



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS DE
Jatropha rzedowskii Jiménez-
Ramírez. (EUPHORBIACEAE)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA:

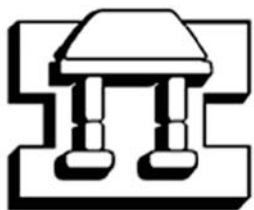
CARLOS RAMÓN IÑIGO MEDINA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO.

2012



IZTACALA



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 de investigación se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores (FES) campus Iztacala.

Fue dirigido por la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dr. César Mateo Flores Ortiz
Dra. Ma. Margarita Canales Martínez
Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy
M. en C. Ángel Durán Díaz
Biol. Luis Barbo Hernández Portilla

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

UNAM PAPIIT 218511-3

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

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de formarme profesionalmente. A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y sus autoridades y profesores por los múltiples apoyos durante mi formación académica, por permitirme ser parte de la Familia Universitaria Iztacalteca.

A la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez por la confianza, por el apoyo, por su paciencia y consejos, pero sobre todo por su gran calidad humana. Le estaré agradecido siempre por este título.

Al Dr. César Flores, por la invaluable aportación a esta investigación, además de ser uno de los mejores profesores que tiene la Facultad, con la capacidad de inspirar fascinación por el conocimiento a partir de las realidades más mínimas.

Al Dr. Marco Rodríguez, por su gran apoyo, sus acertados consejos que hicieron de este un mejor trabajo, por su amistad, compañerismo y generosidad. Es usted un tipazo profe.

Al M. en C. Ángel Durán Díaz por su valiosa aportación en el diseño estadístico; por el apoyo, la asesoría, y facilidades en el manejo de los datos obtenidos en esta investigación.

Al Biól. Luis Barbo Hernández, por su valiosa guía, por todo el apoyo, los comentarios y su disposición de ayudar en la consecución de los objetivos

planteados, no sólo en esta investigación, también en otras ocasiones durante la carrera. Gracias profe.

A la M. en C. Karla Martínez, a las Biólogas Ana Hernández, Rebeca Rivera, Brenda Rojas, Lesslie Espinosa, a la nutrióloga Nelly Rivera y los Biólogos Ricardo López y Óscar Nieto, así como las alumnas y alumnos de la carrera de Biología Alecita, Aura, Marisol, Graciela, Guadalupe, Martha, Karla de la Rosa, Mayra, Teodoro, Miriam, Marlene, Juan, Cristo, Enrique y los alumnos de la UNCA, Tania, Tere y Fabián por su amistad, por el compañerismo y por todo el trabajo y apoyo; por su generosidad y comprensión además de los consejos siempre útiles que hicieron el rato más llevadero, gracias por compartir momentos únicos. Que alegría haber coincidido.

A mis compañeros de la carrera, amigos con quienes aprendí y con quienes disfruté la vida estudiantil, de Viajes, y conocimientos, de aventuras y desventuras: Sofía, Tania, Sonia, Ana, Juan Salvador, Quetzal, Juan Roberto, Erik, León, Víctor, Isaac, Ángel, Juan Manuel, Paloma, Citlalli, Lilibeth, Alberto, Jessica, John-jon, John Makuley, Gerardo, Itzel, Bárbara, Augusto.

DEDICATORIA

A mis Padres, mis hermanos y mi sobrino.

A toda mi Familia, cercana y lejana.

A los estudiantes de Biología y de cualquier carrera.

A quien esté leyendo esto.

"Der Vogel kämpft sich aus dem Ei. Das Ei ist die Welt. Wer geboren werden will, muß eine Welt zerstören."

-El ave rompe el cascarón. El cascarón es el mundo. Quien quiera nacer, tiene que romper un mundo.

Hermann Hesse.

