



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, ANTIOXIDANTE Y TOXICIDAD
DEL FRUTO (en diferentes estados de maduración) Y LA HOJA DE
Cyrtocarpa procera KUNTH (CHUPANDILLA)

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA:

MARÍA GUADALUPE ELENO MEDINA

ASESORA Y DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO.



2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de 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 Flores Ortiz.

Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado.

Dra. 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 2010

Plantas útiles de San Rafael, Coxcatlán
(MGU/Useful Plants Project Mexico)

A MI MADRE

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constantes, sólo deseo que entiendas que el logro mío, es el logro tuyo. Con admiración y respeto. Te amo mamá.

A MI FAMILIA

Gracias: por la oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprensible, por su ejemplo de superación incansable, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de mi carrera profesional.
Por lo que ha sido y será... gracias.

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

La ejecución de la tesis a cualquier nivel es en todos los casos la culminación de años de trabajo y esfuerzo personal que siempre requiere de la ayuda de los demás porque no somos máquinas y porque no estamos solos. Quiero en estas líneas expresar mi agradecimiento a todas las personas que también forman parte de este trabajo sin las cuáles no hubiese sido posible su finalización.

Primero antes que nada doy gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía a lo largo de mi vida.

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

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. María Margarita Canales Martínez por depositar su confianza en mí para la realización de este trabajo, por brindarme su ayuda cuando más la necesitaba, por ser una persona con la que puedo contar siempre, por el cariño que me brinda y los ánimos que me da.

Al Dr. César Mateo Flores Ortiz por su colaboración y apoyo brindado en todo momento sin poner ningún impedimento, al contrario, siempre brindando una sonrisa.

A la Dra. Claudia Tzasna Hernández, por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio, gracias.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez, por sus atinadas observaciones en el proyecto y porque a pesar de ser poco el tiempo que nos conocemos ha demostrado ser una gran persona pero sobre todo por los momentos en los que más que un profesor se comportó como un amigo.

Al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla, por su valioso apoyo técnico en los estudios espectrométricos, sin los cuáles no hubiese sido posible la finalización de este proyecto, muchas gracias.

Quiero dar las gracias de manera muy especial al M. en C. Ángel Durán Díaz, con el cuál no sólo comparto la fecha de nacimiento, sino el cariño y la amistad, también por estar siempre disponible para todo y por su ayuda en el análisis estadístico durante el proyecto.

Al profesor Omar Ángeles López y todo su equipo, por poner siempre a nuestra disposición sus instalaciones para la realización de los ensayos con *Artemia salina*.

A los miembros de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES-Iztacala (compañeros, amigos y profesores) con los que he compartido buenos ratos. A mis compañeras y amigas de laboratorio: Ana Hernández, Rebeca Rivera, Julieta Orozco, Karla Martínez, Pilar Ramírez gracias por las horas amenas de compañía y a muchos otros que ya no están: Javier, Maricarmen, Tomás y Estefanía. A las nuevas

generaciones, Lesslie, Brenda, Karina y Ricardo que me han dado ánimos en la recta final, por la ilusión que derrochan.

A todos mis profesores, amigos y compañeros que he conocido a lo largo de mi vida porque creen en mi.

También agradezco a todas y cada una de las personas que han dejado huella en mí, ustedes han sido fuente de aprendizaje, alegría, amistad y apoyo.

Doy las gracias de manera muy especial a mis padres, hermanas y a mi hermano, sin los que éste trabajo no habría comenzado, siempre pendientes y dispuestos a disculparme gratuitamente por muchos momentos de convivencia que me he perdido con ellos, los amo.

Mami gracias por todo tu esfuerzo, por creer en mí sin condiciones y por el apoyo que me has dado para que el día de hoy sea una realidad, mil gracias mami, te amo.

Papá, éste es un logro que quiero compartir contigo, gracias por ser mi papá, te amo papi.

A mis hermanas que han soportado mi carácter en casa, por comprenderme y apoyarme. Gracias Nelly porque siempre has sido una excelente guía y como hermana mayor siempre nos procuras a todos. Gracias Candy porque ante cualquier percance eres siempre una excelente mediadora y apoyo además porque al llegar a casa siempre hay una deliciosa comida que reconforta a cualquiera. Adriano gracias por todos los momentos que compartimos y porque siempre me haces reír, los amo.

A toda mi familia, a mis tías, tíos y primos, a mi cuñado, muchas gracias a todos por el apoyo que me han brindado.

A mi querido abuelito José Medina, gracias porque siempre te esforzaste por dar lo mejor a tu familia, sé que estas orgulloso de todos tus nietos y que te hubiera gustado verme como toda una licenciada, pero sé que estás en un lugar mejor y cuando el Señor nos llame estaremos contigo para platicar de tantas cosas que quedaron pendientes.

A mis perritos Nena, Pulga y Rony y a los que ya no están Chicarcas y Negrito, gracias por cuidarnos siempre, por ser una gran compañía y por arrancarnos siempre una sonrisa al llegar a casa por pésimo que haya sido el día, pero sobre todo por enseñarnos a amar a otro ser sin importar condiciones, los amo.

GRACIAS A TODOS

¿Cómo hacerte saber que siempre hay tiempo?

Que uno sólo tiene que buscarlo y dárselo,
Que nadie establece normas salvo la vida,
Que la vida sin ciertas normas pierde forma,
Que la forma no se pierde con abrirnos,
Que abrirnos no es amar indiscriminadamente,
Que no está prohibido amar,
Que también se puede odiar,
Que el odio y el amor son afectos
Que la agresión porque sí hiere mucho,
Que las heridas se cierran,
Que las puertas no deben cerrarse,
Que la mayor puerta es el afecto,
Que los afectos nos definen,
Que definirse no es remar contra la corriente,
Que no cuanto más fuerte se hace el trazo más se dibuja,
Que buscar un equilibrio no implica ser tibio,
Que negar palabras implica abrir distancias,
Que encontrarse es muy hermoso,
Que el sexo forma parte de lo hermoso de la vida,
Que la vida parte del sexo,
Que el "por qué" de los niños tiene un porque,
Que querer saber de alguien no es sólo curiosidad,
Que querer saber todo de todos es curiosidad malsana,
Que nunca está de más agradecer,
Que la autodeterminación no es hacer las cosas solo,
Que nadie quiere estar solo,
Que para no estar solo hay que dar,
Que para dar debemos recibir antes,

Que para que nos den hay que saber también cómo pedir,
Que saber pedir no es regalarse,
Que regalarse es, en definitiva, no quererse,
Que para que nos quieran debemos demostrar qué somos,
Que para que alguien "sea" hay que ayudarlo,
Que ayudar es poder alentar y apoyar,
Que adular no es ayudar,
Que adular es tan pernicioso como dar vuelta la cara,
Que las cosas cara a cara son honestas,
Que nadie es honesto porque no roba,
Que el que roba no es ladrón por placer,
Que cuando no hay placer en las cosas no se está viviendo,
Que para sentir la vida no hay que olvidarse que existe la muerte,
Que se puede estar muerto en vida,
Que se siente con el cuerpo y la mente,
Que con los oídos se escucha,
Que cuesta ser sensible y no herirse,
Que herirse no es desangrarse,
Que para no ser heridos levantamos muros,
Que quien siembra muros no recoge nada,
Que casi todos somos albañiles de muros,
Que sería mejor construir puentes,
Que sobre ellos se va a la otra orilla y también se vuelve,
Que volver no implica retroceder,
Que retroceder también puede ser avanzar,
Que no por mucho avanzar se amanece más cerca del sol,
¿Cómo hacerte saber que nadie establece normas salvo la vida?
¿Cómo hacerte saber que siempre hay tiempo?

Pablo Neruda

Ves cosas y dices, "¿Por qué?" Pero yo sueño cosas que nunca fueron y digo, "¿Por qué no?"

George Bernard Shaw

Índice de contenido

Índice de Figuras.....	i
Índice de Cuadros.....	ii
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	7
OBJETIVO GENERAL.....	9
OBJETIVOS PARTICULARES.....	9
METODOLOGÍA.....	10
Colecta del material.....	10
Obtención de los extractos.....	10
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	11
Microorganismos utilizados.....	11
Evaluación cualitativa.....	11
Pruebas estadísticas.....	12
Evaluación cuantitativa.....	12
Actividad de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	12
Evaluación de toxicidad.....	13
Evaluación antioxidante.....	13
Detección cualitativa de metabolitos secundarios.....	13
RESULTADOS.....	15
<i>Fruto</i>	15
Colecta de la planta.....	15
Rendimiento del extracto.....	16
Actividad antibacteriana.....	16

Actividad del extracto (F) sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	24
Toxicidad.....	25
Actividad antioxidante.....	26
Detección de metabolitos secundarios	27
<i>Hoja</i>	33
Colecta de la planta.....	33
Rendimiento del extracto.....	33
Actividad antibacteriana.....	33
Toxicidad.....	35
Actividad antioxidante.....	36
Detección de metabolitos secundarios	37
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	57
PERSPECTIVAS.....	58
APÉNDICES.....	59
Apéndice 1.....	59
Apéndice 2.....	62
Apéndice 3.....	65
Apéndice 4.....	65
Apéndice 5.....	68
Apéndice 6.....	69
Apéndice 7.....	70
Apéndice 8.....	71
Apéndice 9.....	72
REFERENCIAS.....	73

Índice de Figuras

Figura 1. Halos de inhibición de los dos grupos bacterianos.....	18
Figura 2. Halos de inhibición de las cepas bacterianas probadas en los diferentes extractos del fruto de <i>C. procera</i>	19
Figura 3. Halos de inhibición de los diferentes extractos del fruto de <i>C. procera</i>	20
Figura 4. Halos de inhibición de los grupos bacterianos y los diferentes extractos de <i>C. procera</i>	21
Figura 5. Actividad del extracto del fruto inmaduro fresco libre de compuestos no polares (F) sobre la curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> ATCC 12398.....	24
Figura 6. Actividad del extracto del fruto inmaduro fresco libre de compuestos no polares (F) sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> No-01.....	25
Figura 7. Cromatograma del extracto A (maduro seco crudo) del fruto de <i>C. procera</i>	28
Figura 8. Cromatograma del extracto B (inmaduro seco crudo) del fruto de <i>C. procera</i>	29
Figura 9. Cromatograma del extracto C (inmaduro fresco crudo) del fruto de <i>C. procera</i>	30
Figura 10. Cromatograma del extracto F (inmaduro fresco libre de compuestos no polares).....	31
Figura 11. Cromatograma del extracto H1 (Hojas crudo) de <i>C. procera</i>	38

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Datos etnobotánicos de la especie.....	15
Cuadro 2. Rendimiento de los diferentes extractos del fruto de <i>C. procera</i>	16
Cuadro 3. Actividad antibacteriana de los diferentes extractos del fruto de <i>C. procera</i>	17
Cuadro 4. Determinación de CMI y CBM de los diferentes extractos del fruto de <i>C. procera</i>	23
Cuadro 5. Toxicidad general de los diferentes extractos del fruto de <i>C. procera</i> sobre <i>Artemia salina</i>	26
Cuadro 6. Actividad antioxidante de los diferentes extractos del fruto de <i>C. procera</i>	27
Cuadro 7. Tiempo de retención y UV $\lambda_{\text{máx}}$ de los compuestos de los extractos del fruto de <i>C. procera</i>	32
Cuadro 8. Rendimiento de los diferentes extractos de la hoja de <i>C. procera</i>	33
Cuadro 9. Halos de reducción del crecimiento bacteriano del extracto crudo de las hojas de <i>C. procera</i>	34
Cuadro 10. Determinación de CMI y CBM del extracto crudo de la hoja de <i>C. procera</i>	35
Cuadro 11. Toxicidad general de los diferentes extractos de las de <i>C. procera</i> sobre <i>Artemia salina</i>	36
Cuadro 12. Actividad antioxidante de los diferentes extractos de la hoja de <i>C. procera</i>	37
Cuadro 13. Tiempo de retención y UV $\lambda_{\text{máx}}$ de los compuestos del extracto H1 de <i>C. procera</i>	38

RESUMEN

En la actualidad, las plantas medicinales constituyen un importante recurso natural, siendo la primera y casi única opción de salud de los segmentos de las sociedades más pobres, particularmente en los países de tercer mundo. Es precisamente por este motivo que existe una cantidad notable de medicamentos patentados cuya base la constituyen ya sea un metabolito secundario de origen vegetal o alguna sustancia derivada de un principio activo aislado de especies vegetales. Se ha comprobado que algunos frutos presentan actividad antioxidante, antimicrobiana y/o toxicidad para algunos parásitos. En particular, en este trabajo se estudiaron algunas actividades biológicas del fruto y hoja de *Cyrtocarpa procera* Kunth (Chupandilla). El fruto de *C. procera* se colectó en los meses de Junio a Septiembre del 2009 y la hoja en el mes de Noviembre del 2009 en la localidad de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Los extractos se obtuvieron por maceración. La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se utilizó la técnica de dilución en agar. El efecto bactericida o bacteriostático se obtuvo mediante la curva letal de crecimiento bacteriano. La prueba de toxicidad general se hizo con larvas Nauplio II de *Artemia salina* (Leach). La evaluación antioxidante se llevó a cabo mediante el método de Reducción del Radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH). Los extractos metanólicos de los diferentes frutos (estado de maduración) fueron los que tuvieron los porcentajes más altos de rendimiento (maduro fresco crudo 23.87%, inmaduro seco crudo 43.26%, inmaduro fresco crudo 9.54%, inmaduro fresco libre de compuestos no polares 8.5%). Las pruebas realizadas al fruto (diferente grado de maduración) mostraron a *S. pneumoniae* ($M_e=9.5$ mm) como el microorganismo con los mayores halos de inhibición; mientras que las bacterias con los menores halos de inhibición fueron *E. agglomerans*, *E. marcescens* y *S. typhi* ($M_e=6$ mm). El extracto de las hojas no presentó halos de inhibición, pero si mostró una reducción en el crecimiento poblacional bacteriano. Respecto a la CMI y CBM el extracto F (inmaduro fresco libre de compuestos no polares) alcanzó una CMI de hasta 0.125 mg/mL y una CBM por arriba de 4 mg/mL siendo éste el más activo de

los extractos probados. En el caso de las hojas, las concentraciones ensayadas para el extracto H1 (metanólico crudo) de MIC y CBM mostraron una mayor actividad frente a bacterias Gram positivas. El efecto del extracto F (inmaduro fresco libre de compuestos no polares) sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* ATCC 12398 y *V.cholerae* No-01 indica que en el primero de los casos el efecto es bacteriostático aplicando una concentración de 0.175 mg/mL, sin embargo; con las concentraciones de 0.25 mg/mL y 4.0 mg/mL el efecto es bactericida. En el caso de *V.cholerae* No-01 el efecto es bacteriostático para las tres concentraciones probadas. La mayoría de los extractos tanto del fruto como de la hoja resultaron ser fuertemente tóxicos. Los extractos tanto de la hoja como del fruto presentaron actividad antioxidante. Estos resultados validan el uso tradicional del fruto de esta especie para aliviar enfermedades del tracto digestivo.

INTRODUCCIÓN

El hombre desde sus inicios ha recurrido a la naturaleza en busca de su alimento y de su salud. Por medio de errores y aciertos aprendió a conocer las plantas que podían curarlo, y así este conocimiento fue transmitido por generaciones y fue enriqueciéndose con la experiencia y conocimientos aportados a través del tiempo (Díaz, 1998; Gurib-Fakim, 2006).

El uso de las plantas para fines terapéuticos se pone de manifiesto por la existencia de herbarios desde la época de los sumerios, asirios, los babilonios o los fenicios. El papiro de Ebers (1700 a. C.), con más de 20 m. de longitud, encontrado en las ruinas de Luxor, almacena el uso medicinal de 700 plantas, como el ajo o la adormidera. En China y el resto de Asia el uso de plantas para tratar enfermedades se remonta a más de 10 000 años. Sin embargo, fueron griegos y romanos los primeros en sistematizar en Occidente, a través de sus escritos, el estudio de las plantas medicinales. Así, Dioscórides, en su obra *De materia Medica*, describe más de 600 plantas de uso medicinal (Barrera, 2008).

Philippus Theophrastus Bombstus (1493-1541), mejor conocido como Paracelso, enriqueció el tratamiento con las plantas medicinales de manera particular, estableció la signatura de cada planta y sus aplicaciones según su color o su aspecto. Alejandro Magno introdujo en Europa un sin número de plantas con propiedades curativas gracias a sus expediciones por África, Persia y la India (Díaz, 1998).

En México, la mutua dependencia entre el hombre y las plantas satisfacen innumerables aspectos de la vida, así encontramos plantas que se usan para diversos fines, tanto de orden alimenticio, como forrajero, de vestido, ornamental o medicinal (León, 2005). Los conocimientos acerca de las plantas medicinales en nuestro país datan de épocas anteriores al descubrimiento de América. Los indígenas en virtud de su íntimo contacto con la naturaleza y por una experiencia prolongada, habían adquirido amplios conocimientos sobre las

propiedades curativas de las plantas y las sabían aprovechar con acierto (Del Valle, 2009).

En el siglo XVI en la Nueva España se almacena y escribe el conocimiento médico herbolario indígena en obras como el Códice de la Cruz y Badiano, el cual fue escrito en 1552. Otro documento es el Códice Florentino, escrito por Fray Bernardino de Sahagún entre los años 1558 y 1578. Todas estas obras muestran la fusión de conocimientos, resultado de la Conquista, en donde la herbolaria mexicana se complementa con especies medicinales traídas por los españoles como la manzanilla, el albahaca y la hierbabuena, por mencionar algunas (Díaz, 1998).

En los siglos XVI y XVII hay obras importantes como las de Gregorio López (1674), las obras de Vicente Cervantes (1789-1832), las farmacopeas (1895), los documentos del Instituto Médico Nacional (1889-1914) y la obra de Maximino Martínez (1933) con su libro “Las plantas medicinales de México”, que reunió la información que el IMSS (Instituto Mexicano del Seguro Social) había recabado en las dos últimas décadas del siglo XIX (Díaz, 1998).

En la actualidad, las plantas medicinales constituyen un importante recurso natural, siendo la primera y casi única opción de salud de los segmentos más pobres de la sociedad, particularmente en los países de tercer mundo. Y es precisamente por este motivo que existe una cantidad notable de medicamentos patentados cuya base lo constituyen, ya sea un metabolito secundario de origen vegetal o alguna sustancia derivada de un principio activo aislado de especies vegetales (Lechuga *et al.*, 2000).

El aislamiento de los diversos compuestos químicos sintetizados por las plantas se inició a partir del estudio de las especies medicinales (Cotton, 1996) y es que sólo raramente la planta entera tiene valor medicinal, normalmente los compuestos útiles (metabolitos secundarios) se concentran en alguna de sus partes: hojas, flores, cortezas, semillas, raíces o frutos son las partes que se utilizan con relativa frecuencia (Barrera, 2008).

