1980; citados en Argueta y Cano, 1994.

<i>J. glandulifera</i>			Extracto acuoso de la parte aérea	Antibacteriano contra <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumonia</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. paratyphi</i> , <i>S. typhi</i> y <i>B. subtilis</i>	Maruthamalai Hills of Western Ghats.	Srinivasan et al., 2001
<i>J. glauca</i>			Extracto clorofórmico de la parte aérea	Moluscicida contra el caracol <i>Biomphalaria pfeifferi</i> .	Arabia Saudita	Al-Zanbagi et al., 2000
<i>J. glauca</i>			Extracto metanólico	Moluscicida contra el caracol <i>Biomphalaria pfeifferi</i> .	Arabia Saudita	Al-Zanbagi et al., 2001
<i>J. gossypifolia</i>	Propacina (cumarin-lignoide).		Extracto de la parte aérea	No reportada	India	Das y Venkataiah, 2001.
<i>J. gossypifolia</i>	Citralitrión (diterpeno)		Extracto de toda la planta	No reportada	India	Das y Anjani, 1999.
<i>J. gossypifolia</i>	Gossipideno (lignano)		Extracto hexánico de tallo	No reportada	Oeste de Bengala, India	Das y Venkataiah, 1999.
<i>J. gossypifolia</i>	Ari-naftaleno (lignano)		Raíz, tallo y semillas		Oeste de Bengala, India	Das y Banerji, 1988.
<i>J. grossidentata</i>	Diterpenos, lignano, cumarino-lignano		Raíz	No reportada	Paraguay	Schmeda-Hirschmann et al., 1992.
<i>J. isabelli</i>			Extracto de la parte aérea con diclorometano	Larvicida contra larvas del mosquito <i>Aedes aegypti</i>	Argentina, Brasil y Perú	Ciccia et al., 2000
<i>J. mahafalensis</i>	Mahafaciclina (heptapéptido cíclico)	A	Látex	Moderada actividad antimalaria	Madagascar	Baraguey et al., 2000.
<i>J. multifida</i>	Multifidin (cianoglucósido)		Látex		Indonesia	Van den Berg et al., 1995a.

<i>J. polaina ssp. molissima</i>	Polianina A, B Y C	Látex	Moderada actividad antimalaria	Recife, Brasil	Auvin-Guette et al., 1999.
<i>J. unicostata</i>	Fitosteroles: esterol no identificado, campesterol, estigmasterol, sitosterol, estigmastanol. 3- oxo-esteroides: campest- 4-en- 3- ona, estigmastat- 4- 22- dieno- 3- ona. Dioxoesteroides: campest 4- 22- dieno- 3,6- diona, estigmastat- 4- en-3,6- diona. Fraxetin (cumarina), luteolin.	Parte aérea	No reportada	Dixam, Socorra Island, Yemen.	Franke et al., 2004.
<i>J. weddelliana</i>	Ácido 3- acetilaleurítico, sitosterol y jatrowedione (diterpeno).	Extracto hexánico de raíz	No reportada	Corumbá, Brasil.	Brum et al., 1998.

APÉNDICE 3.

ZONA DE COLECTA

La especie *Jatropha neopauciflora* 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 1).