... A Killercito (+)©

ÍNDICE GENERAL

Índice General.....	i
Índice de Cuadros	iii
Índice de Figuras	v
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	5
Objetivos	7
Objetivo general	7
Objetivos particulares.....	7
Material y Métodos.....	8
Colecta de material	8
Obtención de los extractos y rendimiento	8
Esterilización del látex.....	8
Evaluación de la Actividad Antimicrobiana	9
Actividad Antibacteriana.....	9
Actividad Antifúngica.....	13
Análisis Fitoquímico.....	14
Evaluación de la Actividad Antioxidante.....	14
HPLC.....	15
CG-EM	15
Detección Cualitativa de Metabolitos Secundarios.....	16
Fenoles.....	16
Resultados	17
Colecta de la Planta	17
Rendimiento del Extracto y Fracciones.....	17
Densidad del látex	18
Actividad Antibacteriana	18
Evaluación Cualitativa.....	18
Evaluación Cuantitativa.....	24
Actividad Antifúngica	30

Evaluación Cualitativa.....	30
Evaluación Cuantitativa.....	31
Actividad Antioxidante.....	37
Detección Cualitativa de Metabolitos Secundarios.....	38
Análisis Mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).	39
Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.....	45
Discusión.....	51
Conclusiones.....	72
Perspectivas.....	73
Apéndices.....	74
Apéndice 1. Descripción Botánica de <i>Jatropha rzedowskii</i> Jiménez-Ramírez.	74
Apéndice 2. Zona de Colecta.....	77
Apéndice 3. Técnica de Maceración.....	81
Apéndice 4. Método de Difusión en Agar o de Kirby Baüer (Vanden Berghe Y Vlietinck, 1991).....	82
Apéndice 5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	86
Apéndice 6. Actividad de los Extractos Sobre la Curva de Crecimiento Bacteriano (Muroi <i>et al.</i> , 1993).....	88
Apéndice 7. Método Cualitativo de Inhibición del Crecimiento Radial (Wang y Bun, 2002).....	89
Apéndice 8. Método Cuantitativo de Inhibición del Crecimiento Radial (WANG Y BUN, 2002).....	90
Apéndice 9. Método de Reducción del Radical 2, 2- Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) (Modificado de Murillo, 2006).	91
Apéndice 10. Espectros de Luz Ultravioleta.....	95
Apéndice 11. Estadística Descriptiva.....	111
Referencias.....	113

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cepas de bacterias Gram positivas.	9
Cuadro 2. Cepas de bacterias Gram negativas.	10
Cuadro 3. Cepas de Hongos Filamentosos.	13
Cuadro 4. Cepas de Hongos Levaduriformes	13
Cuadro 5. Datos de colecta.	17
Cuadro 6. Rendimiento del extracto y fracciones.	17
Cuadro 7. Densidad del látex.	18
Cuadro 8. Actividad antibacteriana de <i>J. rzedowskii</i> sobre cepas Gram positivas.	19
Cuadro 9. Actividad antibacteriana de <i>J. rzedowskii</i> sobre cepas Gram negativas.	20
Cuadro 10. Valores de CMI y CBM para los extractos y látex de <i>J. rzedowskii</i> .	25
Cuadro 11. Actividad cualitativa de los extractos sobre hongos filamentosos.	30
Cuadro 12. CF_{50} de los extractos de <i>J. rzedowskii</i> para las distintas cepas.	31
Cuadro 13. Valores de CA_{50} para la Catequina y los extractos de <i>J. rzedowskii</i> .	37
Cuadro 14. Características del espectrograma y cromatografía de los compuestos fenólicos detectados en M1 de <i>J. rzedowskii</i> mediante HPLC-DAD.	40
Cuadro 15. Características del espectrograma y cromatografía de los compuestos fenólicos detectados en M2 de <i>J. rzedowskii</i> mediante HPLC-DAD.	