El conjunto de reacciones químicas que tiene lugar en un organismo constituyen el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Se denominan metabolitos primarios (Ávalos y Pérez, 2009).

Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios ó productos naturales). La característica más importante de los metabolitos secundarios es su distribución restringida, se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies o subespecies (Ávalos y Pérez, 2009).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no sólo tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de las simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio del suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Son numerosos los metabolitos secundarios útiles para el hombre en diferentes formas, entre estos están: alcaloides, glicósidos, flavonoides, fenoles, saponinas, taninos, terpenoides, etc. Son estos metabolitos secundarios,

generalmente presentes en concentraciones bajas, los que ejercen un efecto biológico o farmacológico en los seres humanos. Es por ello que los estudios fitoquímicos son una parte importante dentro de las investigaciones encaminadas a encontrar nuevos compuestos y formas de preparación de medicamentos, ya que la fitoquímica se encarga de elucidar la estructura química de estos compuestos, su biosíntesis, su metabolismo y su distribución natural (Barrera, 2008).

Argueta y Cano (1994) mencionan que el fruto de *Cyrtocarpa procera* es utilizado para aliviar fiebres, disenterías y diarreas. Tomando en cuenta lo antes mencionado en este trabajo se estudió la actividad antibacteriana, antioxidante y la toxicidad general del fruto y la hoja de *Cyrtocarpa procera* Kunth (Chupandilla) (Apéndice 1) de la localidad de San Rafael, Coxcatlán, ubicado en el estado de Puebla.

ANTECEDENTES

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

En el siglo XVI, Francisco Hernández relata: “el fruto es muy astringente y destila una baba sumamente glutinosa; ésta, untada, cura las fiebres, se administra contra las disenterías y las diarreas. Para el siglo XX Maximino Martínez la mencionó como eficaz contra la lepra (Argueta y Cano, 1994).

La mayoría de los estudios fitoquímicos realizados para *C. procera* se enfocan en estudiar la corteza de la planta, de la cual se ha comprobado su actividad antimicrobiana (Martínez, 2009; Canales *et al.*, 2005).

Se ha comprobado que algunos frutos presentan actividad antioxidante, antimicrobiana y/o presentan toxicidad para algunos parásitos.

En el caso de la familia Anacardiaceae se han estudiado algunas especies como *Schinus polygamus* (Cav.) Cabr del cual, fueron comprobadas las actividades biológicas (antiinflamatoria, antipirética, analgésica) que presentan diferentes extractos de la corteza (Erazo *et al.*, 2006).

También se encuentra la evaluación de la toxicidad del extracto etanólico de hojas y frutos del *Schinus molle* L. en ratas para posible uso como insecticida. Dichos extractos no mostraron toxicidad a ningún órgano evaluado, por ello los autores sugieren que los extractos deberían ser relativamente seguros para el uso como insecticida (Ferrero *et al.*, 2007)

Se han realizado estudios con frutos de otras familias botánicas, donde han evaluado la actividad antimicrobiana y antioxidante del aceite esencial del fruto de *Chaerophyllum libanoticum* Boiss. *et* Kotschy (Apiaceae) encontrando que inhibe bacterias patógenas humanas como *Staphylococcus aureus*, aunado a

ello, el fruto presenta una capacidad antioxidante del 16% (Demirci *et al.*, 2007).

Lo antes expuesto sugieren que *C. procera* pudiera tener un efecto antidiarreico, antiinflamatorio, etc., sin embargo, no hay estudios fitoquímicos para el fruto y la hoja de esta especie, por lo que, se asume que *C. procera* es poseedora de una gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales le atribuyen a la planta diversas actividades biológicas. Es preciso mencionar que este es el primer estudio sobre las propiedades medicinales y composición química del fruto de *C. procera* para la cual se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la actividad antibacteriana, antioxidante y toxicidad general del fruto y la hoja de *Cyrtocarpa procera* Kunth.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el rendimiento de los extractos de diferente polaridad del fruto y la hoja de *C. procera* obtenidos mediante la técnica de maceración.
- Evaluar la actividad antibacteriana (método de difusión en agar de Kirby Baüer), toxicidad general (técnica sobre *Artemia salina*) y la actividad antioxidante (método de reducción del DPPH•) de los extractos obtenidos.
- Determinar de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Bactericida Mínima (CBM) empleando el método de macrodilución en agar de los extractos activos.
- Determinar la actividad bacteriostática y/o bactericida de los extractos activos mediante la curva de crecimiento bacteriana.
- Determinar cualitativamente la presencia de fenoles, alcaloides y taninos en los extractos activos, usando técnicas cualitativas.
- Realizar el análisis de los extractos mediante una cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

METODOLOGÍA

Colecta del material

El fruto de *C. procera* se colectó durante los meses de Junio a Septiembre del 2009 y la hoja en el mes de Noviembre del 2009 en la localidad de San Rafael, Coxcatlán, Puebla (Apéndice 2). Un espécimen fue depositado en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (IZTA) con el siguiente número de registro: MPF 371.

Obtención de los extractos

Para la obtención del extracto herbal, se tomó la pulpa del fruto (en los diferentes grados de maduración), así como de la hoja de *C. procera*; se partió y se dejó secar para obtener el extracto metanólico mediante la técnica de maceración descrita por Domínguez (1973) (Apéndice 3). Se realizó una partición del extracto crudo con metanol y hexanos para determinar que polaridad presentaba la actividad antibacteriana y ver si ésta incrementaba. Así, los extractos se filtraron y se concentraron a sequedad a presión reducida. El rendimiento de los extractos se determinó por diferencia de peso con relación al peso seco de la planta.

•Simbología de los extractos del fruto y la hoja de <i>C. procera</i> .	
A	Maduro seco crudo
B	Inmaduro seco crudo
C	Inmaduro fresco crudo
D	Inmaduro fresco hexano
E	Inmaduro fresco acetato de etilo
F	Inmaduro libre de compuestos no polares
H1	Hojas crudo
H2	Hojas hexane
H3	Hojas acetato de etilo
H4	Hojas libre de compuestos no polares

Evaluación de la actividad antibacteriana

Microorganismos utilizados

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

Bacterias

- Gram-positivas:

Staphylococcus aureus ATCC 12398, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Streptococcus pneumoniae* aislada de un caso clínico donadas por el Hospital Ángeles (Metropolitano).

- Gram-negativas

Vibrio cholerae No-01, *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislado de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislado de un caso clínico (estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxinas, serotipo Inaba, biotipo El Tor), *Vibrio cholerae* CDC V12, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155, *Enterobacter aerogenes*, fueron donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán, *Yersinia enterocolitica*, fue donada por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala (UNAM) y *Salmonella typhi* ATCC 19430. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 53218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens* aisladas de casos clínicos, donadas por el Hospital Ángeles (Metropolitano).

Evaluación cualitativa

La actividad antibacteriana se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 4). Como

control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con Cloramfenicol (25 µg por disco). Los discos se impregnaron 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.

Pruebas estadísticas

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

Evaluación cuantitativa

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) se utilizó la técnica de dilución en agar (Koneman, 1996) (Apéndice 5). Las concentraciones empleadas para los biosayos cuantitativos fueron las siguientes: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 µg/mL.

Actividad de los extractos sobre la curva del crecimiento bacteriano

Para determinar si el extracto tenía un efecto bactericida o bacteriostático se evaluó su actividad sobre la curva de crecimiento bacteriano, para la cual se preparó un tubo para cada concentración del extracto ($\frac{1}{2}$ MIC, MIC y CBM) y otro para el testigo, de esta forma se muestreó desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora durante los cuatro primeros tiempos, posteriormente dos muestras con intervalos de dos horas, una muestra a las 12 horas y finalmente a las 24 horas. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado. (Muroi *et al.*, 1993) (Apéndice 7).

Evaluación de toxicidad

La prueba de toxicidad general en crustáceos de agua salina *in vivo* se llevó a cabo usando los extractos del fruto y la hoja 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 hicieron por triplicado (Apéndice 8).

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). Se evaluó el extracto a diferentes concentraciones (Apéndice 9).

Detección cualitativa de metabolitos secundarios

Fenoles

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

Taninos

En agar sangre se colocaron tres sensidiscos con 2 mg de la muestra a evaluar. Se dejó en incubación a 36°C durante 24 horas. Si hay presencia de taninos se observa un halo alrededor de cada disco resultado de la hemólisis de la sangre (Domínguez, 1973).

Alcaloides:

Por la gran heterogeneidad de los alcaloides existen numerosas pruebas coloridas o de precipitación que sólo son positivas con ciertos grupos de alcaloides, por lo que se han propuesto para clasificaciones parciales. En este caso se utilizaron unas gotas del reactivo de Dragendorff, ya que al agregarlo

precipita y da una coloración anaranjado-marrón, dando así positivo en el contenido de alcaloides (Domínguez, 1973).

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

Análisis de los extractos mediante cromatografía líquida de alta resolución.

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

RESULTADOS

■ **FRUTO**

Colecta de la planta

El fruto del árbol de *C. procera* (Chupandilla) fue colectado durante los meses de Junio a Septiembre del 2009 en la localidad de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Los datos de la especie se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Datos etnobotánicos de la especie

Nombre científico	<i>Cyrtocarpa procera</i> Kunth
Nombre común	Chupandilla
Familia	Anacardiaceae
Parte utilizada	Fruto
Uso	Para el tratamiento de la diarrea o soltura: se cuece un puñito de la cáscara en 1 litro de agua y se toma como agua de uso, durante cuatro días o el tiempo necesario (Masaibo y He, 2009).

El uso reportado es para el estado de Nayarit.

Rendimiento del extracto

El rendimiento de los diferentes extractos del fruto de *C. procera* se observa en el Cuadro 2. De los seis extractos obtenidos el que obtuvo el mayor rendimiento fue el inmaduro seco (B) con 43.26%.

Cuadro 2. Rendimiento de los diferentes extractos del fruto de *C. procera*.

Extractos	Peso (g)	%
A	164.95	23.87
B	28.82	43.26
C	79.09	9.54
D	3.96	0.47
E	0.32	0.38
F	70.19	8.50

A: maduro seco crudo (respecto a 690.78 g de fruto fresco); B: inmaduro seco crudo (respecto a 66.79 g de fruto seco); C: inmaduro fresco crudo (respecto a 829.28g de fruto fresco); D: inmaduro fresco hexánico (respecto a 829.28g de fruto fresco); E: inmaduro fresco acetato de etilo (respecto a 829.28g de fruto fresco); F: inmaduro fresco libre de compuestos no polares (respecto a 829.28g de fruto fresco), D,E y F se obtuvieron a partir de C.

Actividad Antibacteriana

EVALUACIÓN CUALITATIVA

Las seis bacterias Gram positivas probadas mostraron sensibilidad para todos los extractos, mientras que de las catorce cepas bacterianas del grupo Gram negativas, sólo *E. coli* no mostró sensibilidad frente a ninguno de los extractos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Actividad antibacteriana de los diferentes extractos del fruto de *C. procera*.

GRUPO	BACTERIA	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)					
		A	B	C	D	E	F
Gran Positivas	<i>S.aureus</i> ATCC 291213	6.0±0.0	13.0±2.6	12.3±0.6	6.3±0.6	7.0±0.0	8.3±1.1
	<i>E. faecalis</i>	6.0±0.0	14.7±1.2	14.7±1.2	7.3±0.6	7.6±0.6	10.3±0.6
	<i>B. subtilis</i>	8.3±0.6	8.0±1.0	6.3±0.6	8.6±0.6	7.6±1.5	7.6±0.6
	<i>S. epidermidis</i>	NA	13.0±1.7	10.0±0.0	8.6±2.1	6.0±0.0	12.0±4.6
	<i>S. pneumoniae</i>	8.7±0.6	12.0±1.7	9.7±1.7	8.0±0.0	9.7±1.5	15.6±0.6
	<i>S.aureus</i> ATCC 12398	NA	10.0±1.0	11.7±1.5	N.A	N.A	7.6±1.1
Gram Negativas	<i>P. mirabilis</i>	6.3±0.6	8.0±0.0	6.3±0.6	6.0±0.0	6.3±0.6	7.0±0.0
	<i>S.marcescens</i>	6.0±0.0	7.0±1.0	6.0±0.0	6.0±0.0	7.0±1.7	8.3±0.6
	<i>E. agglomerans</i>	NA	6.0±0.0	7.0±0.0	N.A	8.3±1.1	8.0±1.0
	<i>P. aeruginosa</i>	NA	11.7±1.5	10.3±1.5	7.5±0.7	6.3±0.6	8.3±0.6
	<i>V. cholerae</i> agua	8.3±0.6	8.0±0.0	9.0±1.0	8.3±0.6	8.6±0.6	9.3±1.5
	<i>V. cholerae</i> cc	8.5±0.7	N.A	N.A	7.3±0.6	7.3±1.5	9.0±1.0
	<i>V. cholerae</i> Tor	8.3±0.6	6.3±0.6	6±0.0	8.0±0.0	6.0±0.0	8.3±0.6
	<i>Vch</i> No-01	8.5±0.7	7.0±0.0	8.0±0.0	9.0±1.0	8.0±1.0	8.6±0.6
	<i>S. typhi</i>	7.5±0.7	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0	6.0±0.0
	<i>E. aerogenes</i>	N.A	N.A	N.A	N.A	7.3±0.6	8.3±0.6
	<i>Y.enterocolitica</i> Ángeles	N.A	N.A	N.A	N.A	8.7±0.6	9.0±1.0
	<i>Y. enterocolitica</i> CUSI	N.A	N.A	N.A	6.0±0.0	8.5±0.7	9.0±0.0

A: maduro seco crudo; B: inmaduro seco crudo; C: inmaduro fresco crudo; D: inmaduro fresco hexánico; E: inmaduro fresco acetato de etilo; F: inmaduro fresco libre de compuestos no polares; N.A: no activo. Halos de inhibición en mm; valor promedio de 3 repeticiones; los extractos fueron probados con una concentración de 2mg/10µl por sensidisco. Todas las especies bacterianas mostradas fueron sensibles al cloramfenicol (25µg/disco).

La evaluación de la actividad antibacteriana de los seis extractos de *C. procera* mostró que el grupo bacteriano de las Gram positivas ($M_e=8$; M_e es la mediana de los datos obtenidos) tuvo mayores halos de inhibición comparado con el grupo bacteriano Gram negativas ($M_e=7$) (Figura 1).

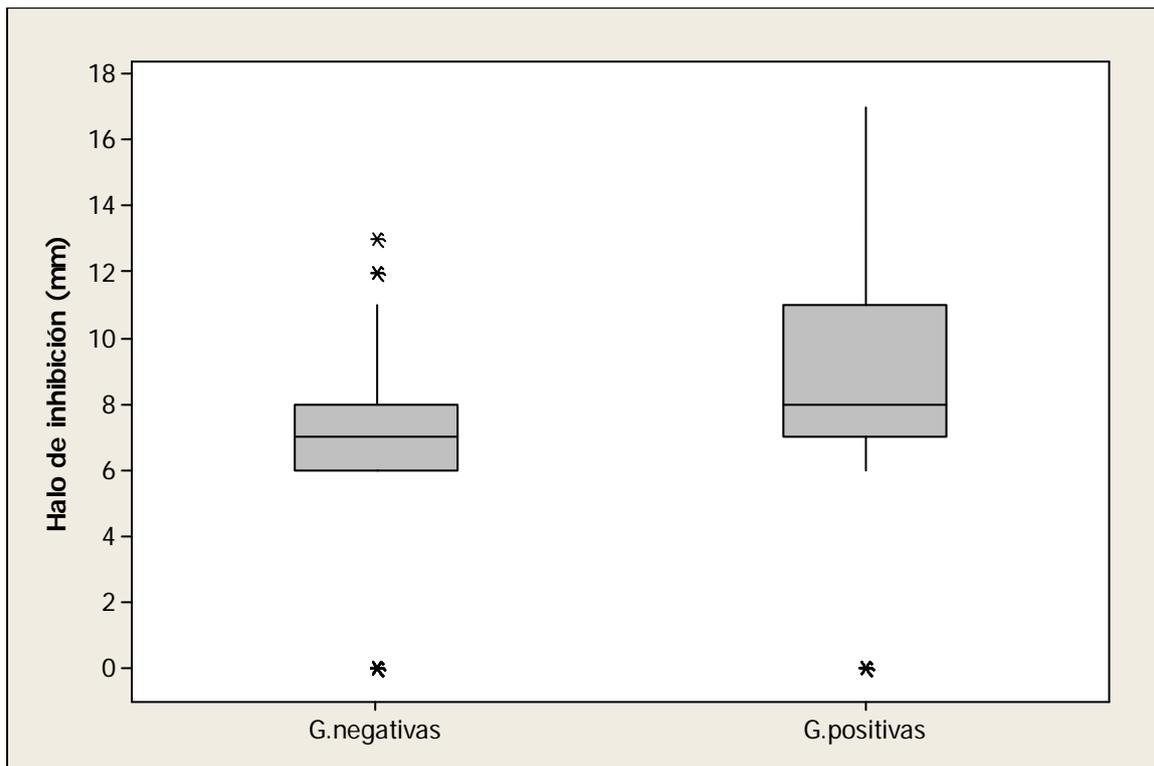


Figura 1. Halos de inhibición de los dos grupos bacterianos.

Los resultados del análisis de varianza de un factor (ANOVA) mostraron que hay diferencias significativas ($F=23.35$, $P=0$) entre la sensibilidad de los grupos bacterianos Gram positivas y Gram negativas al aplicarles los seis diferentes extractos del fruto de *C. procera*.

La bacteria que presentó los halos de inhibición de mayor diámetro para los seis diferentes extractos probados fue *S. pneumoniae* ($M_e=9.5$); mientras que las bacterias con los menores halos de inhibición fueron *E. agglomerans*, *E. marcescens* y *S. typhi* ($M_e=6$) (Figura 2).