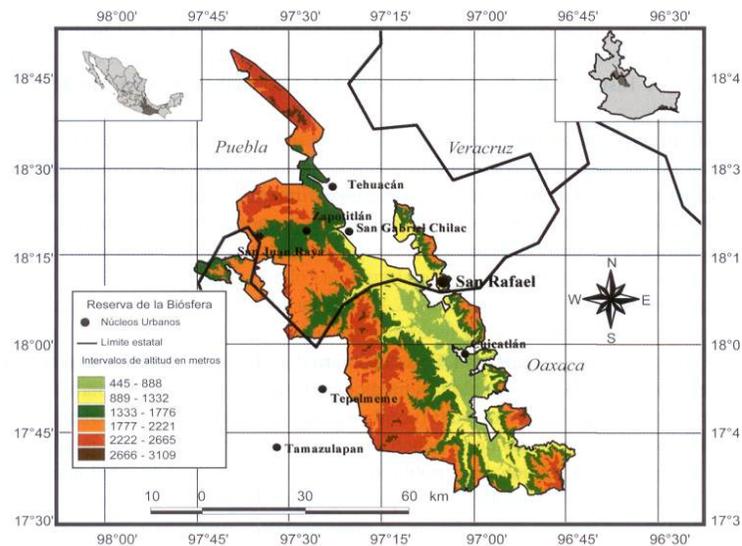


Figura 1: Ubicación geográfica del poblado de San Rafael

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).

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.

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

Fouquieria 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 fruticosa*. Localizada en el nivel más alto, de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal. La densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fruticosa*.

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 4

TÉCNICA DE MACERACIÓN

Se tomó la parte aérea seca 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 5:

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR O DE KIRBY-BAUER.

(Vanden Berghe y Vlietinck, 1991).

Este método se utilizó para evaluar cualitativamente la actividad antifúngica de los preparados herbales y las fracciones producto de las separaciones cromatográficas, la metodología fue la siguiente:

Medio:

Para los ensayos con las cepas fúngicas se utilizó como medio de cultivo el 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 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.

Aplicación de sustancias:

Se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel whatman del N° 5 (los sensidiscos se utilizaron 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 que se evaluaron, se colocaron manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril.

Preparación de las muestras:

Para el bioensayo el vehículo fue metanol y hexanos. En cuanto a la evaluación de las fracciones los sensidiscos se impregnaron con las soluciones valoradas de la muestra hasta llegar a la concentración deseada de sustancia (2 mg/mL) por disco; en este caso se utilizó metanol para solubilizar los compuestos, posteriormente se impregnaron los discos dejando evaporar el solvente durante 12 horas.

Controles negativos:

Para los bioensayos preliminares se utilizaron sensidiscos con 10 μ L de metanol o de hexanos, dejándolos evaporar durante 12 hrs. al igual que los experimentales.

Control positivo:

Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales en sensidiscos con Ketoconazol (7 μ g/mL).

Incubación:

Las levaduras son cultivadas en una caja Petri con 20 mL de agar PDA, se colocaron en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35°C, sin mayor tensión CO₂.

APÉNDICE 6

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL (Wang y Bun, 2002).

Método Cualitativo

El ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo en cajas Petri (100 X 15 mm) con 20 mL de agar de papa dextrosa, en el cual se inoculó un botón de 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Después que el micelio se desarrolló, se colocaron discos previamente impregnados con el compuesto activo, la preparación de los discos fue igual a la técnica de difusión en agar. Los discos se colocaron a una distancia de 30 mm del límite micelial.

Incubación.

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

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

Si existieron zonas de inhibición, se reportó el extracto como activo, en todos los casos la prueba se realizó por triplicado.

Método Cuantitativo.

El ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo en cajas de cultivo de 24 pozos, cada pozo contenía 1.5 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 un botón de micelio de 1 mm. de diámetro

Incubación

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

Controles positivos

Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales incluyendo en el agar las siguientes concentraciones de Ketoconazol: 40,50, 60, 70,80,90 y 100 µg/mL.

Interpretación de resultados.

Los resultados se reportaron en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición fue aquella en la que ya no se observó crecimiento, la cual corresponde a la 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 7

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 fueron 1000, 100 y 10 ppm.

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 disuelve la concentración más alta del extracto o compuesto a evaluar (500 µL).

Control Positivo

Como control positivo se utilizó ácido gálico (CL₅₀: 321.5 ppm).

Incubación

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

Interpretación de resultados

Se contó el número de larvas sobrevivientes, las cuales se desplazaron de la misma manera que el grupo testigo.