	41
Cuadro 16. Características del espectrograma y cromatografía de los compuestos fenólicos detectados en Lf de <i>J. rzedowskii</i> mediante HPLC-DAD.	43
Cuadro 17. Características del espectrograma y cromatografía de los compuestos fenólicos detectados en Le de <i>J. rzedowskii</i> mediante HPLC-DAD.	44
Cuadro 18. Composición del extracto M1 de <i>J. rzedowskii</i> .	46
Cuadro 19. Composición del extracto M2 de <i>J. rzedowskii</i> .	48
Cuadro 20. Composición del extracto H de <i>J. rzedowskii</i> .	50
Cuadro 21. Concentraciones para preparar las soluciones problema para evaluar la actividad antioxidante.	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfica de Caja de la Actividad Antibacteriana del látex y extractos...	22
Figura 2. Gráfica de Caja de bacterias Gram negativas y positivas.....	22
Figura 3. Gráfica de Caja del tipo bacteriano contra extracto.....	23
Figura 4. Actividad de M1 sobre la curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> C.....	26
Figura 5. Actividad de M1 sobre la Curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> cc.	27
Figura 6. Actividad de Le sobre la Curva de crecimiento de <i>S. epidermidis</i>	28
Figura 7. Actividad de Le sobre la Curva de crecimiento modificada de <i>S. epidermidis</i> . La modificación consistió en una segunda dosis de CBM a las 4 horas.	29
Figura 8. Inhibición del crecimiento radial de <i>F. moniliforme</i> . R^2 de M1 = 0.93; M2 = 0.91; H = 0.92.....	32
Figura 9. Inhibición del crecimiento radial de <i>F. sporotrichoides</i> . R^2 de M1 = 0.86; M2 = 0.95; H = 0.96.....	33
Figura 10. Inhibición del crecimiento radial de <i>R. lilacina</i> . R^2 de M1 = 0.96; M2 = 0.97; H = 0.92.	34
Figura 11. Porcentaje de Inhibición en <i>T. mentagrophytes</i> . R^2 de M1 = 0.92; M2 = 0.95; H = 0.97.	35
Figura 12. Inhibición del crecimiento radial de <i>A. niger</i> con M2 . R^2 = 0.77.	36
Figura 13. Inhibición del crecimiento radial de <i>Aspergillus. sp</i> con H . R^2 = 0.85.36	
Figura 14. Análisis de Regresión lineal de la Actividad Antioxidante de Extractos	

de *J. rzedowskii* y Catequina con la fórmula y el coeficiente de determinación. Valores inversos. R^2 para **M1**= 0.98; **M2** = 0.98; **Lf** = 0.99; **Le** =0.98; Catequina = 0.98. 37

Figura 15. Prueba colorimétrica para detectar fenoles..... 38

Figura 16. Cromatograma del Extracto **M1** (Crudo) de *J. rzedowskii*..... 40

Figura 17. Cromatograma del Extracto **M2** (Libre de Compuestos No Polares) de *J. rzedowskii*..... 42

Figura 18. Cromatograma del Látex **Lf** (fresco) de *J. rzedowskii*. 43

Figura 19. Cromatograma del Látex **Le** (esterilizado) de *J. rzedowskii*..... 44

Figura 20. *Jatropha rzedowskii*. A, rama con flores; B, flor estaminada; C, flor pistilada. Tomada de Jiménez, 1985..... 75

Figura 21. *J. rzedowskii*, en campo, tomada de Reyes, 2004. 76

Figura 22. Detalle de la flor de *J. rzedowskii*, tomada de Reyes, 2004. 76

Figura 23. Mapa topográfico de la reserva de Tehuacán Cuicatlán. 77

RESUMEN

Endémica de México y localizada en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, Estado de Puebla, *Jatropha rzedowskii* Jiménez-Ramírez (Euphorbiaceae) no posee reportes fitoquímicos de actividad biológica. El látex fresco (**Lf**) y esterilizado (**Le**), los extractos MeOH crudo (**M1**), libre de compuestos no polares (**M2**) y hexánico (**H**) se probaron contra bacterias por difusión en agar Kirby-Baüer; las CMI y CBM se determinaron mediante microdilución en caldo Koneman. En hongos se evaluó la inhibición del crecimiento radial y la CF_{50} con el método de Wang y Bun. La actividad antioxidante se evaluó por reducción del DPPH. Se hicieron análisis mediante HPLC (excepto extracto **H**) y GC-MS (excepto látex. **Lf** y **Le**). Los extractos y el látex poseen actividad inhibidora sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. El látex **Le** tiene efecto bactericida, con dos dosis, sobre *S. epidermidis* (CBM = 4 mg/mL). La cepa fúngica más sensible fue *T. mentagrophytes* (CF_{50} = 0.46 mg/mL de **H**). El látex **Lf** reduce el DPPH a CA_{50} = 6 μ g/mL. Los extractos **M1** y **M2** contienen varios compuestos fenólicos, mientras que **H** posee diferentes ácidos grasos metil-éster. Se determinaron precursores de hidroxycumarinas en **Lf** y **Le**. La actividad antifúngica, antibacteriana, antioxidante, así como la caracterización química cualitativa del látex y extractos de *J. rzedowskii* son reportadas por primera vez.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de su historia la humanidad ha sorteado múltiples dificultades en pro de la supervivencia. Padecimientos que en siglos pasados fueron causa de grandes epidemias todavía hoy cobran la vida de millones de personas en el mundo. La Organización Mundial de la Salud menciona que las infecciones por microorganismos patógenos (principalmente bacterias y hongos) ocupan la tercera causa de muerte en el mundo, sobre todo en países con altos índices de marginación, en vías de desarrollo (OMS, 2010).