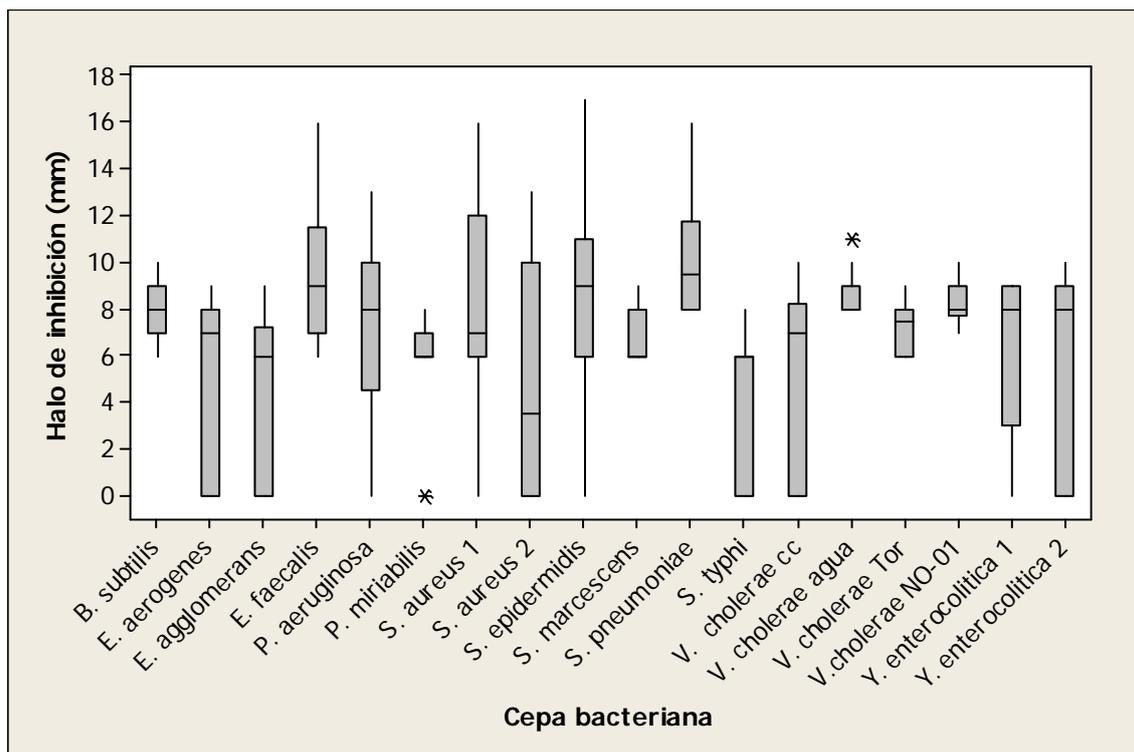


Figura 2. Halos de inhibición de las cepas bacterianas probadas en los diferentes extractos del fruto de *C. procera*.

Simbología: *S. aureus* 1: *S. aureus* ATCC 291213; *S. aureus* 2: *S. aureus* ATCC 12398; *Y. enterocolitica* 1: *Y. enterocolitica* aislada de un caso clínico donada por la CUSI-FESI y *Y. enterocolitica* 2: aislada de un caso clínico donada por el Hospital Los Ángeles

Los resultados del análisis de varianza de un factor (ANOVA) mostraron que hay diferencias significativas ($F=5.83$, $P=0$) entre los halos de inhibición de cepas bacterianas probadas en los diferentes extractos del fruto de *C. procera*.

De los seis extractos probados del fruto de *C. procera*, el extracto que mostró los mayores halos de inhibición fue el inmaduro fresco libre de compuestos no polares: F ($M_e=8.5$), mientras que el extracto con los menores halos de inhibición fue el maduro seco crudo: A ($M_e=6$) (Figura 3).

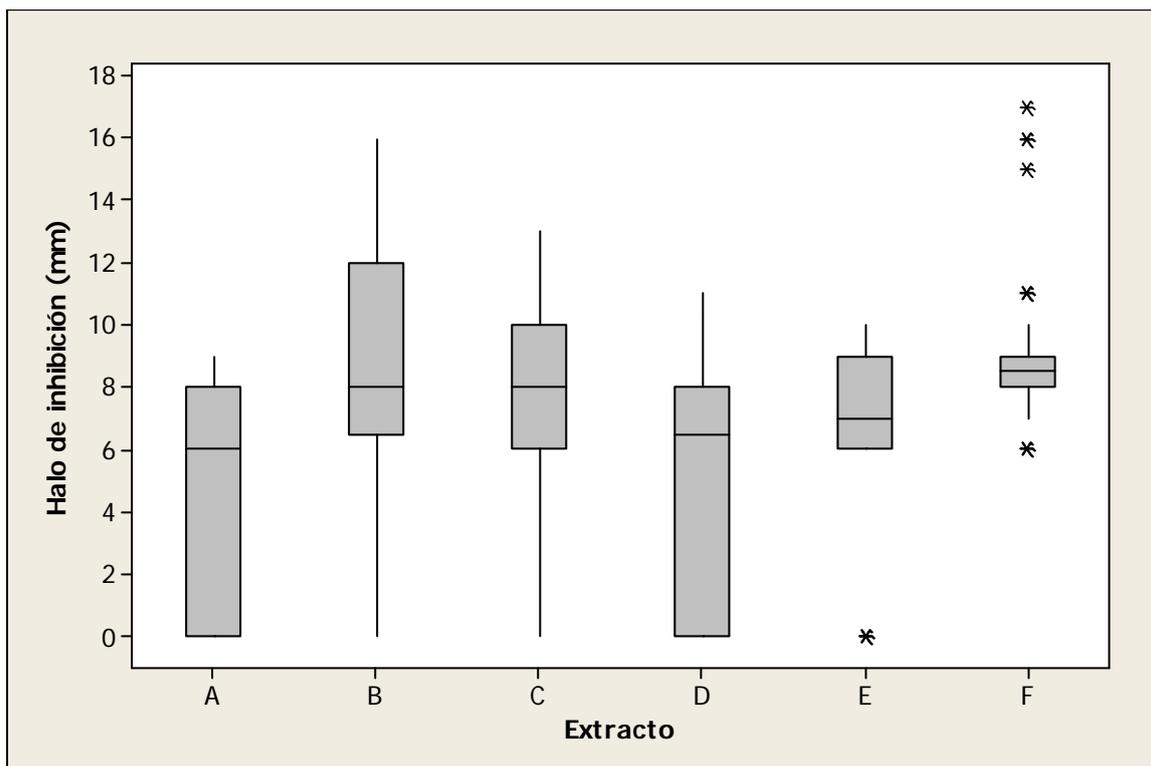


Figura 3. Halos de inhibición de los diferentes extractos del fruto de *C. procera*.

Simbología: A: maduro seco crudo; B: inmaduro seco crudo; C: inmaduro fresco crudo; D: inmaduro fresco hexánico; E: inmaduro fresco acetato de etilo; F: inmaduro fresco libre de compuestos no polares.

Los resultados del análisis de varianza de un factor (ANOVA) mostraron que hay diferencias significativas ($F=11.95$, $P=0$) entre los halos que presentan los seis diferentes extractos del fruto de *C. procera*.

El grupo bacteriano de las Gram positivas mostró los mayores halos de inhibición en los seis diferentes extractos del fruto de *C. procera*, por otro lado, el grupo de las Gram negativas mostró menor sensibilidad al presentar halos de inhibición menores para los seis diferentes extractos (Figura 4).

El grupo de bacterias Gram negativas probadas para los seis diferentes extractos mostraron que el extracto con los mayores halos de inhibición fue el extracto inmaduro fresco libre de compuestos no polares: F ($M_e=8$), mientras que los extractos con los menores halos de inhibición fueron los extractos: maduro seco crudo (A); inmaduro fresco crudo (C) así como el fruto inmaduro fresco hexánico (D, $M_e=6$) (Figura 4).

El grupo de bacterias Gram positivas probado para los seis diferentes extractos, mostró que el extracto que con los mayores halos de inhibición fue el inmaduro seco crudo: B ($M_e=12$), mientras que el extracto con los menores halos de inhibición fue el maduro seco crudo: A ($M_e=6$) (Figura 4).

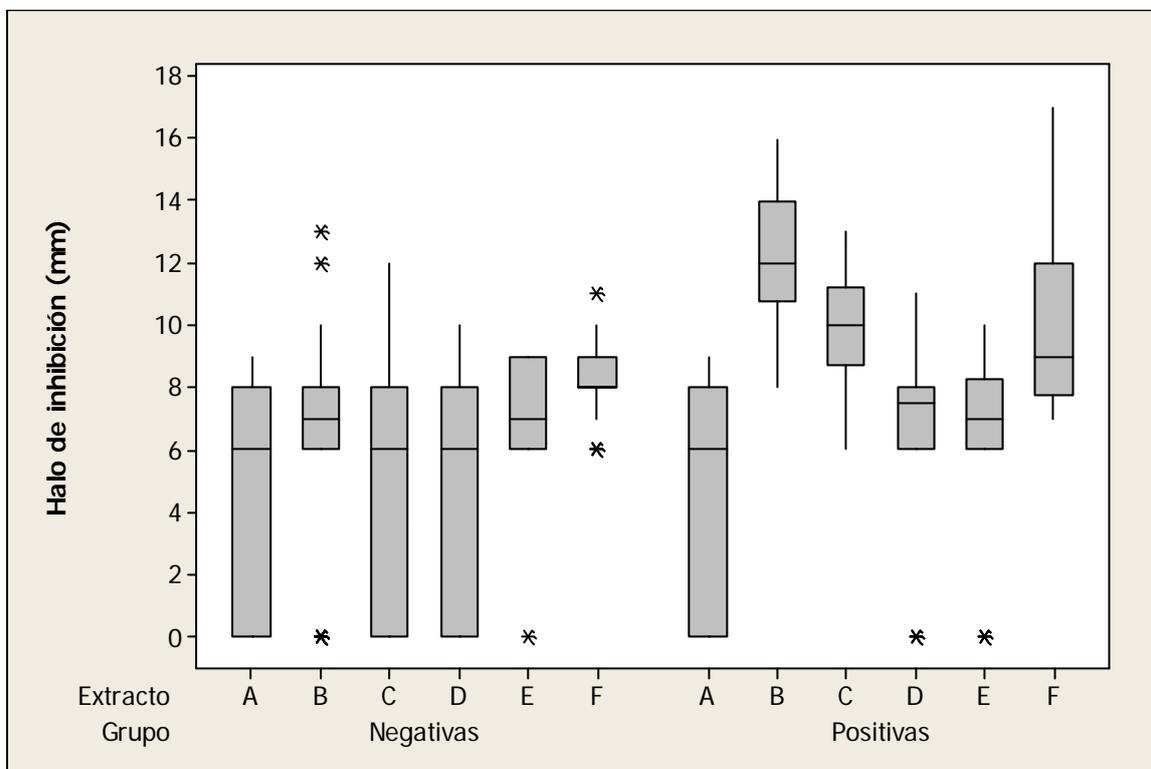


Figura 4. Halos de inhibición de los grupos bacterianos (Gram positivas, Gram negativas) y los diferentes extractos de *C. procera*.

Simbología: A: maduro seco crudo; B: inmaduro seco crudo; C: inmaduro fresco crudo; D: inmaduro fresco hexánico; E: inmaduro fresco acetato de etilo; F: inmaduro fresco libre de compuestos no polares

Los resultados del análisis de varianza de dos factores (ANOVA) muestran que hay diferencias significativas ($F=8.88$, $P=0$) entre la actividad que presentan los grupos de bacterianos frente a los extractos del fruto de *C. procera*.

EVALUACIÓN CUANTITATIVA

Los resultados obtenidos de la determinación de la CMI y CBM de cinco de los diferentes extractos del fruto de *C. procera* se muestran en el cuadro 4.

El extracto maduro seco (A) presentó a *S. neumoniae* como la bacteria más sensible (CMI=0.50mg/mL; CBM >5mg/mL), seguida por *B. subtilis* y *V. cholerae* cc con una CMI de entre 3 - 4 mg/mL y una CBM mayor a 5mg/mL aproximadamente.

La bacteria más sensible para el extracto inmaduro seco crudo (B) fue *E. faecalis* (CMI=0.25mg/mL; CBM >4mg/mL). Las bacterias *S.marcescens* y *E.agglomerans* no presentaron sensibilidad bajo ninguna de las concentraciones probadas.

Respecto al extracto inmaduro fresco (C) la bacteria más sensible fue *S. pneumoniae* al requerir bajas concentraciones para inhibir la bacteria (CMI=1mg/mL; CBM=2mg/mL), *B. subtilis* y *V. cholerae* cc (CMI=2mg/mL; CBM=4 mg/mL) respecto a la sensibilidad presentada en el resto de las bacterias que requieren concentraciones para CMI de alrededor de 4mg/mL y CBM mayor de 4mg/mL.

Para el fruto inmaduro fresco hexánico (D) las bacterias más sensibles fueron *V. cholerae* No-01 (CMI=1mg/mL; CBM=4mg/mL), *S. aureus* ATCC 12398 y *V. cholerae* cc (CMI=2mg/mL; CBM=4mg/mL) respecto a la sensibilidad presentada en el resto de las bacterias que requieren concentraciones para CMI de alrededor de 2mg/mL y CBM mayor de 4mg/mL. Sin embargo, *S. aureus* ATCC, fue la cepa que mostró la CMI más baja (0.125mg/mL). Las bacterias menos sensibles fueron *P. miriabilis*, *E. agglomerans*, *V. cholerae* *agua* y *V. cholerae* *Tor* que requieren concentraciones de 4 y mayores a 4mg/mL para CMI y CBM respectivamente.

La bacteria más sensible para el extracto inmaduro fresco libre de compuestos no polares (F) fue *V. cholerae* No-01 (CMI=0.125mg/mL; CBM=0.5mg/mL), ya que las concentraciones para inhibir su crecimiento son bajas, seguidas por *S. aureus* ATCC 12398 y *S. typhi* (CMI=0.25mg/mL; CBM>2mg/mL). Además, en general las cepas bacterianas mostraron mayor sensibilidad frente a este extracto al obtener concentraciones menores de CMI y CBM.

Cuadro 4. Determinación de CMI y CBM de los diferentes extractos del fruto de *C. procera*.

GRUPO	BACTERIA	EXTRACTOS (mg/mL)									
		A		B		C		D		F	
		CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
Gram Positivas	<i>S. aureus</i> ATCC291213	>5.00	>>5.00	4.00	>4.00	>4.00	>>4.00	0.125	>>4.00	4.00	>>4.00
	<i>E. faecalis</i>			0.25	>4.00	4.00	>>4.00	2.00	>>4.00	2.00	>>4.00
	<i>B. subtilis</i>	3.00	>>5.00	4.00	>>4.00	2.00	4.00	2.00	>>4.00	1.00	>>4.00
	<i>S. epidermidis</i>			2.00	4.00	>4.00	>>4.00	2.00	>>4.00	2.00	>>4.00
	<i>S. pneumoniae</i>	0.50	5.00	2.00	4.00	1.00	2.00	2.00	>>4.00	0.125	>>4.00
	<i>S. aureus</i> ATCC 12398			1.00	>>4.00	>4.00	>>4.00	2.00	4.00	0.25	>2.00
Gram Negativas	<i>P. mirabilis</i>			>4.00	>>4.00	>4.00	>>4.00	4.00	>>4.00	4.00	>>4.00
	<i>S. marcescens</i>			NA	NA	4.00	>>4.00	2.00	>>4.00	2.00	>>4.00
	<i>E. agglomerans</i>	5.00	>>5.00	NA	NA	>4.00	>>4.00	4.00	>>4.00	4.00	>>4.00
	<i>P. aeruginosa</i>			1.00	>4.00	>4.00	>>4.00	2.00	>>4.00	4.00	>>4.00
	<i>V. cholerae</i> agua	5.00	>>5.00	4.00	>>4.00	4.00	>>4.00	4.00	>>4.00	>4.00	>>4.00
	<i>V. cholerae</i> cc	4.00	>>5.00	4.00	>4.00	2.00	4.00	2.00	4.00	>4.00	>>4.00
	<i>V. cholerae</i> Tor			4.00	>4.00	4.00	>>4.00	4.00	>>4.00	>4.00	>>4.00
	<i>Vch</i> No-01	>5.00	>>5.00	1.00	>4.00	4.00	>>4.00	1.00	4.00	0.125	0.5
	<i>S. typhi</i>			4.00	>>4.00	>4.00	>>4.00	2.00	>>4.00	0.25	>2.00
	<i>E. aerogenes</i>	>5.00	>>5.00							4.00	>>4.00

A: maduro seco crudo; B: inmaduro seco crudo; C: inmaduro fresco crudo; D: inmaduro fresco hexánico; F: inmaduro fresco libre de compuestos no polares. El extracto E: inmaduro fresco acetato de etilo no fue probado para este ensayo debido al poco rendimiento que se obtuvo.

Actividad del extracto del fruto inmaduro fresco libre de compuestos no polares (F) sobre la curva de crecimiento bacteriano.

El efecto del extracto del fruto fresco inmaduro libre de compuestos no polares (F) sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* ATCC 12398 y *V.cholerae* No-01 se observa en las figuras 5 y 6 respectivamente; el efecto es bacteriostático en *S. aureus* ATCC 12398 aplicando una concentración de 0.175 mg/mL, ya que el crecimiento bacteriano se ve disminuido, sin embargo; con las concentraciones de 0.25 mg/mL y 4.0 mg/mL el efecto es bactericida al verse inhibido el crecimiento bacteriano por completo a partir de las 12 y 8 horas respectivamente. En el caso de *V.cholerae* No-01 el efecto es bacteriostático para las tres concentraciones probadas. Sin embargo; en la concentración 0.625 mg/mL la población se ve disminuida a las 12 horas de exposición.

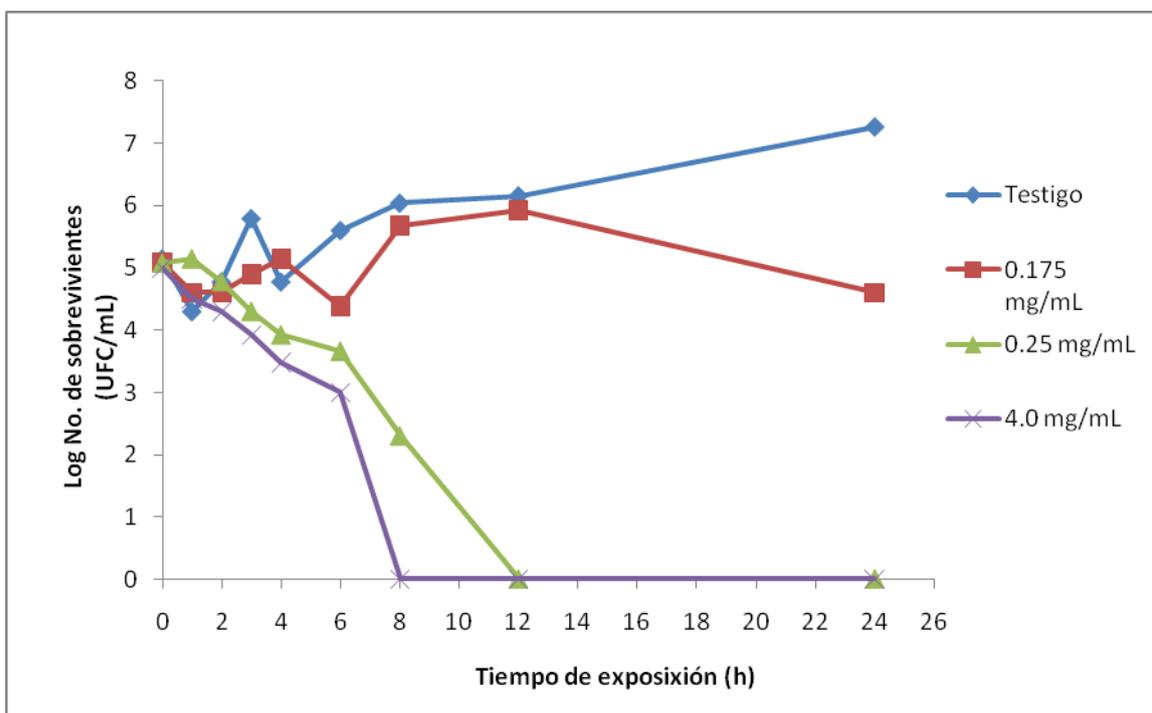


Figura 5. Actividad del extracto del fruto inmaduro fresco libre de compuestos no polares (F) sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* ATCC 12398.