La concentración letal media (CL₅₀) se determinó para cada extracto interpolando 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 500 y 1000 ppm, moderada cuando la LC₅₀ está entre 100 y 500 ppm, y señalado como fuerte cuando al LC₅₀ se extiende a partir de 0 a 100 ppm.

APÉNDICE 8

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 adicionó 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (2-30 ppm) por triplicado, el solvente utilizado fue metanol grado HPLC. Posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionó 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 100 µM; inmediatamente se protegió de la luz y se mantuvo en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determinó 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 utilizó catequina a las mismas condiciones que el compuesto problema

Interpretación de Resultados

Los resultados se reportaron obteniendo el porcentaje de reducción y se calculó con la siguiente fórmula:

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

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.

REFERENCIAS.

1. Abad, M., Ansuategui, M. y Bermejo, P. 2007. Active antifungal substances from natural sources. Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University Complutense. 116-145.
2. Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S. Jacquez, P. y López, M. E. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS. México. 218 pp.
3. Alonso, J. 2004. Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos. Editorial Corpus. Argentina, Rosario. 1144 pp.
4. Al-Zanbagui, N. A., Banaja, A.A., Barrett, J. 2000. Molluscicidal activity of some Saudi Arabian Euphorbiales against the snail *Biomphalaria pfeifferi*. Journal of Ethnopharmacology. 70, 119-125.
5. Argueta, V. A. y Cano A. J. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. México. 1785 pp.
6. Arias, A., Valverde, M., Reyes, J. 2001. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla. Instituto Nacional de Ecología – Semarnat. UNAM. 70 pp.
7. Auvin, C., Baraguey, C. Blond, A., Lezenven, F., Pousset, J. and Bodo, B. 1997. Curcaycline B, a cyclic nonapeptide from *Jatropha curcas* enhancing rotamase activity of cyclophilin. Tetrahedron Letters. 38: 2845-2848.
8. Baraguey, C., Blond, A., Correia, I., Pousset, J., Bodo, B. and Auvin-Guette, C. 2000. Mahafacyclin A, a cyclic heptapeptide from *Jatropha mahafalensis* exhibiting β -bulge conformation. Tetrahedron Letters. 41: 325-329.
9. Bittner, M., Alarcón, J., Aqueveque, P., Becerra, J., Hernández, V., Hoeneisen, M. y Silva, M. 2001. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae en Chile. Boletín de la Sociedad Chilena de Química. 46: 1-17.
10. Brum, R., Honda, N., Mazarin, S., Hess, S., Cavalheiro, A and Monache, F. 1998. Jatrowedione, a lathyrane diterpene from *Jatropha weddelliana*. Phytochemistry. 48: 1225-1227.

11. Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Ed. Acribia. España. 594pp.
12. Can-Aké, R., Erosa-Rejón, G., May-Pat, F., Peña-Rodríguez, L. y Peraza-Sánchez, S. 2004. Bioactive Terpenoids from roots and leaves of *Jatropha gaumeri*. Revista de la Sociedad Química Mexicana. 48: 11-14.
13. Canales, M. 2005a. Base fitoquímica del uso tradicional de plantas para el tratamiento de enfermedades de posible origen bacteriano en San Rafael Coxcatlan, Puebla. Tesis de Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México. 145p.
14. Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Durán, A. y Lira, R. 2005b. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. Journal of Ethnopharmacology. 97: 429-439.
15. Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Durán, A. y Lira, R. 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.
16. Céspedes, T., Sánchez, D. 2000. Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. Revista Cubana de Cardiología. 14: 55-60.
17. Chariandy, C.M. Seaforth, C.e. Phelps, R.H. Pollard, G. V. Khambay, B. P. S. 1999. Screening of medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. Journal of Ethnopharmacology. 64: 265-270.
18. Chhabra, S., Mahunnah, R., & Mshiu, E. 1990. Screening of Tanzania Medicinal Plants for Antimicrobial Activity. Journal of Ethnopharmacology. 28: 255.
19. Ciccía, G., Coussio, J., Mongelli, E. 2000. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. Journal of Ethnopharmacology. 72: 185-180.
20. Das, B., Banerji, J. 1988. Arylnaphthalene lignan from *Jatropha gossypifolia*. Phytochemistry. 27: 3684-3686.
21. Das, B., Anjani, G. 1999. Gossypidien, a lignan from stems of *Jatropha gossypifolia*. Phytochemistry. 51: 115-117.