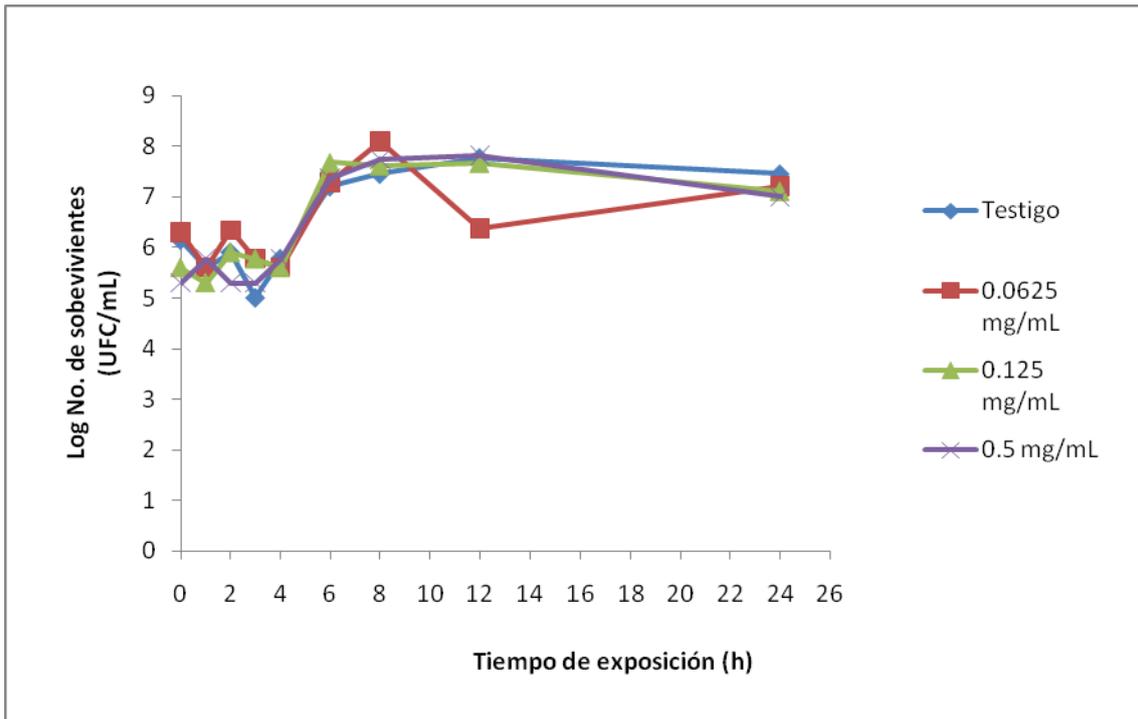


Figura 6. Actividad del extracto del fruto inmaduro fresco libre de compuestos no polares (F) sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* No-01.

Toxicidad

Los resultados sobre el porcentaje de muerte de *Artemia salina* de los diferentes extractos del fruto de *C. procera* se observa en el cuadro 5 donde cinco extractos resultaron ser fuertemente tóxicos (A, C, D, E y F), mientras que el extracto inmaduro seco crudo (B) presentó un toxicidad moderada.

Cuadro 5. Toxicidad general de los diferentes extractos del fruto de *C.procera* sobre *Artemia salina*.

EXTRACTO	ECUACIÓN	R ²	CL ₅₀ (µg/mL)	Grado de Toxicidad
A	$1/Y = 0.3074 (1/x) + (0.0129)$	0.97	43.29	Fuerte
B	$\ln Y = 2.55 + 0.2843 (\ln x)$	0.95	119.54	Moderada
C	$1/Y = 0.1990 (1/x) + (0.0094)$	0.99	18.77	Fuerte
D	$1/Y = 14.6168 (1/x) + (- 0.1587)$	0.80	83.83	Fuerte
E	$1/Y = 0.1051(1/x) + (0.0094)$	0.99	9.95	Fuerte
F	$1/Y = 0.3903 (1/x) + (0.0111)$	0.99	43.93	Fuerte

A: maduro seco crudo; B: inmaduro seco crudo; C: inmaduro fresco crudo; D: inmaduro fresco hexánico; E: inmaduro fresco acetato de etilo; F: inmaduro fresco libre de compuestos no polares.

Actividad antioxidante

Los valores de la actividad antioxidante de los diferentes extractos del fruto de *C. procera* se muestran en el cuadro 6. El extracto del fruto de *C. procera* que presentó la mejor actividad antioxidante fue el extracto del fruto inmaduro fresco crudo (C) con una concentración de 45.15 µg/mL debido a que se necesita una menor concentración del extracto para reducir el DPPH• respecto a los demás extractos.

Cuadro 6. Actividad antioxidante de los diferentes extractos del fruto de *C. procera*.

EXTRACTO	ECUACIÓN	R ²	CA ₅₀ (µg/mL)
Catequina	$Y = 20.019x + 4.236$	0.997	2.28
B	$Y = 0.8472x + 2.3284$	0.986	56.26
C	$Y = 0.7912x + 14.285$	0.979	45.14
F	$Y = 0.9548x^{0.9951}$	0.949	53.34

B: inmaduro seco crudo; C: inmaduro fresco crudo; F: inmaduro fresco libre de compuestos no polares.

*Catequina: Antioxidante de referencia

*Los extractos D: inmaduro fresco hexánico y E: inmaduro fresco acetato de etilo no fueron probados en este ensayo debido al poco rendimiento que se obtuvo.

Detección de metabolitos secundarios

De acuerdo a las pruebas cualitativas hechas a los extractos: A, B, C y F resultaron ser positivos para cloruro férrico (presencia de fenoles), así como para agar sangre (presencia de taninos). Para Dragendorff y Mayer que detectan presencia de alcaloides la prueba dio negativo.

Cromatografía líquida de alta resolución

Este análisis es muy importante en el estudio de los componentes químicos de las plantas, y debe ser tratado como tema principal en un trabajo posterior. En este caso se consideró un complemento del estudio principal y se abordó en forma preliminar.

La cromatografía se realizó solo a cuatro de los seis extractos: A, B, C y F (Figura 7, 8, 9 y 10) debido al poco rendimiento que se tuvo de los demás. Entre los compuestos solo se pudieron reconocer dos grupos de los compuestos fenólicos: fenoles y flavonoides, en los cromatogramas de las muestras se observan compuestos fenólicos que tienen características similares (tiempo de retención, forma y espectros de absorción) lo que podría indicar que algunas de las moléculas están presentes en ambos estados de madurez (Cuadro 7).

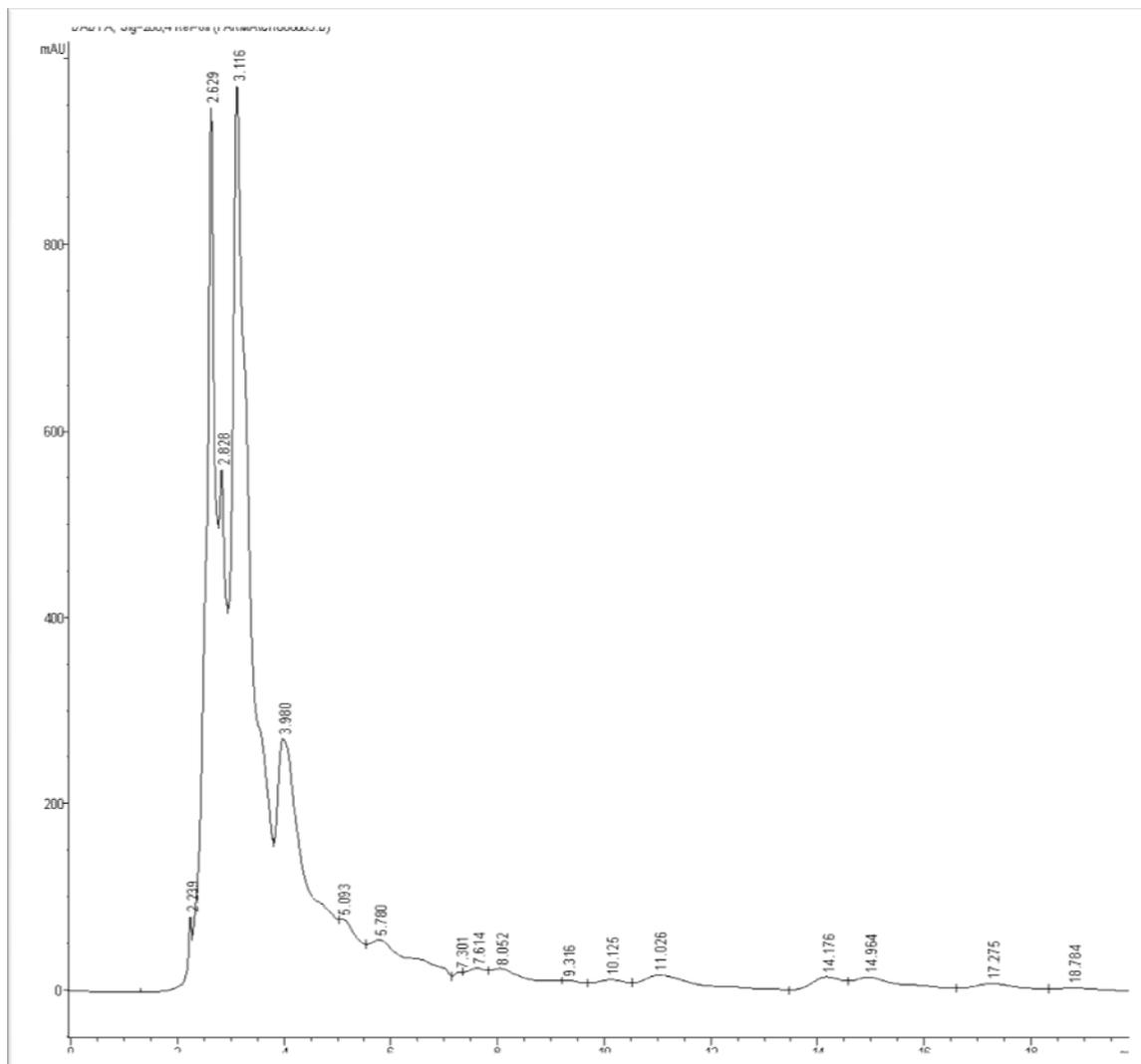


Figura 7. Cromatograma del extracto A (maduro seco crudo) del fruto de *C. procera*.

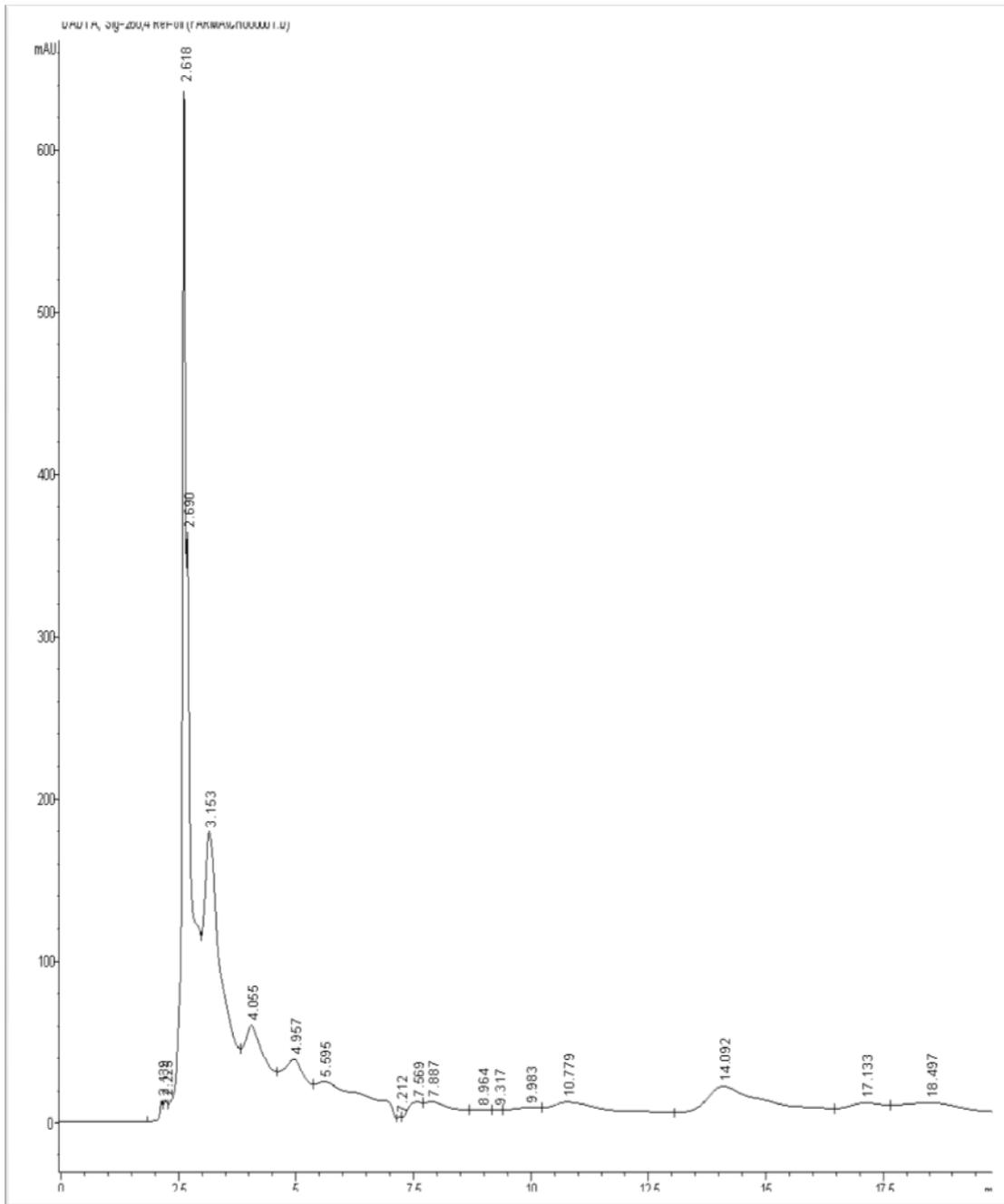


Figura 8. Cromatograma del extracto B (imaduro seco crudo) del fruto de *C. procera*.

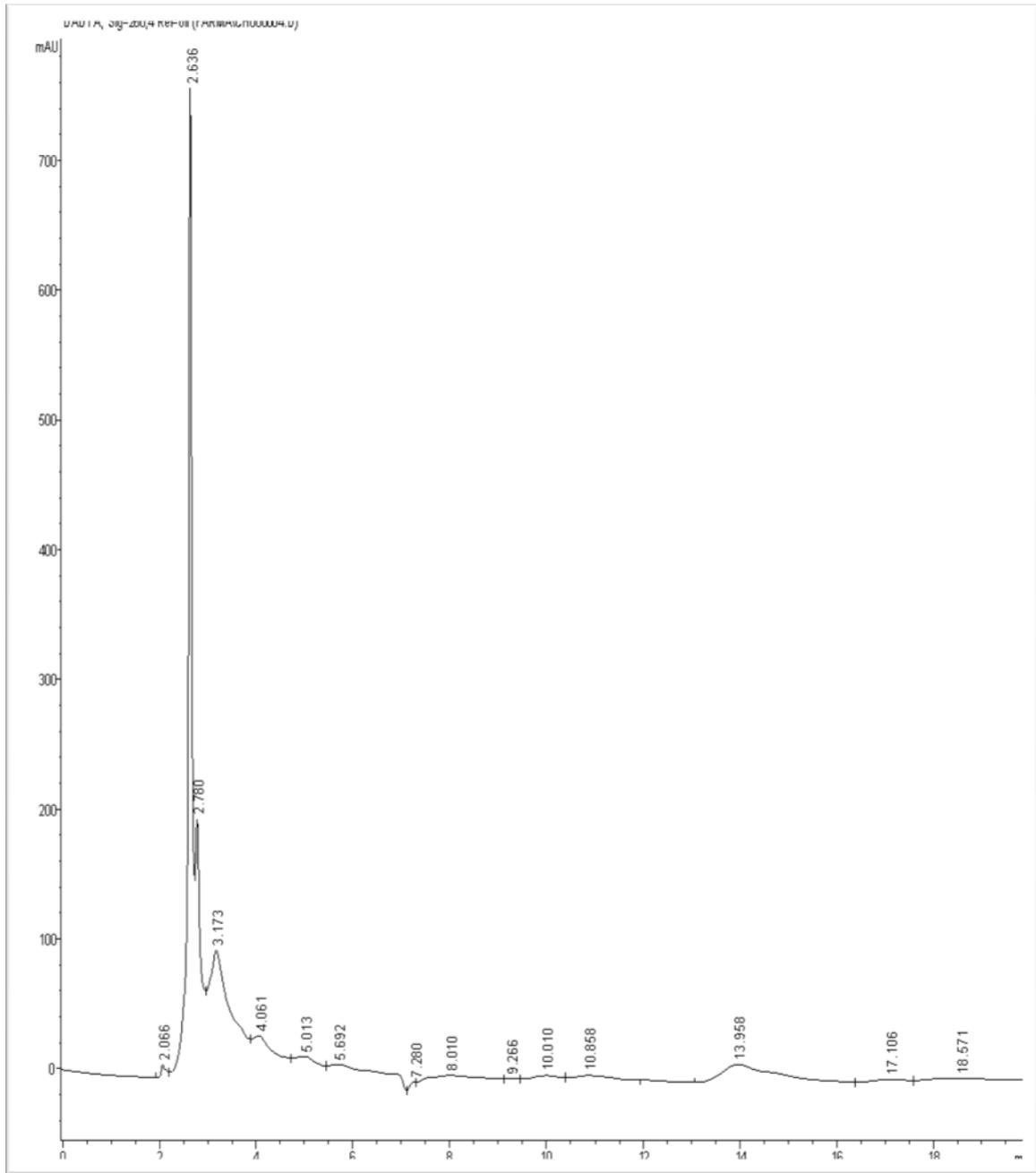


Figura 9. Cromatograma del extracto C (imaduro fresco crudo) del fruto de *C. procera*.

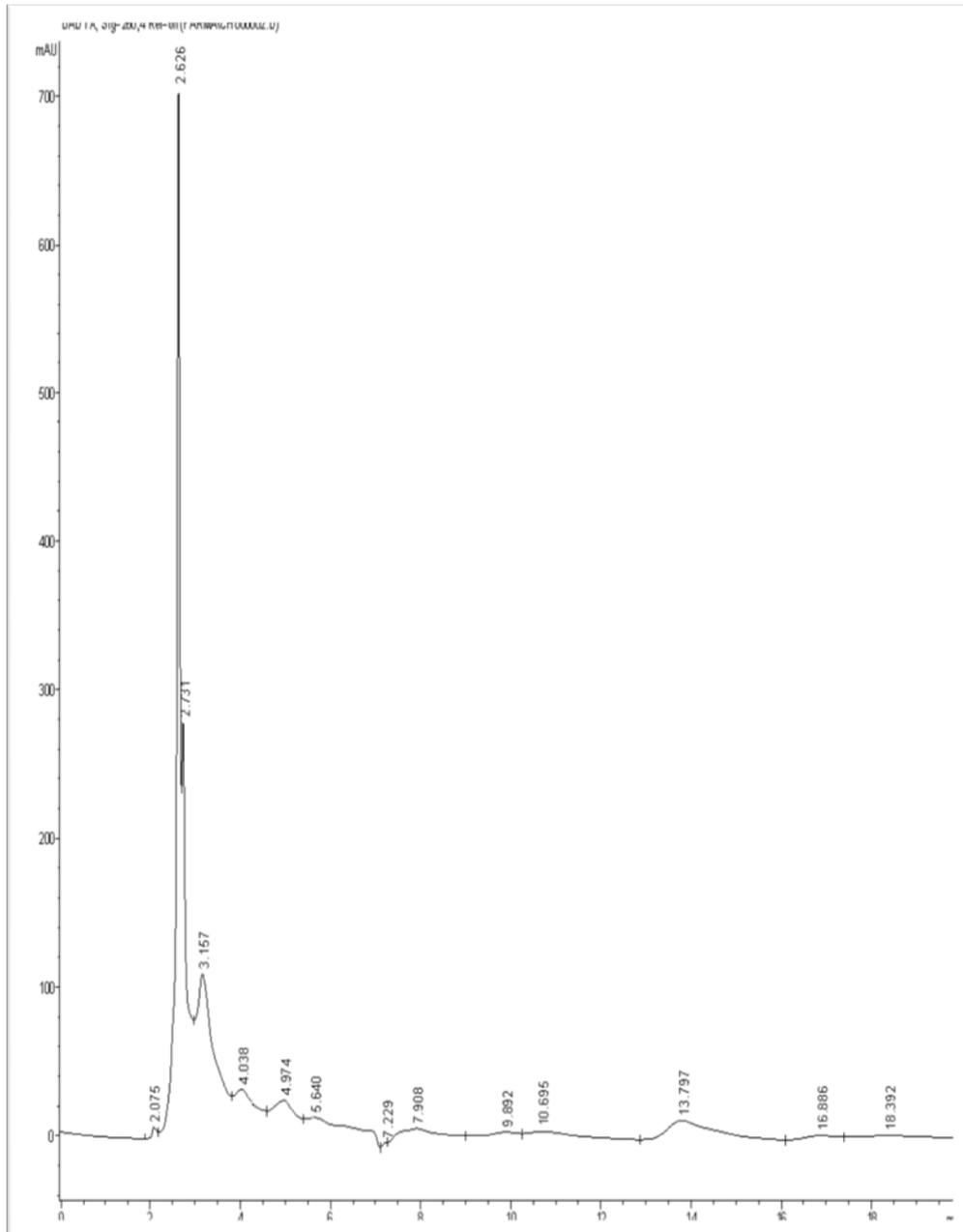


Figura 10. Cromatograma del extracto F (inmaduro fresco libre de compuestos no polares) del fruto de *C. procera*.

Cuadro 7. Tiempo de retención y UV $\lambda_{\text{máx}}$ de los compuestos de los extractos del fruto de *C. procera*.

Extr acto	Tiempo de retención (min.)	UV $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Comp uesto
A	2.629,2.828,3.116,3.980,5.093,5.780,7.301,7. 614,8.052,9.316,10.125,11.026.	274,274,272,282,284,268,28 4,272,274,278,276,264.	Fenol
	14.176,14.964,17.275.18.184.	268-354,266-346,270- 344,274-342.	Flavon oide
B	2.618,2.690,3.153,4.055,4.975,5.595,7.212,7. 569,7.887,8.964,9.317,9.983,10.779.	276,276,274,264,274,272,28 8,262- 280,264,276,276,266,256.	Fenol
	14.092,17.133,18.497.	266-356,270-354,268-354.	Flavon oide
C	2.636,2.780,3.173,4.061,5.013,5.692,7.280,8. 010,9.266,10.010,10.858.	280,276,276,278,278,278,28 6,282,280,278,280.	Fenol
	13.958.	272-362.	Flavon oide
F	2.626,2.731,3.157,4.038,4.974,5.640,7.229,7. 908,9.892,10.695.	278,276,274,278,276,274,28 8,276,276,276.	Fenol
	13.797,16.886,16.392	268-358,272-360,270-360.	Flavon oide

A: maduro seco crudo; B: inmaduro seco crudo; C: inmaduro fresco crudo y F: inmaduro fresco libre de compuestos no polare. Los tiempos de retención y la $\lambda_{\text{máx}}$ se corresponden en el orden de aparición.

■ HOJAS

Colecta de la planta

Las hojas del árbol de *C. procera* fueron colectadas durante el mes de Noviembre del 2009 en la localidad de San Rafael, Coxcatlán, Puebla.

Rendimiento del extracto

El rendimiento de los diferentes extractos de las hojas de *C. procera* se observa en el cuadro 8. El extracto metanólico crudo (H1) tuvo un rendimiento de 6.8%. La partición a partir de H1 que tuvo el mayor rendimiento fue el metanólico libre de compuestos no polares (H4 = 2.20%).

Cuadro 8. Rendimiento de los diferentes extractos de la hoja de *C. procera*.

Extractos	Peso(g)	%
H1	17.73	6.8
H2	5.15	1.98
H3	0.43	0.16
H4	5.73	2.20

H1: hojas crudo; H2: hojas hexano; H3: hojas acetato de etilo; H4: hojas libre de compuestos no polares (respecto a 260g de hoja secas).

Actividad Antibacteriana

EVALUACIÓN CUALITATIVA

Ningún de los extractos presentó actividad frente a las 20 cepas probadas pues no exhibieron halos de inhibición. Únicamente en el extracto H1: hojas crudo, fue donde se observaron halos de inhibición que no estaban bien definidos, es decir, sólo se observó una reducción en el crecimiento de la población bacteriana (Cuadro 9).

Cuadro 9. Halos de inhibición del extracto crudo (H1) de las hojas de *C. procera*.

GRUPO	BACTERIA	HALOS DE INHIBICIÓN H1 (mm)
Gram Positivas	<i>S. aureus</i> ATCC 291213	8.0±0.0
	<i>E. faecalis</i>	8.3±0.6
	<i>B. subtilis</i>	7.3±0.6
	<i>S. epidermidis</i>	10.0±0.0
	<i>S. pneumoniae</i>	8.0±0.0
	<i>S. aureus</i> ATCC 12398	11.0±0.0
Gram Negativas	<i>P. mirabilis</i>	8.7±0.6
	<i>S. marcescens</i>	13.0±0.0
	<i>E. agglomerans</i>	N.A
	<i>P. aeruginosa</i>	7.7±0.6
	<i>V. cholerae</i> agua	N.A
	<i>V. cholerae</i> cc	10.6±0.6
	<i>V. cholerae</i> Tor	11.0±0.0
	<i>Vch</i> No-01	7.0±0.0
	<i>S. typhi</i>	7.7±0.6
	<i>E. aerogenes</i>	10.0±0.0
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	10.0±0.0
	<i>E. coli</i> ATCC 53218	9.0±0.0
	<i>Y. enterocolitica</i> Ángeles	8.0±0.0
	<i>Y. enterocolitica</i> CUSI	9.0±0.0

N.A: no activo. Halos de inhibición no bien definidos.

EVALUACIÓN CUANTITATIVA

Se calculó CMI y CBM del extracto crudo de la hoja (H1), se probaron seis diferentes concentraciones de 1 hasta 6mg/mL, los resultados se observan en el Cuadro 10. Las bacterias que obtuvieron los valores más bajos de CMI y CBM fueron las Gram positivas, por lo cual fueron las más sensibles.

Cuadro 10. Determinación de CMI y CBM del extracto crudo (H1) de la hoja de *C. procera*.

GRUPO	BACTERIA	EXTRACTO (mg/mL)	
		CMI	CBM
Gram Positivas	<i>S. aureus</i> ATCC291213	6.00	>6.00
	<i>E. feacalis</i>	3.00	4.00
	<i>B. subtilis</i>	2.00	3.00
	<i>S. epidermidis</i>	4.00	6.00
	<i>S. pneumoniae</i>	3.00	4.00
	<i>S. aureus</i> ATCC 12398	6.00	>6.00
Gram Negativas	<i>P. mirabilis</i>	6.00	>6.00
	<i>Y. enterocolitica</i> Ángeles	6.00	>6.00
	<i>Y. enterocolitica</i> CUSI	6.00	>6.00
	<i>V. cholerae</i> cc	5.00	6.00
	<i>V. cholerae</i> Tor	5.00	6.00
	<i>S. typhi</i>	6.00	>6.00
	<i>E. aerogenes</i>	6.00	>6.00

Toxicidad

Los resultados sobre el porcentaje de muerte de *Artemia salina* de los diferentes extractos de la hoja de *C. procera* se observa en el Cuadro 11. Tres de los cuatro extractos probados resultaron ser fuertemente tóxicos con excepción del extracto libre de compuestos no polares (H4) que presentó una toxicidad moderada.

Cuadro 11. Toxicidad general de los diferentes extractos de las hojas de *C. procera* sobre *Artemia salina*.

EXTRACTO	ECUACIÓN	R ²	CL ₅₀ (µg/mL)	Grado de toxicidad
H1	$1/Y = 0.0577 (1/x) + (0.0098)$	0.9988	5.68	Fuerte
H2	$1/Y = 0.6273 (1/x) + (0.0104)$	0.9764	6.56	Fuerte
H3	$1/Y = 0.0196 (1/x) + (0.0100)$	0.9876	1.96	Fuerte
H4	$50+50 = 19.543(LN*x)$	0.9643	166.82	Moderada

H1: hojas crudo; H2: hojas hexáno; H3: hojas acetato de etilo; H4: hojas libre de compuestos no polares.

Actividad antioxidante

Los valores de la actividad antioxidante de los diferentes extractos de la hoja de *C. procera* se muestran en el cuadro 12. El extracto de la hoja de *C. procera* que presentó la mejor actividad antioxidante fue el libre de compuestos no polares (H4) con una concentración de 6.60 µg/mL debido a que necesita una menor concentración para reducir el DPPH• respecto a los demás extractos.

Cuadro 12. Actividad antioxidante de los diferentes extractos de las hojas de *C. procera*

EXTRACTO	ECUACIÓN	R ₂	AC ₅₀ (µg/mL)
Catequina	Y = 20.019x + 4.236	0.997	2.28
H1	Y = 2.2135x + 13.04	0.857	16.67
H3	Y = 2.5377x + 3.321	0.983	18.39
H4	Y = 4.5994x ^{1.2634}	0.977	6.60

H1: hojas crudo; H3: hojas acetato de etilo; H4: hojas libre de compuestos no polares
 *Catequina: Antioxidante de referencia.

Detección de metabolitos secundarios

De acuerdo a las pruebas cualitativas hechas al extracto H1 (al presentar una reducción en el crecimiento de la población bacteriana) resultaron ser positivos para cloruro férrico (presencia de fenoles). Para Dragendorff y Mayer que detectan presencia de alcaloides la prueba dio negativo.

Cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realizó con el extracto H1 el cual resultó tener: 1) flavonoides y 2) fenoles (Figura 11).

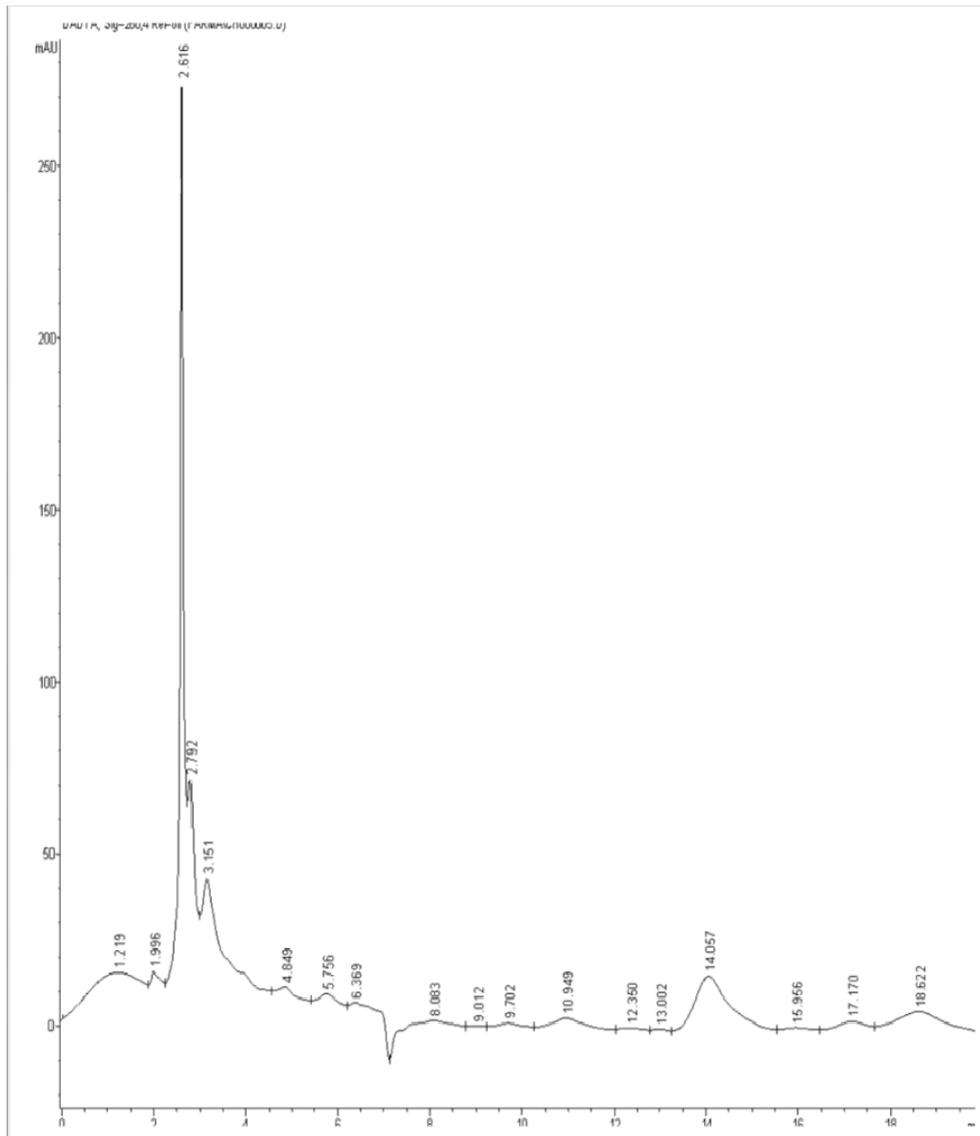


Figura 11. Cromatograma del extracto H1 (Hojas crudo) de *C. procera*.

Cuadro 13. Tiempo de retención y UV $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ de los compuestos del extracto H1 de *C. procera*.

Extracto	Tiempo de retención (min.)	UV $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ (nm)	Compuesto
H1	2.616,2.792,3.151,4.849,5.756, 6.369,8.083,9.012,9.702,10.94 9.	278,272,272,276,272,274,278,278,276,276.	Fenol
	12.350,14.057,15.956.	266-354,272-358,268-354.	Flavonoide

H1: hojas crudo, los tiempos de retención y el $\lambda_{\text{m\acute{a}x}}$ se corresponden en el orden de aparición

DISCUSIÓN

Con la finalidad de controlar ciertos padecimientos, entre ellos los infecciosos, el hombre ha utilizado a las plantas para la elaboración de medicamentos. Las plantas constituyen una fuente natural en la búsqueda de compuestos con actividad farmacológica. Mediante técnicas microbiológicas se ha demostrado que una gran cantidad de extractos y compuestos provenientes de plantas tienen actividad sobre microorganismos asociados a enfermedades infecciosas (Mukhlesur *et al.*, 2005; Prashanthe *et al.*, 2006).

El fruto de *C. procera* relata Francisco Hernández (S. XVI) “es muy astringente y destila una baba sumamente glutinosa; ésta, untada, cura las fiebres, se administra contra las disenterías y las diarreas”. Mientras que para el siglo XX Maximino Martínez lo menciona como eficaz contra la lepra (Argueta y Cano, 1994). Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado dentro de la medicina tradicional, pues se encontró que el fruto tanto maduro como inmaduro presenta actividad antibacteriana, por lo que, el presente trabajo valida el uso medicinal tradicional del fruto de esta especie.

FRUTO

Rendimiento de los extractos

Respecto al rendimiento de los seis diferentes extractos probados del fruto de *C. procera*, el mayor rendimiento se obtuvo del extracto inmaduro seco (B) con 43.26% (Cuadro 2), debido en parte al menor contenido de humedad. Además, esto puede indicar en primera instancia la presencia de una mayor cantidad de compuestos de naturaleza polar o de polaridad media comparados con el porcentaje obtenido de los otros extractos. También, que la concentración de éstos varía dependiendo el grado de maduración del fruto, debido a que la maduración de los frutos se caracteriza por una serie de transformaciones químicas que determinan los cambios de sabor, color, consistencia y aroma. Las sustancias acumuladas durante el desarrollo se transforman de manera

lenta y progresiva hasta que el fruto alcanza las condiciones de aroma y jugosidad que permiten clasificarlo como maduro (Madrigal, 2009).

Actividad antibacteriana

EVALUACIÓN CUALITATIVA

En México las infecciones bacterianas son uno de los principales problemas de salud y el surgimiento de bacterias resistentes a antibióticos ha complicado el panorama. Lo anterior ha incentivado el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Esto aunado al interés (en décadas recientes) en la medicina tradicional como alternativa terapéutica, ha originado que la búsqueda de compuestos antibacterianos en plantas medicinales se haga más intensa (Camacho *et al.*, 2001).

De acuerdo a los resultados de la actividad antibacteriana realizados en este estudio (veinte cepas), seis bacterias Gram positivas mostraron sensibilidad para todos los extractos, mientras que de las catorce cepas del grupo Gram negativas, *E. coli* no mostró sensibilidad frente a ninguno de los extractos (Cuadro 3). La evaluación de la actividad antibacteriana de los seis extractos de *C. procera* mostró que el grupo bacteriano de las Gram positivas ($M_e=8$) tuvo mayores halos de inhibición comparado con el grupo bacteriano Gram negativas ($M_e=7$) (Figura 1).