22. Das, B., Venkataiah, B. 1999. A rare diterpene from *Jatropha gossypifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 27: 759-760.
23. Das, B., Venkataiah, B. 2001. A minor coumarino-lignoid from *J. gossypifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 29: 213-214.
24. 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.
25. Dominguez. A. X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Primera edición. Editorial Limusa. México. 281 pp.
26. Escobar, C. y Zuluaga, A. 2004. Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología. *Medicina Cutánea Ibero-Latina-Americana*. 32: 231-240.
27. Fernández-Calienes, A., Mendiola, J., Monzote, L., García, M., Sariego, I., Acuña, D., Scull, R. y Gutiérrez, Y. 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 61 (3): 254-258.
28. Franke, K., Nasher, A., Schmidt, J. 2004. Constituents of *Jatropha unicostata*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 32: 219-220.
29. García, A., Delgado, G., 2006a. Cytotoxic *cis*-Fused Bicyclic Sesquiterpenoids from *Jatropha neopauciflora*. *Journal of Natural Products*. 69: 1618-1621.
30. García, A., Delgado, G., 2006b. Uncommon Sesquiterpenoids and New Triterpenoids from *Jatropha neopauciflora* (Euphorbiaceae) *Helvetica Chimica Acta*. 89: 16-28.
31. García, M. E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 3ª ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 252 pp.
32. Gubitz, G. M., Mittelbach, M., Trabi, M. 1999. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technology*. 67: 73-82.
33. Gurgel, L., Sidrim, J., Martins, D., Cechinel, V y Rao, V. 2005. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. *Journal of Ethnopharmacology*. 97: 409-412.
34. Gutierrez, M. y Droguet, M. 2002. Identificación de compuestos volátiles. *Boletín Intexter (U.P.C.)* 2002. N° 122.

35. Hamza, O., Carolien, J., Mecky, I., Maien, J., Frans, H., Haji, O. 2006. Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. *Journal of Ethnopharmacology*. 108 (1): 124-132.
36. Karmegan, N., Sakthivadivel, M., Anuradha, V., Daniel, T. 1997. Indigenous-plant extracts as larvicidal agents against *Culex quinquefasciatus* Say. *Bioresource Technology*. 59: 137-140.
37. Koneman, W. E. 1985. *Diagnóstico Microbiológico*. Ed. Médica Panamericana, México. 439 pp.
38. Loeffler, J. y Stevens, D. 2003. Antifungal drug resistance. Supplement article. 36: 31-41.
39. Magaña, P. y Villaseñor, J. 2002. La flora de México ¿se podrá conocer completamente?. *Ciencias* 66: 24-26.
40. Mesa, A., Bueno, J. y Betancour, L. 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. *Revista Española Quimioterapia*. Vol. 17: 325-331.
41. Mothana, R. y Urike, L. 2005. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. *Journal of Ethnopharmacology*. 96: 177-181.
42. Mujumdar, A. M., Upadhye, A. S, Misar, A. V. 2000. Studies on antidiarrhoeal activity of *Jatropha curcus* root extract in albino mice. *Journal of Ethnopharmacology*. 70:183-187.
43. Murillo, F. 2006. Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas. *Revista Tecnología*. Alfa Editores Técnicos. 27 pp.
44. 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.
45. Ogunnusi, T. A. y Dosumu, O.O. 2008. Bioactivity of crude extracts of *Euphorbia kamerunica* Pax using brine shrimp (*Artemia salina*) lethality assay. *Journal of Medicinal Plants Research* 2(12): 370-373.