El análisis de varianza de un factor (ANOVA) mostró que hay diferencias significativas ($F=23.35$, $P=0$) entre la sensibilidad de los grupos bacterianos Gram positivas y Gram negativas al aplicarles los seis diferentes extractos del fruto de *C. procera*.

Los resultados anteriores probablemente se deban a las diferencias estructurales y composición de los diferentes grupos bacterianos y a la susceptibilidad de cada cepa al extracto probado, debido a que los péptido glucanos en el caso de las bacterias Gram positivas se encuentran dentro de una matriz compuesta de ácidos teicoicos, teicurónicos y lipoteicos; lo cual le confiere a la pared celular una carga negativa neta, necesaria para que la

célula asimile cationes divalentes; esta característica la hace más sensible a los compuestos polares, a diferencia de las Gram negativas en donde estructuralmente presenta una membrana más resistente a los disolventes orgánicos y menos permeable a las moléculas de carácter hidrofóbico (Cimanga *et al.*, 2002; Gros *et al.*, 1985; Nikaido y Nakae, 1979).

Además, los principales problemas de resistencia detectados en América Latina lo producen las bacterias Gram negativas, principalmente los bacilos no fermentadores como *Pseudomonas* sp. y *Acinetobacter* sp. (resistencia a carbapenem), *Escherichia* sp. y *Klebsiella* sp. (altas tasas de resistencia a β -lactámicos y con producción de β -lactamasa de espectro extendido), *Enterobacter* sp. y otras enterobacterias como *Serratia* sp. y *Citrobacter* sp. (productoras de β -lactamasas cromosómicas inducibles) (Zampini *et al.*, 2007).

De las veinte cepas bacterianas la que presentó los halos de mayor diámetro ante los seis diferentes extractos fue *S. pneumoniae* ($M_e=9.5$) y es que se sabe que de manera natural dentro del tracto respiratorio superior y digestivo del hombre existe gran cantidad de bacterias que no causan ninguna enfermedad como es el caso de *S. pneumoniae*, sin embargo, cuando la persona se encuentra inmunodeprimida, alguno de estos organismos puede ser oportunista y ocasionar enfermedades (Chart, 2002). Probablemente lo antes mencionado sea la causa de la dimensión de los halos observados.

Por su parte *S. pneumoniae* es un microorganismo patógeno que puede causar infecciones menores (otitis media aguda y sinusitis), o invasoras severas (neumonía, meningitis, septicemia, fiebre, más raramente artritis, peritonitis) principalmente en ancianos, niños y personas inmunodeprimidas (Ruvinsky, 2001; Foster, 2000).

La gran variedad de trastornos gastrointestinales de origen infeccioso son generalmente causados por bacterias Gram negativas como *Vibrio cholerae* y las *Salmonellas* que se manifiestan con diarreas, vómitos y deshidrataciones (Chart, 2002; Foster, 2000; Mims *et al.*, 1999).

Las bacterias Gram negativas que mostraron los menores halos de inhibición frente a los diferentes extractos fueron *E. agglomerans*, *S. marcescens* y *S. typhi* ($M_e=6$) (Figura 2). Los resultados del análisis de varianza de un factor (ANOVA) mostraron que hay diferencias significativas ($F=5.83$, $P=0$) entre los halos de inhibición de las cepas bacterianas probadas frente a los diferentes extractos del fruto de *C. procera*.

De los seis extractos probados del fruto de *C. procera*, el extracto que mostró los mayores halos de inhibición fue el inmaduro fresco libre de compuestos no polares (F , $M_e=8.5$), mientras que el extracto con los menores halos de inhibición fue el maduro seco crudo (A, $M_e=6$) (Figura 3). Los resultados del análisis de varianza de un factor (ANOVA) mostraron que hay diferencias significativas ($F=11.95$, $P=0$) entre los halos que presentan los seis diferentes extractos del fruto de *C. procera*.

La actividad del extracto (F) frente a las 20 cepas probadas puede atribuirse a que en su composición química los metabolitos secundarios son de naturaleza polar o de polaridad intermedia (Toledo *et al.*, 2008). Lo anterior fue corroborado con la cromatografía HPLC realizada en este estudio, donde se obtuvieron la presencia de flavonoides, así como fenoles a los que se les pueden atribuir dicha actividad pues es sabido que los compuestos fenólicos contribuyen a la salubridad alimentaria debido a sus propiedades antibacterianas. Así, se ha constatado que los polifenoles son más eficaces sobre las bacterias Gram positivas que sobre las Gram negativas, las formas aglicosiladas son más activas en la inhibición del crecimiento microbiano que sus correspondientes formas glicosiladas, las quinonas tienen más actividad antibacteriana que las formas no oxidadas, y la presencia de grupos $-OH$ libre en posición C5 o C7 del anillo A de los flavonoides favorece el poder antibacteriano de los mismos (Pérez, 2003a).

Respecto a la diferencias de la actividad antibacteriana presentada en los diferentes estados de maduración Barberán y Espín (2001) mencionan que cuando se examina el contenido fenólico de especies frutales, se admite que los factores genéticos y ambientales son responsables de la variación en la

distribución cualitativa, mientras que la variación cuantitativa se debe a la variedad, estado de madurez y también a las condiciones ambientales.

El grupo bacteriano de las Gram positivas mostró los mayores halos de inhibición en los seis diferentes extractos del fruto de *C. procera*, por otro lado, el grupo de las Gram negativas mostró menor sensibilidad al presentar halos de inhibición menores para los seis diferentes extractos (Figura 4).

El grupo de bacterias Gram negativas probadas para los seis diferentes extractos mostraron que el extracto con los mayores halos de inhibición fue el extracto inmaduro fresco libre de compuestos no polares (F, $M_e=8$), mientras que los extractos con los menores halos de inhibición fueron los extractos maduro seco crudo (A), inmaduro fresco crudo (C) así como el fruto inmaduro fresco hexánico (D $M_e=6$) (Figura 4). El grupo de bacterias Gram positivas probado para los seis diferentes extractos, mostró al extracto B como el extracto con los mayores halos de inhibición ($M_e=12$), mientras que el extracto con los menores halos de inhibición fue el maduro seco crudo (A, $M_e=6$) (Figura 4). El comportamiento anterior de los grupos bacterianos frente a los extractos puede atribuirse como anteriormente se menciona, a la presencia de polifenoles que los cuales tienen una mayor eficacia sobre las bacterias Gram positivas.

Los resultados del análisis de varianza de dos factores (ANOVA) muestran que hay diferencias significativas ($F=8.88$, $P=0$) entre la actividad que presentan los grupos de bacterianos frente a los extractos del fruto de *C. procera*.

Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado para la actividad antibacteriana, antimicrobiana e incluso la actividad antiparasitaria de los demás miembros de la familia Anacardiaceae. La actividad farmacológica de *Schinus polygamus* (Erazo *et al.*, 2006), incluso actividad insecticida de los extractos de hojas y frutos *S. molle* (Ferrero, *et al.*, 2007).

Cabe mencionar que otros de los estudios de la familia Anacardiaceae, aunque realizados con aceites han resultado tener una fuerte actividad antibacteriana.

Tal es el caso del aceite obtenido de diferentes partes de la planta de *Schinus polygamus* (Erazo *et al.*, 2006) o como el estudio realizado por Kubo *et al.*, 2006 que demostró la efectividad del aceite del fruto del marañón (*Anacardium occidentale* L.) que contiene ácidos anacárdicos, mismos que les confieren actividad antioxidante y antimicrobiana con una potente actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas. Probablemente estudios posteriores podrían dilucidar si el extracto o aceite no solo del fruto sino de la semilla de *C. procera* pudieran contener este tipo de compuestos.

EVALUACIÓN CUANTITATIVA

Los resultados cualitativos de la actividad antibacteriana, se confirmaron al obtener los valores de CMI y CBM (Cuadro 4). En la determinación de CMI y CBM el extracto F presentó la mayor actividad principalmente frente al grupo de las Gram positivas. El extracto F (inmaduro fresco libre de compuestos no polares) alcanzó CMI de hasta 0.125 mg/mL y CBM por arriba de 4mg/mL.

El extracto menos activo fue el A (maduro seco crudo) al presentar para la mayoría de las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas una CMI de entre 4 y arriba de 5mg/mL y CBM mayores de 5mg/mL.

Esta evaluación demostró nuevamente que las bacterias Gram positivas son las más sensibles es decir, que obtuvieron menores concentraciones en la medición para CMI en los cinco extractos, y aunado a lo anterior, al menos una bacteria Gram positiva (*S. pneumoniae*) presentó la mayor susceptibilidad respecto a las demás cepas evaluadas en cada uno de los extractos.

Las bacterias con mayor sensibilidad (con valores más bajos de CMI y de CBM) fueron: *S. pneumoniae* (extracto A (CMI=0.5mg/mL; CBM=5.0mg/mL) y C(CMI=1.0mg/mL; CBM=2.0mg/mL), *B. subtilis* (extracto A (CMI=3.0mg/mL; CBM >>5.0mg/mL) y C (CMI=2.0mg/mL; CBM=4.0mg/mL), *E. faecalis* (extracto B (CMI=0.25mg/mL; CBM>4.0mg/mL), *S. aureus* (extractos F(CMI=0.25mg/mL; CBM>2.0mg/mL) y D (CMI=0.125mg/mL; CBM>4.0mg/mL) todas ellas Gram positivas.

La mayoría de las bacterias Gram negativas fueron menos susceptibles, con excepción de *V. cholerae* cc (extractos A (CMI=4.0mg/mL; CBM>5.0mg/mL), C (CMI=2.0mg/mL;CBM=4.0mg/mL),D(CMI=2.0mg/mL;CBM=4.0mg/mL), *V. cholerae* No-01(extractos D(CMI=1.0mg/mL; CBM=4.0mg/mL) y F (CMI=0.125mg/mL; CBM=0.5mg/mL) y *S. typhi* (extractos F (CMI=0.25mg/mL; CBM>2.0mg/mL).

Los resultados de la presente investigación son respaldados por estudios que demuestran que los frutos comestibles combaten bacterias patógenas y son usados en la medicina tradicional para aliviar diversas enfermedades infecciosas. Ejemplo de ello es el estudio que hizo Paula y Martins (2000) quienes comprueban la acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de tallos, hojas y frutos de la mora (*Rubus urticaefolius*), obteniendo que la parte con la mayor acción antibacteriana es la del fruto y dentro de las cepas más sensibles al extracto encuentran a *B. subtilis*, *E.coli*, *Proteus miriabilis*, *Pseudomona aeruginosa* y *S. aureus*. Otro ejemplo es el estudio llevado a cabo por Mohanty y Cock en el 2009 donde evaluaron la actividad antibacteriana y toxicidad general del extracto metanólico del fruto de *Myrciaria cauliflora* en donde reportan que el extracto tiene una mayor actividad frente a bacterias Gram-positivas que a las Gram Negativas.

También está la investigación realizada por Camacho *et al.* (2001) quienes evalúan el potencial antibacteriano de extractos metanólicos de los frutos de siete especies silvestres del estado de Sinaloa: aguama (*Bromelia pinguin* L.), nanchi (*Byrsonimia crassifolia* L.), ayale (*Crescentia alata* H.B.K.), pingüica (*Ehretia tinifolia*), arrayán (*Psidium sartorianum*), guamúchil (*Pithecellobium dulce* (Roxb) Benth) y papache (*Randia echinocarpa* Moc et sess.) utilizados en la medicina tradicional en México, además de ser consumidos como alimento. De esta forma Camacho *et al.* (2001) concluyen que los extractos de aguama, nanchi y arrayán presentan un amplio espectro antibacteriano principalmente ante las cepas de *Staphylococcus*.

La diferencia en la actividad de los diferentes extractos y las concentraciones que presentan las bacterias en CMI y CBM pueden deberse muy probablemente como ya se ha mencionado a lo largo de este estudio a la

presencia de los compuestos fenólicos presentes, así como también a la concentración en la que se encuentran dependiendo del estado de maduración del fruto.

Actividad del extracto del fruto inmaduro fresco libre de compuestos no polares (F) sobre la curva de crecimiento bacteriano.

Respecto a las curvas de crecimiento, un fármaco bactericida destruye la bacteria (Levinson, 2004), tal es caso del extracto F frente a *S. aureus* ATCC 12398 (Figura 5) donde con las concentraciones de 0.25 mg/mL y 4.0 mg/mL se ve inhibido el crecimiento bacteriano por completo a partir de las 12 y 8 horas respectivamente. En cambio un fármaco bacteriostático inhibe el crecimiento del microorganismo, pero no lo destruye (Levinson, 2004); como el efecto que presenta este mismo extracto sobre *V.cholerae* No-01, que bajo ninguna de las concentraciones probadas (0.625, 0.125 y 0.5 mg/mL) la población es inhibida por completo pues solo se observan bajas en el número poblacional bacteriano.

De acuerdo con Levinson (2004), para que un antibiótico sea útil, debe poseer toxicidad selectiva, es decir, la inhibición selectiva del crecimiento de los microorganismos sin dañar al hospedero. Esto se consigue explotando las diferencias entre el metabolismo y la estructura del microorganismo y las características correspondientes a las células humanas. También menciona la existencia de cuatro dianas de las células bacterianas que son suficientemente diferentes como para servir de base para la acción de fármacos clínicamente efectivos: la pared celular, los ribosomas, los ácidos nucleicos y la membrana celular.

De este modo, se infiere que el extracto F (fruto inmaduro libre de compuestos no polares) está causando alguna lesión en alguna de las dianas mencionadas por Levinson (2004) que también es confirmado por Davis *et al.*, (1996) al decir que la acción bactericida depende de la lesión irreversible de un elemento celular que no puede ser sustituido, como al ADN o la cubierta celular, otro punto de acción bactericida son las proteínas requeridas para la síntesis de ARN y los ribosomas.

Toxicidad

Artemia posee varias características que han facilitado su uso en estudios de toxicología, como son un corto periodo de generación (aproximadamente 20 días en condiciones óptimas), su facilidad de manejo, almacenamiento, cultivo y su disponibilidad. Estas características coinciden con algunas de las recomendaciones hechas en la selección de organismo para test de toxicidad, todas estas razones han propiciado el uso de *Artemia* en toxicología (Sarabia, 2002).

De acuerdo a los resultados obtenidos de la toxicidad general realizada a los diferentes frutos de *C. procera* (Cuadro 5) se encontró según Padmaja *et.al.*, (2000), que el extracto A, C, D, E y F son altamente tóxicos, mientras que el extracto B tuvo una toxicidad moderada.

A pesar de que el fruto de *C. procera* presentó este nivel de toxicidad Mohanty y Cock (2009) mencionan al respecto, que los extractos de plantas tóxicas pueden aún tener potencial medicinal, incluso si no son antimicrobianos. McLaughlin *et al.*, (1998) han demostrado que la toxicidad en el bioensayo de *A. franciscana* puede indicar potenciales para tratar el cáncer.

De esta forma, *C. procera* también podría ser probado contra líneas celulares para el cáncer humano y de este modo determinar su posible potencial como medicamento anticancerígeno.

Actividad antioxidante

Las tendencias mundiales de la alimentación en los últimos años indican un interés acentuado de los consumidores hacia el consumo de frutas y vegetales, que además del valor nutritivo aporten beneficios a las funciones fisiológicas del organismo humano. Estas variaciones en los patrones de alimentación han generado una nueva área de desarrollo en la que la ciencia de los alimentos y de la nutrición, junto con la investigación clínica y biomédica, interactúan de una forma innovadora en el estudio de los llamados “alimentos funcionales”. Éstos se han definido como cualquier alimento en forma natural o procesada, que además de sus componentes nutritivos contienen componentes

adicionales que favorecen la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona. Un campo importante en la investigación de los alimentos funciones lo constituyen los polifenoles presentes en frutos y vegetales. En este sentido, en los últimos 10 años las frutas, por su contenido y variedad de polifenoles, se han reconocido científicamente como fuente de biomoléculas funcionales con actividad antioxidante que actúan como mediadores de diversos efectos benéficos en la salud (Konigsberg, 2008).

Los antioxidantes son sustancias químicas que se caracterizan por impedir o retrasar la oxidación de diversas sustancias principalmente de los ácidos grasos cuyas reacciones se producen tanto en los alimentos como en el organismo humano, el cual puede provocar alteraciones fisiológicas importantes desencadenantes de diversas enfermedades. Se ha documentado científicamente en muchos casos que los antioxidantes son potenciadores de la salud y que su utilización supone entre otras cosas la prevención de enfermedades crónicas y no transmisibles como algunos tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares entre otras, de ahí la importancia de alimentos con alto contenido de sustancias antioxidantes como las frutas y verduras (Zamora, 2007).

En este estudio los extractos del fruto de *C. procera* (extractos B, C, F) presentaron actividad antioxidante (Cuadro 6), colocándose en primer lugar el extracto C (fruto inmaduro fresco crudo) con 45.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para reducir a un 50% al DPPH•. Es reconocido que las frutas presentan compuestos que actúan como antioxidantes y que su consumo diario disminuye el riesgo de algunas enfermedades como las cardiovasculares (Adebawo *et al.*, 2006).

A nivel mundial los estudios realizados han mostrado diversidad en las propiedades antioxidantes de las frutas. Así, Palomo *et al.*, (2009) encontraron que los frutos de la frambuesa y el kiwi destacaron por su actividad antioxidante y que los extractos de pulpa, respecto a los extractos acuosos, presentaron una actividad levemente mayor.

Beltrán *et al.*, (2009) concluye en su estudio sobre el fruto de la pitaya (*Stenocereus stellatus* Riccobono) que tiene una capacidad antioxidante similar a la de algunos frutos del género *Vaccinium* considerados como los de mayor actividad antioxidante y que el consumo de estos podría reducir el riesgo de enfermedades crónicas e incluso lo considera como un alimento nutracéutico potencial.

Respecto a las diferencias presentadas en la actividad antioxidante de los extractos de *C. procera* el efecto puede deberse por una parte, al grado de maduración que presentan y por el otro la presencia y proporción en la que se encuentran los fenoles y flavonoides detectados. Respecto al primer caso, Peña *et al.* (2006) reporta en su estudio sobre el fruto de frambuesa diferencias en la actividad antioxidante entre los frutos inmaduros, maduros y muy maduros, este último en promedio con más del doble de antocianinas. También informa que gran parte de los compuestos fenólicos presentes en los frutos poseen actividad antioxidante; sin embargo, la magnitud de la actividad no es la misma para todos los compuestos.

En el segundo caso, Pérez (2003b) menciona que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de una combinación de sus propiedades quelantes de hierro y secuestradoras de radicales libres (RL).

Por su parte Konigsberg (2008) menciona que el mecanismo antioxidante de los polifenoles fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo y es que el creciente interés por este grupo se debe a la amplia actividad farmacológica que presentan. Pueden unirse a los polímeros biológicos, como enzimas, transportadores de hormonas y DNA; quelar iones metálicos transitorios, como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar electrones libres. Debido a este hecho, se han descrito sus efectos protectores en patologías como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera gástrica y duodenal, e inflamaciones.

Además, los flavonoides retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxido, radicales hidroxilo, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos.

De esta forma, bloquean la acción tóxica de dichas sustancias sobre las células. Sus efectos citoprotectores son patentes en fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxina-butionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa. Diversos flavonoides también han demostrado su eficacia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o de la autooxidación de los homogeneizados de cerebro (Konigsberg, 2008).

Así mismo se ha comprobado su potente capacidad de inhibir *in vitro* la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por los macrófagos, y reducir la citotoxicidad de las LDL oxidasas. De hecho, las poblaciones que consumen productos ricos en flavonoides estadísticamente presentan menores riesgos de afecciones cardiovasculares (Konigsberg, 2008).

Las diferencias en los resultados encontrados por los diferentes investigadores podrían explicarse en parte por las diferentes variedades botánicas de las frutas utilizadas, como también diferencias de lugar, almacenamiento y procesamiento.

Detección de metabolitos secundarios

Entre los metabolitos secundarios encontrados en el fruto de *C. procera* se pudieron detectar taninos, así como la presencia de fenoles por medio del resultado positivo aplicando cloruro férrico y obtenerse un viraje verdoso (Domínguez, 1973).

La cromatografía líquida de alta resolución confirmó la presencia de compuestos fenólicos, de los cuales solo se pudieron reconocer dos de los grupos pertenecientes a estos compuestos: 1) fenoles y 2) flavonoides, éstos presentando características similares en tiempo, forma y espectros de absorción que permitieron deducir la posible presencia de mismas moléculas en ambos estados de madurez aunque en diferentes concentraciones (Figura 7, 8, 9, 10; Cuadro 7).

Las plantas sintetizan una gran cantidad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides (Ávalos y Pérez, 2009).

Dentro de los compuestos fenólicos se encuentran el grupo de los fenoles y varias investigaciones demuestran la presencia de este grupo en los frutos como el de la guayaba donde Rojas *et al.* (2008), reporta la presencia de este grupo en las diferentes variedades de la pulpa de la guayaba.

Respecto a los flavonoides, Pérez (2003b) menciona que comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en las frutas y en los vegetales, así como en el té negro, el café, la cocoa, la cerveza y el vino rojo.

Por su parte Tenorio *et al.*, (2006) indica que estos compuestos tienen efectos muy importantes en la bioquímica y fisiología de las plantas, en donde actúan como antioxidantes, inhibidores enzimáticos, precursores de sustancias tóxicas, así como en la formación de pigmentos y filtros solares. También estos compuestos están involucrados en mecanismos de fotosensibilización y de transferencia de energía, regulando así las reacciones de crecimiento, control de la respiración, fotosíntesis, la morfogénesis, la determinación sexual y la defensa contra infecciones.

Pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30 000 Da. Existen 13 subclases de flavonoides con un total de más de 5 000 compuestos, todos presentando un esqueleto hidrocarbonado del tipo C₆-C₃-C₆ (difeníl-propano) derivados del ácido shiquímico y de 3 restos de acetato. Poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitromboticas, antimicrobianas, antialérgicas,

antitumorales, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas, entre otras (Pérez, 2003b).

Así mismo, se ha comprobado la presencia de metabolitos secundarios de este tipo en otros frutos, los cuales tienen un gran interés industrial y comercial desde el punto de vista farmacológico y alimentario. Por ejemplo, Botía *et al.*, (1996) indican que el género *Citrus* produce entre otros compuestos, cumarinas, flavanonas, flavonas y flavonoides libres y/o glicosilados. También reportan que numerosos autores han revelado que la expresión de los flavonoides en varias especies del género *Citrus*, está relacionada con ciertos estados de crecimiento celular, detectándose los máximos niveles para estos compuestos secundarios, en tejidos jóvenes tales como frutos inmaduros, concluyendo que es posible modular la expresión de los flavonoides, con miras a incrementar sus niveles en frutos y así obtener un mayor rendimiento en el proceso de extracción para su uso industrial.

Otro ejemplo es el consumo de infusiones de té negro y verde, lima mexicana, productos derivados del cacao, cítricos, manzana, cereza, jitomate, cebolla, entre otros, como fuente excelente de flavan-3-oles, los cuáles además de ser capaces de estabilizar o desactivar a los radicales libres antes de que ejerzan un daño a un órgano blanco, al parecer también son capaces de regular la síntesis de glutatión, importante antioxidante celular endógeno (Keen *et al.*,2005; Moskaug *et al.*,2005; Negishi *et al.*,2004;Tenorio *et al.*, 2006; Ubando *et al.*,2005).

Entre todas, las propiedades biológicas de tienen los flavonoides de mayor interés han sido sus efectos antioxidantes, los cuales han sido blancos de un sin número de estudios principalmente de corte clínico y nutricional, teniendo en cuenta que a menudo dosis farmacéuticas de antioxidantes dietéticos comúnmente recomendados en todo el mundo, como es el caso de las combinaciones vitamínicas (vitamina E,C y β -carotenos), no producen los efectos esperados o estos resultan dañinos, por lo que para lograr una mejor acción antioxidante se prefiere incluir en la dietas una mezcla de flavonoides y taninos (Pérez, 2003b). A partir de esto y dado los resultados positivos que

presenta el fruto de *C. procera* a las pruebas sobre la presencia de taninos y flavonoides, el fruto puede llegar a ser un buen candidato para incluirse al igual que otros frutos en la dieta como antioxidante.

Los taninos están constituidos por un amplio grupo de compuestos hidrosolubles con estructura polifenólica, capaces de precipitar ciertas macromoléculas (proteínas, alcaloides, celulosa, gelatina). Esta capacidad para precipitarlas es la base de sus dos propiedades principales: su capacidad de curtir la piel y su poder astringente (Kuklinski, 2000).

La presencia de taninos puede explicar la propiedad de astringencia que menciona Francisco Hernández (Argueta y Cano, 1994). Según Kuklinski (2000), los taninos son capaces de reaccionar con las proteínas salivales y las glicoproteínas de la boca, por lo que la saliva pierde su poder lubricante y se obtiene un efecto astringente.

Debido a esta propiedad, son utilizados por vía externa como cicatrizantes y por vía interna como antidiarreicos. El efecto antiadereico lo ejercen en el intestino y, para evitar los ardores de estómago que producirían, se administran combinados con albúmina o gelatina. De esta forma, el tanino no se libera hasta llegar al intestino, donde hay medio básico. La astringencia también les confiere un uso como antisépticos, de este modo ofrecen una acción bactericida y bacteriostática así como también la capacidad de captar radicales libres e inhibir la peroxidación lipídica (Kuklinski, 2000), por lo tanto, es posible que la actividad antibacteriana y antioxidante del fruto de *C. procera* se deba también a la presencia de este tipo de compuesto fenólico.

La información generada en este trabajo da soporte al uso que este fruto tiene en la medicina tradicional. Así mismo, es la base para posteriores investigaciones sobre composición, aislamiento y caracterización de los compuestos que imparten esta actividad biológica.

HOJAS

Rendimiento del extracto

De los cuatro extractos obtenidos de las hojas de *C. procera* (Cuadro 8) el que obtuvo mayor rendimiento fue extracto H1 (crudo) lo cual podría estar indicando la presencia de compuestos de naturaleza polar o de polaridad intermedia.

Actividad Antibacteriana

EVALUACIÓN CUALITATIVA

Los extractos de las hojas de *C. procera* probados no presentaron actividad frente a las cepas (Cuadro 9). Sin embargo, el extracto H1 (metanólico crudo, 6.8%) y de sus particiones el H4 (metanólico libre de compuestos no polares, 2.2%), mostró una reducción en las poblaciones bacterianas tanto Gram positivas como Gram negativas.

Es posible que este extracto pudiera tener actividad frente a las bacterias en concentraciones más altas de las probadas en este estudio ya que varias investigaciones respaldan la actividad que presentan las hojas de otras plantas.

Por ejemplo: Vattuone *et al.* (2008) reportan las hojas de extractos del “Guayacán” (*Caesalpinia paraguariensis* Par. Burk) con actividad antibacteriana o Martínez *et al.* (1997) quienes mencionan una actividad antibacteriana baja de las hojas de la guayaba (*Psidium guajava* L.)

Además, esta actividad antibacteriana puede deberse probablemente a los metabolitos secundarios que contiene como los flavonoides y fenoles y que poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas, entre otras (Pérez, 2003(b)).

EVALUACIÓN CUANTITATIVA

Dado los resultados de la prueba cualitativa del extracto H1, se decidió calcular CMI y CBM bajo concentraciones de 1 hasta 6mg/ml (Cuadro 10). Como era

de esperarse las CMI se alcanzan para bacterias Gram positivas con entre 3mg/mL y 6mg/ml y para Gram negativas con entre 5mg/mL y 6mg/mL y CBM en general con 6mg/mL o por arriba de 6mg/mL, siendo un poco más sensibles las bacterias Gram positivas como se menciona anteriormente debido a las diferencias estructurales entre ambos grupos bacterianos.

Al igual que menciona Martínez *et al.* (1997) con las hojas de guayaba, las hojas de *C. procera* tienen una actividad antibacteriana baja principalmente para las bacterias Gram negativas.

Ramírez y Díaz (2007) indican que el extracto de las hojas del Ruibarbo (*Rumex conglomeratus*) presentan actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus* incluso la sugiere como una fuente de productos potenciales como antibacterianos frente a microorganismo Gram positivos.

Toxicidad

Los resultados obtenidos sobre el porcentaje de muerte de *Artemia salina* de los diferentes extractos de la hoja de *C. procera* (Cuadro 11) mostraron ser fuertemente tóxicos.

Lo anterior evidencia el porque la gente no usa esta parte de la planta para aliviar algún padecimiento y es que si bien algunas hojas de otras plantas son utilizadas en la medicina tradicional sin presentar toxicidades fuertes otras sí, tal es el caso del estudio que realiza Meza (2008) quien reporta la toxicidad que tienen las hojas de la berberina (*Berberis rotundifolia*) como tóxicos no solo para *Artemia salina* sino también con actividad citotóxica inhibiendo la división celular en huevos fecundados de *Loxechinus albus*.

La evaluación de la actividad biológica de especies vegetales a través de la utilización de bioensayos, permite conocer en forma preliminar, eventuales acciones farmacológicas que compuestos contenidos en ellas podrían presentar.

Por lo anterior las hojas de *C. procera* podrían ser la base de eventuales estudios sobre las propiedades farmacológicas que estas tienen por ejemplo, contra líneas celulares para el cáncer humano.

Actividad antioxidante

Los valores de la actividad antioxidante de los diferentes extractos de la hoja de *C. procera* se muestran en el Cuadro 12. El extracto H4 presentó la mejor actividad antioxidante con una concentración de 6.60 µg/mL para reducir el DPPH• respecto a los demás extractos. Lo anterior por supuesto puede atribuirse a los fenoles y flavonoides encontrados en las hojas y es que como menciona Rice *et al.*(1989) la naturaleza química de los flavonoides es predictiva de su actividad estabilizante de radicales libres, debido a que los potenciales reductores de sus radicales libres son más bajos que aquellos de los radicales peróxidos y superóxidos, lo que significa que estos metabolitos secundarios pueden inactivar esas especies prooxidantes y prevenir así sus efectos dañinos.

De esta forma es comprobable la acción antioxidante de las hojas de *C. procera* con otras investigaciones como la de Ortíz *et al.* (2009) quienes estudiaron el potencial antioxidante de hojas de *Bauhinia kalbreyeri* Harms los cuales mostraron alta funcionalidad antioxidante, quienes también aislaron flavonoides que quelaron metales e inhibieron el NO indicando así el potencial de esta especie como antioxidante.

Detección de metabolitos secundarios

La prueba realizada para la presencia de fenoles hecha al extracto H1 quien presentó una reducción de las poblaciones bacterianas en la actividad antibacteriana fue positiva y según la cromatografía líquida de alta resolución arrojó como resultados que al igual que el fruto la hoja tienen fenoles y flavonoides (Cuadro 16; Figura 11) a los que se les puede atribuir la capacidad antioxidante y antibacteriana presentados en este estudio.

Finalmente, se espera que el desarrollo e integración de los conocimientos sobre esta planta lleve a su aprovechamiento racional.

CONCLUSIONES

- El fruto y no las hojas de *C. procera* tienen actividad antibacteriana.
- El grado de maduración de los frutos afectó la actividad antibacteriana, la toxicidad así como la actividad antioxidante.
- Las bacterias Gram positivas fueron las más sensibles a los extractos del fruto y la hoja de *C. procera*.
- El extracto F (inmaduro fresco libre de compuestos no polares) presentó un efecto bactericida frente a bacterias Gram positivas y bacteriostático frente a bacterias Gram negativas.
- Fruto y hojas tienen actividad antioxidante, el extracto del fruto inmaduro fresco crudo (C) y el de las hojas libres de compuestos no polares (H4) presentan la mayor actividad.
- Los extractos del fruto y la hoja de *C. procera* son fuertemente tóxicos, con excepción del fruto inmaduro seco crudo (B) y el extracto de las hojas libre de compuestos no polares (H4) que presentan una toxicidad moderada.
- Los extractos del fruto de *C. procera* contienen taninos, fenoles y flavonoides en sus diferentes estados de maduración. La hoja tiene fenoles y flavonoides.

PERSPECTIVAS

Finalmente, es posible decir que el mundo vegetal constituye una fuente importante de moléculas potencialmente terapéuticas, siendo por muchos años el origen de una gran cantidad de fármacos de utilización actual, realizando la importancia de conocer las plantas medicinales en cuanto a sus principios activos y actividades biológicas. Por ende, es importante continuar con el estudio de *C. procera* debido a que su uso como planta medicinal no solamente se limita para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, sino que se podría utilizar para otro tipo de afecciones, por lo que se proponen realizar los siguientes estudios.

- Seguir realizando estudios para la evaluación de otras actividades biológicas como antitumoral, cicatrizante, antiparasitario o incluso como posible bioinsecticida.
- Purificar los extractos para aislar los componente puros así caracterizar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana.
- Ampliar los estudios toxicológicos e incluso realizar estudios citotóxicos.
- Respecto a su actividad como antioxidante en estudios futuros seria de interés obtener mayor cantidad de masa con el fin de realizar un aislamiento bioguiado de las moléculas que presentan dicha actividad, y así identificar químicamente el principio activo.
- A pesar de su importante aceptación en diversos mercados regionales y su gran potencial de comercialización, existe escasa información sobre los mecanismos bioquímicos y fisiológicos relacionados con el proceso de maduración del fruto, información necesarias para establecer sus requerimientos de manejo postcosecha.
- Realizar un estudio de viabilidad productiva para después promover el consumo interno y su exportación e incrementar el consumo local mediante promoción y campañas.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

Clasificación y descripción botánica de *Cyrtocarpa procera* Kunth.

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Sapindales
Familia: Anacardiaceae
Género: <i>Cyrtocarpa</i>
Especie: <i>Cyrtocarpa procera</i> Kunth

Nombre común.

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

Botánica y ecología.

Árbol de 6 metros de altura o más alto, cubiertos con vellos. Las hojas parecen plumas; tienen un soporte que las une a los tallos, alados. Presentan racimos de flores blancas. Los frutos están cubiertos de pelos y miden 2 cm. de largo (Argueta y Cano, 1994) (Figura 1).

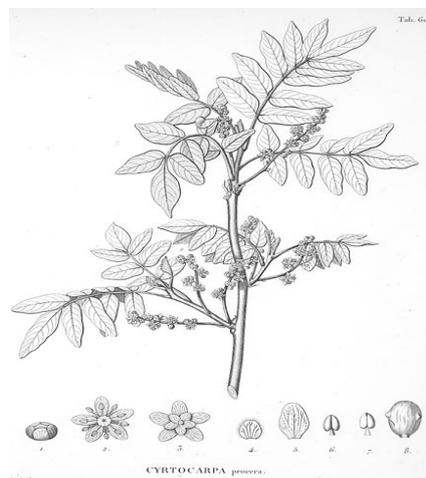


Figura 1. *Cyrtocarpa procera* Kunth

Distribución geográfica.

Originario de México. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado entre los 600 y los 1100 msnm. Planta silvestre, asociada a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino y de pino. Se encuentra ampliamente distribuida en: Colima, Michoacán, Estado de México, Puebla y Oaxaca (Argueta y Cano, 1994) (Figura 2).



Figura 2. Distribución geográfica de *Cyrtocarpa procera* Kunth en México.



Estados donde se localiza la especie *C. procera*

Historia.

En el siglo XVI, Francisco Hernández relata: “el fruto es muy astringente y destila una baba sumamente glutinosa; ésta, untada, cura las fiebres, se administra contra las disenterías y las diarreas. Para el siglo XX Maximino Martínez la mencionó como eficaz contra la lepra (Argueta y Cano, 1994).

Etnobotánica y antropología.

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

En el estado de Nayarit se utiliza para el tratamiento de la diarrea o soltura: se cuece un puñito de la cáscara en 1 litro de agua y se toma como agua de uso, durante cuatro días o el tiempo necesario (Masaibo y He, 2009).

APÉNDICE 2

Zona de Colecta

El fruto de *C. procera* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m. (Figura 3).

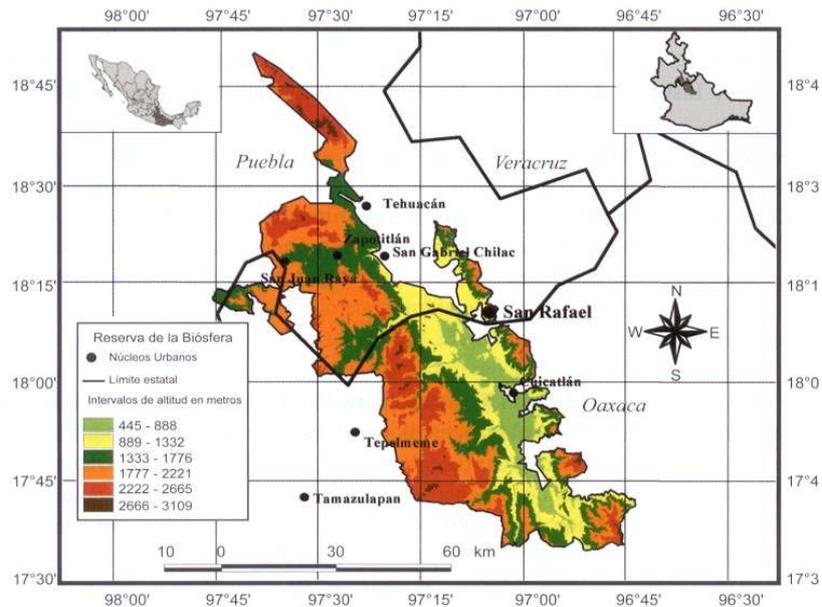


Figura 3. Ubicación geográfica de San Rafael.

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 (cordones).

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.

Cuajitotal 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 pauciflora* (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*.

La población.

La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) (Secretaría de Salud, 2001). La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importante es la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

APÉNDICE 3

Técnica de Maceración.