46. Ramos. E., Castañeda. B., Ibáñez. L. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Revista Academica de Perú de Salud*. 15 (1).
47. Ravindranath, N., Ramesh, C., Das, B. 2003. A rare dinoditerpene from *Jatropha curcas*. *Biochemical Systematics and Ecology* XX, 1-2.
48. Rodríguez-Gamboa, T., Fernandes, J., Rodrigues, E., Vieira, P., Barrios, M., Castro-Castillo, O., Victor, S., Pagnocca, F., Bueno, O. y Hebling, M. 2001. Triterpene benzoates from the bark of *Picramnia teapensis* (Simaroubaceae). *Journal Brazil Chemical*. 12: 386-390.
49. Rodríguez, M., Vega, K., Gante, V., Jiménez, J. 2009. Distribución del género *Jatropha* L. (Euphorbiaceae) en el estado de Puebla, México. 37-48 pp.
50. Rosas, L. R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis Profesional Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México. 94 pp.
51. Salcedo-Sánchez, B. 1997. Insectos precortesianos de la cueva de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Licenciatura. Biología. UNAM Facultad de Ciencias 6-10 pp.
52. Schmeda-Hirschmann, G., Tschritzis, F. and Jakupovic, J. 1992. Diterpenes and lignin from *Jatropha gossidentata*. *Phytochemistry*. 31: 1731-1735.
53. Srinivasan, D., Sangeetha, N., Suresh, T., Lakshmana, P. P. 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 74: 217-220.
54. Standley, P. C. and Steyermark, J. A. 1949. Flora of Guatemala. Vol.24, Part. VI. USA. 25-130 pp.
55. Staubmann, R., Ncube, I., Gubitz, G.M., Steiner, W., Read, J.S. 1999a. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. Seeds. *Journal of Biotechnology*. 75: 117-126.
56. Staubmann, R., Schubert-Zsilavec, M., Hiermann, A., Karttnig, T. 1999b. A complex of 5-hydroxypyrrolidin-2-one and pyrimidine-2,4-dione isolated from *Jatropha curcas*. *Phytochemistry*. 50: 337-338.

57. Trease, G. E. y Evans, W. C. 1993. Tratado de Farmacognosia. 15 ed. Ed. Interamericana. México. 901 pp.
58. Valiente-Banuet, A., Alcantara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arismendi, M. C., Ortega-Ramírez, J., Soriano, J. A. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacan-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 67:25-75.
59. Van den Berg, A.J.J., Horsten, S.F.A.J., Kettenes-Van den Bosch., Kroes, B.H., Beukelman, C.J., Leeflag, B.R., Labadie, R.P. 1995. Curcacycline A – a novel cyclic octapeptide isolated from the latex of *Jatropha curcas* L. FEBS Letters. 358: 215-218.
60. Vanden Berghe, D. A. & Vlietnick A. J. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: Hostettmann, K. (Ed). Methods in plant Biochemistry, Vol 6: Assay for Bioactivity. 47-69 pp.
61. Villegas, L. F., Fernández, I. D., Maldonado, H., Torres, R., Zavaleta, A., Vaisberg, A. J. Hammond, G. B. 1997. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Perú. J. of Ethnopharmacology. 55: 193-2000.
62. Wang, H., Bun, T. N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin -like protein from kiwi fruits. Phytochemistry 61: 1-6.

REFERENCIAS DIGITALES

1. www.phytochemicals.info/phytochemicals/betasitosterol.php. (Citada 30-Junio- 2010).
2. www.salud.gob.mx. (Citada 10-Agosto 2009).
3. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Composición de las grasas alimentarias. Citado 29-julio-2010.