Se tomó el fruto en sus diferentes estadios de maduración (maduro seco, inmaduro seco e inmaduro fresco) desechando la semilla y se le agregó un solvente de polaridad alta, en este caso se utilizó metanol. Una vez obtenido el extracto, se destiló el exceso de solvente a presión reducida. El extracto obtenido se colocó en charolas de vidrio para completar la evaporación del solvente, finalmente se calculó el rendimiento total por diferencia de peso (Domínguez, 1973).

APÉNDICE 4

Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991)

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos herbales, la metodología es la siguiente:

Medio:

Para los ensayos con las cepas bacterianas se utilizó como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton (Bioxon 110-1), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. 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.

Inóculo

Bacterias:

Con un asa de siembra estéril se tocaron las superficies convexas de 4 o 5 colonias del microorganismo a ensayar. Se sumergió el asa en 10 ml de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retiró el asa de siembra. Se incubó el tubo de cultivo a 37°C

durante aproximadamente 24 horas o hasta que la turbidez del medio fuera equivalente al estándar N° 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/mL (este procedimiento se realizó por cada microorganismo).

El estándar 0.5 de McFarland se preparó añadiendo 0.5 ml de cloruro de bario a 99.5 ml de H_2SO_4 0.36 N (Hendrickson, 1987, citado por Ávila, 1996). La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se efectuó observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales o en su defecto con un espectrofotómetro (Spectrónic 21 Milton Roy) a 660 nm.

Si la suspensión de organismos era más turbia que el estándar, se añadió solución salina al 0.9 % hasta igualarlas. Una vez logrado esto, se sumergió un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlo se eliminó el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inoculó la superficie de una placa de agar Müeller-Hinton (Bioxon 110-1). Previamente se dejó que la placa alcanzara una temperatura ambiente; es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se sembró mediante estría por lo menos en tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

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

Aplicación de extractos:

Se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5 (los sensidiscos se utilizan para evaluar biológicamente los extractos). En todos los casos se hicieron las diluciones necesarias para que los sensidiscos llevaran la cantidad deseada de extracto (2 mg por sensidisco).

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

Controles negativos:

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

Control positivo:

Se evaluó la sensibilidad de las cepas de las bacterias en sensidiscos con 25 μ g de Cloramfenicol.

Incubación:

Bacterias:

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

APÉNDICE 5

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

Método de macrodilución en agar (Koneman 1996)

a) Preparación de reactivos y diluciones:

Las disoluciones antibacterianas de trabajo se prepararon diluyendo el extracto en el agar de Müller-Hinton según las concentraciones deseadas (125, 250, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 µg/mL). El agar se esterilizó en tubos de ensayo de 13 por 100 mm con tapa de rosca o con tapones de algodón. Se colocó la cantidad necesaria del extracto para obtener la concentración requerida. Después de mezclar bien el contenido se transfiere a una caja de Petri.

Inoculación e incubación de los tubos:

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

b) Interpretación de resultados:

La menor concentración de antimicrobiano que produce una inhibición completa del desarrollo visible representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Determinación de la concentración bactericida mínima.

Para medir la capacidad de un antimicrobiano para matar a un organismo se realizó la prueba de actividad bactericida que emplea el mismo sistema de dilución en agar. En aquellas cajas en donde se observó un descenso drástico de la bacteriana (99.9%), se denominó Concentración Bactericida Mínima (CBM).

APÉNDICE 6

Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1996)

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

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

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

APÉNDICE 7

Efecto del extracto sobre la curva de crecimiento bacteriano (Muroi et al., 1993).

Se preparó un tubo por lo menos para cada uno de los extractos, para el muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de una hora durante los cuatro primeros tiempos, después durante dos horas, durante 4 horas y finalmente a las 12 y 24 horas. Posteriormente también se preparó y rotuló un tubo sin antídoto que sirvió como control del desarrollo.

El inóculo se obtuvo aproximadamente con 1×10^8 bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación). Se inoculó con ayuda de una micropipeta 100 μ L de la suspensión de bacterias en los tubos que contenían los extractos, estos tuvieron la concentración de CMI y sus múltiplos medios; esto es, la mitad de la CMI y CBM. La concentración final fue de aproximadamente de 1×10^5 bacterias/ mL de caldo en cada tubo. Se incubó en una estufa sin presión de CO₂.

Se muestreó cada hora las primeras 4 horas, después cada dos horas dos tiempos y finalmente a las 12 y 24 horas. La duración del experimento fue de 24 a 36 horas.

Por último, se graficó el logaritmo del número de sobrevivientes en el eje de las ordenadas "Y" contra el tiempo de incubación del eje de las abscisas "X", para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la muerte de la bacteria, se prolongó la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas (Davis y Dulbeco, 1996).

APÉNDICE 8

Método de toxicidad general (Método modificado de Niño et. al., 200).

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 añadieron 10 larvas por frasco. La concentraciones del problema ensayado fueron 1000, 100 y 10 ppm (1.0, 0.10, 0.01 mg/mL).

Control Negativo.

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

Incubación

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

Interpretación de resultados

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

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

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

APÉNDICE 9

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

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

Aplicación de Extractos

En una placa de ELISA se adicionaron 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 adicionaron 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).

Blanco. 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:

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

En donde:

C= Absorbancia del DPPH• + metanol

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

REFERENCIAS

1. Adebawo, O., Salau, B., Ezima, E., Oyefuga, O., Ajani, E., Idowu, G., Famodu, A., Osilesi, O., 2006. *Fruits and vegetables moderate lipid cardiovascular risk factor in hypertensive patients*. *Lipids Health Dis* 5:14.
2. Argueta, V. A. y Cano, A. J. 1994. *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista. México. 1193 pp.
3. Ávalos, G. A. y Pérez, U.C.E., 2009. *Metabolismo secundario de las plantas*. *Recursos Educativos* 2:119-145.
4. Barberán, T. F. y Espín, J.C., 2001. *Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81:853-876.
5. Barrera, L. R. A. 2008. *Fitoquímica y evaluación farmacológica de las propiedades sedantes de extractos de las hojas de Casimiroa edulis Llave y Lex*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México, D. F. 10-11 pp.
6. Beltrán, O.M.C., Oliva, C.T.G., Gallardo, V.T., Osorio, R.G., 2009. *Ascorbic acid, phenolic content, and antioxidant capacity of red cherry, yellow and White types of pitaya cactus fruit*. *Agrociencia* 43:153-161.
7. Botía, J.M., Del Río, J.A., Fuster, M.D., García, L.A., Ortuño, A., Porras, I., 1996. *Flavonoides presentes en los cítricos. Aspecto de su importancia Industrial*. *Fruticultura profesional* 50-55.
8. Camacho, H. I.L., Cisneros, R.C., Muñiz, N.M.L., Chávez, V.J.A., Uribe, B. M.J., Ríos, M.A., Ledesma, L.H., Delgado, V.F. 2001. *Actividad antibacteriana de extractos metanólicos de frutos silvestres del estado de*

Sinaloa. Ciencia y tecnología de alimentos. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

9. Canales, M. M. M. 2005. *Base Fitoquímica del Uso Tradicional de Plantas para el Tratamiento de Enfermedades de Posible Origen Bacteriano en San Rafael Coxcatlán, Puebla*. Tesis de Doctorado, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México, D.F. 145 pp.
10. Chart, H. 2002. *Escherichia*. Greenwood, D., Slack, C. B.R. y Peutherer F. J. En: *A guide to microbial infections: medical Microbiology pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control*. 16^aed. Editorial Churchill Livingstone. 265-267 pp.
11. Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers. S., De Bruney, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A. J., 2002. *Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo*. Journal of Ethnopharmacology 79: 213-220.
12. Davis, B.D., Dulbeco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. 1996. *Tratado de Microbiología*. 4^a ed. Editorial Masson, S.A. Barcelona. 1559 pp.
13. Del Valle P. P. 2009. *Compuestos con actividad antibacteriana sobre patógenas de la cavidad oral aislados de los frutos de Spondias purpurea L. (ciruelo rojo)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, D.F. 1-2 pp.
14. Demirci B., Kosar M., Demirci F., Dinc M., Baser K.H.C., 2007. *Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of Chaerophyllum libanoticum Boiss. et Kotschy*. Food Chemistry 105:1512–1517.

15. Díaz, R. N. A. 1998. Libro- *Herbario de Plantas Medicinales*. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Artes Plásticas. UNAM. México, D.F. 46-57 pp.
16. Domínguez. A. X. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Limusa. México. 3-17 pp.
17. Erazo S., Delporte C., Negrete R., García R., Zaldivar M., Iturra G., Caballero E., López L.j., Backhouse N, 2006. *Constituents and biological activities of Schinus polygamus*. Journal of Ethnopharmacology 107:395 – 400.
18. Ferrero, A. Minetti A., Bras C., Zanetti N., 2007. *Acute and subacute toxicity evaluation of ethanolic extract from fruits of Schinus molle in rats*. Journal of Ethnopharmacology 113: 441-447.
19. Foster, T.J. 2000. *Staphylococcus*. En. Samuel Baron. Medical microbiology. Section I bacteriology. Capítulo 12. 4^a ed. Graduate school of biomedical sciences. University of Texas Medical Branch. USA.
20. García, E. 1981. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Instituto de Geografía. UNAM. México. 252 pp.
21. García, G. 1984. *Plantas medicinales de la vertiente sur de La Sierra de Pachuca, Hidalgo*. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México. 188 pp.
22. Gros, G. E., Pomilio, A. Burton, G. 1985. *Introducción al estudio de los productos naturales*. Secretaria General de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington. 147pp.
23. Gurib-Fakim. A., 2006. *Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow*. Journal of Molecular Medicine 27:2-18.

24. Keen, C.L., Holt, R. R., Oteiza, P.I., Fraga, C.G., Schmitz, H.H., 2005. *Cocoa antioxidants and cardiovascular health*. American Journal of Clinical Nutrition 81:298-303.
25. Koneman, W. E. 1996. *Diagnóstico Microbiológico*. Médica Panamericana. México. 439 pp.
26. Konigsberg, F.M. 2008. *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. Editorial El Manual Moderno. México. 636 pp.
27. Kubo, I., Masuoka, N., Ha, J. T., Tsujimoto K., 2006. *Antioxidant activity of anacardic acids*. Food Chemistry 99: 555-562.
28. Kuklinski, C. 2000. *Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Ediciones OMEGA, S. A. Barcelona. 505 pp.
29. Lechuga, C. V. J. A., Meraz, V. S., Orozco, V. J., García, S. M. D. y Cruz, S.F., 2000. *Algunos aspectos de la micropropagación de plantas medicinales*. DINTEL 6:67- 80.
30. Levinson, W. 2004. *Microbiología e Inmunología Médicas*. 8^a ed. Mc Graw Hill. España, S.A. U. 662 pp.
31. León, V. M. E. 2005. *Catálogo de especies útiles en la familia Malpighiaceae en el Estado de México y zonas aledañas*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Tlalnepantla Edo. Méx. 136 pp.
32. Madrigal, V.M. 2009. *Control biológico de la mancha negra (Alternaria alternata) como alternativa de prevención en el manejo postcosecha del mango*. Colegio de Postgraduados. Maestría Tecnológica en Agroindustria. Cordoba, Veracruz. 72 pp.

33. Martínez, E.K.S. 2009. *Evaluación de la actividad antimicrobiana de C. procera* (Chupandilla). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Tlalnepantla Edo. Méx. 53 pp.
34. Martínez, J.M., Molina, N., Boucourt, E. 1997. *Evaluación de la actividad antimicrobiana del Psidium guajava L. (Guayaba)*. Revista Cubana de Plantas Medicinales 2:12-14.
35. Masibo, M. y He, Q. 2009. Mango bioactive compounds and related nutraceutical properties –a review- Food Reviews International 25:346-370.
36. McLaughlin, J.L., Rogers, L.L., Anderson, J.E., 1998. *The use of biological assays to evaluate botanicals*. Drug Information Journal 32:513-524.
37. Medina, S. J. 2000. *Determinación del vigor y estado reproductivo de Stenocereus stellatus (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 16-35 pp.
38. Meza, V.M. 2008. *Química y actividad biológica de Berberis rotundifolia*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile. 89 pp.
39. Mims, C., Plyfair, J., Roitt, I., Wakelin, D., Williams, R. 1999. *Microbiología Médica*. Ed. Harcourt. Barcelona, España. 430-540 pp.
40. Mohanty, S. y Cock, I., 2009. *Evaluation of the antibacteria activity and toxicity of Myrciaria cauliflora methanolic leaf and fruit extracts*. The Internet Journal of Microbiology 7.

41. Moskaug, J.O., Carlsen, H., Myhrstad, M.C., Blomhoff, R., 2005. *Polyphenols and glutathione synthesis regulation*. American Journal of Clinical Nutrition 81:277-283.
42. Mukhlesur, R.M.M., Parvin, S.M., Ekramul, H., Ekramul, I., Mosaddikm M.A., 2005. *Antimicrobial and cytotoxic constituents from the sedes of Annona squamosa*. Fitoterapia 76:484-489.
43. Murillo, F. 2006. *Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas*. Revista Tecnología. Alfa Editores Técnicos. 27 pp.
44. Muroi, H., Kubo, A., Kubo, I., 1993. *Antimicrobial activity of cashew Apple flavor compounds*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41:1106-1109.
45. Negishi, H., Xu, J.W., Ikeda, K., Njelekela, M., Nara, Y., Yamori, Y., 2004. *Black and green tea polyphenols attenuate blood pressure increases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats*. Journal of Nutrition 134:38-42.
46. Nikaido, H, y Nakae, T. 1979. *The outer membrane of gram-negative bacteria*. Advances in microbial physiology 20:163-250.
47. Niño, J., Correa Y. M. y Mosquera, O. M., 2006. *Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of 11 Solanaceae plants from Colombia Biodiversity*. Pharmaceutical Biology 44:14 -18.
48. Ortíz, F.H., Sánchez, F.W., Méndez, A.J., Murillo, P.E., 2009. *Potencial antioxidante de hojas y corteza de Bauhinia kalbreyeri Harms: contribución de sus flavonoides en esta actividad*. Revista de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 33:183-191.

49. Padmaja, R., Arun, P.C., Deepak, M.D., Amit, A., Andaja, M. 2002. *Brine shrimp letality bioassay of selected Indian medicinal plants*. *Fitoterapia* 73,508-510.
50. Palomo, G.I., Gutiérrez, C.M., Astudillo, S.L., Rivera, S.C., Torres, U.C., Guzmán, J.L., Moore-Carrasco, R., Carrasco, S.G., Alarcón, L.M., 2009. *Antioxidant effect of fruits and vegetables of central región of Chile*. *Revista Chilena de Nutrición* 36:152-158.
51. Paula, S.J. y Martins S.A., 2000. *Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de Rubus urticaefolius*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 5:26-9.
52. Peña, V.G., Salinas, M.Y., Ríos, S.R., 2006. *Contenido de antocianinas totales y actividad antioxidante en frutos de frambuesa (Rubus idaeus L.) con diferente grado de maduración*. *Revista Chapingo* 12:159-163.
53. Pérez, C. L.E. 2003a. *Aplicación de métodos combinados para el control del desarrollo del pardeamiento enzimático en pera (variedad BLANQUILLA) mínimamente procesada*. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia. 256 pp.
54. Pérez, T.G., 2003b. *Los flavonoides: antioxidantes o proantioxidantes*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 22:48-57.
55. Prashanthe, K. V., Chauhan, N.S., Padh, H., Rajani, M., 2006. *Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants*. *Journal of Ethnopharmacology* 107:182-188.
56. Ramírez, A.S.L. y Díaz, B.E.H., 2007. *Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (Rumex conglomeratus)*. *Scientia Et Technica* 13: 397- 400.

57. Rice, E., Cheng, S.J. y Klauning, J.E., 1989. *Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated Chinese green tea*. *Carcinogenesis* 10:1003-1008.
58. Rojas, B.D.R., Narváez, C.E.C., Restrepo, S.L.P., 2008. *Evaluación del contenido de vitamina C, fenoles totales y actividad antioxidante en pulpa de guayaba (Psidium guajava L.) de las variedades pera, regional roja y regional blanca*. *Memorias Red-Alfa Lagrotech* 4960.
59. Rosas, L. R. 2003. *Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Tlalnepantla, México. 94 pp.
60. Ruvinsky, O.R., 2001. *Epidemiology and resistance of Streptococcus pneumoniae invasive disease in Latin America*. *Revista Chilena de Infectología* 18: 10-14.
61. Salcedo-Sánchez, B. 1997. *Insectos precortesianos de la cuenca de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 6-10 pp.
62. Sarabia, A.R. 2002. *Toxicidad y acumulación de cadmio en poblaciones de diferentes especies de Artemia*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia. Facultad de Ciencias Biológicas. Burjassot, Valencia. 96 pp.
63. Secretaría de Salud. *Censo de Población 2001*. Secretaría de Salud. Casa de salud de la comunidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ayuntamiento de Coxcatlán, Puebla, México. 10 pp.
64. Sepúlveda, J.G., Porta, D.H., Rocha, S.M., 2003. *La participación de los metabolitos secundarios en defensa de las plantas*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21:355-363.

65. Tenorio, L.F.A., Del Valle, M.L., Pastelín, H.G., 2006. *Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica?.* Archivo de Cardiología de México 76:35-45.
66. Toledo, C. S. M., González, L., J.A., Echemendia, O., Garcia, G.N., 2008. *Evaluación fitoquímica y farmacológica de frutos de Erythroxylum minutifolium Griseb. (Erythroxylaceae).* Revista Cubana de Plantas Medicinales 13.
67. Ubando, R.J., Navarro, O.A., Valdivia, L.M.A., 2005. *Mexican lime peel: comparative study on contents of dietary fibre and associated antioxidant activity.* Food Chemistry 89:57-61.
68. Valiente, B. L. 1991. *Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México.* Tesis de Licenciatura. UNAM. México. 65 pp.
69. Valiente-Banuet, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arizmendi, M. C., Ortega-Ramírez, J., Soriano, J. A., 2000. *La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.* Boletín de la Sociedad Botánica de México 67:25-75.
70. Vanden Berghe, D. A., Vlietinck, A. J., 1991. *Screening methods for antibacterial agents from higher plants.* En: Methods in plant biochemistry. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P. M. Academic Press. New York, USA. 47-71 pp.
71. Vattuone, M.A., Martínez, R.H., Corzo, A.G., 2008. *Actividad antibacteriana de extractos de hojas de Caesalpinia paraguariensis, Par. Burk, "Guayacán".* Revista de Ciencias Forestales 15:37- 41.
72. Zamora, S.J.D., 2007. *Antioxidantes micronutrientes en lucha por la salud.* Revista Chilena de Nutrición 31.

73. Zampini, C.I., Cudmani, N., Islas M.I., 2007. *Actividad Antimicrobiana de las Plantas Medicinales Argentinas sobre Bacterias Antibiótico-resistentes*. Acta Biquímica Clínica de Latinoamérica 41: 385-393.