Hasta hoy el tratamiento más común para combatir las infecciones es la antibioterapia, y desde su implementación, nuestra calidad y esperanza de vida han mejorado notablemente. Sin embargo, las bacterias han adquirido resistencia, estimulada por el uso inapropiado de los antibióticos y la falta de cooperación del cuerpo médico para aceptar medidas que restrinjan y controlen la prescripción indiscriminada, que también ha sido un factor determinante (Wood, 2003, citado por Prada, 2008).

Dicho de otro modo, por el mal uso de los antibióticos se seleccionan cepas de microorganismos resistentes e incrementan su tasa de mutación, acelerando la variabilidad genética y aumentando sus posibilidades de adquirir resistencia. Cada nuevo antibiótico que se introduce en el mercado, genera, paulatinamente, cepas resistentes (Baquero *et al.*, 2002).

Debido a esta situación existe un creciente interés popular y científico por las plantas superiores como fuente de agentes antimicrobianos y pesticidas (Mitscher *et al.*, 1987).

El reino vegetal posee diversas especies que producen sustancias de alto interés biológico. Muchas son analizadas constantemente en relación a su potencial farmacológico (ya sea que posean propiedades antiinflamatorias, hipotensoras, hipoglucémicas, amebicidas, anti-fertilidad, citotóxicas, antibióticas, anti-Parkinson, etc.) (Trease y Evans, 1991).

Actualmente la utilización de compuestos puros aislados, incluyendo fármacos sintéticos, está bien difundida; no obstante, ha renacido el interés de la ciencia médica por los sistemas fitoterapéuticos que utilizan recursos vegetales para remediar múltiples afecciones, fundamentando su eficacia, en parte, en la acción biológica de sus componentes químicos. Por ello, son objeto de considerable atención científica las plantas utilizadas en la medicina tradicional de países como India, China y México (Trease y Evans, 1991).

Existen diferentes criterios para abordar la investigación de las plantas medicinales, aunque de manera particular podemos resumirlos en etnobotánicos, ecológicos, y quimiotaxonómicos. No obstante, los límites entre estos no siempre se mantienen y la combinación entre algunos es posible (Abreu y Cuellar, 2008). En el primero, la selección de especies se hace con base a la documentación, investigación y recopilación del conocimiento tradicional, avalado por el uso reportado en la comunidad original de un área específica, donde el quehacer

terapéutico se combina, a veces, con implicaciones espirituales y mágico-religiosas (Fabricant y Farnsworth, 2001). De acuerdo a Cox y Balick (1994) y Cordell (2000) este método permite seleccionar eficientemente de entre un gran número de especies, pues sería imposible destinar recursos al estudio de todas y cada una de las especies vegetales existentes en el planeta (Canales, 2005).

El criterio ecológico tiene en cuenta los mecanismos de adaptación que guardan las diferentes especies respecto a su hábitat. Dicha capacidad les permite soslayar exitosamente diversos factores bióticos y abióticos, que de otra forma resultarían limitantes. Así, a partir de la observación de estas interacciones se puede seleccionar, en determinado número de especies, las posibles capacidades biológicas de sus metabolitos, aplicando métodos de estudio utilizados en modelos ecológicos (Maureen, 1997).

Finalmente, el criterio quimiotaxonómico consiste en la sistematización de las relaciones filogenéticas de los diferentes taxa y las rutas de síntesis metabólica mediante las que se forman los diferentes compuestos o metabolitos. La presencia de cierta clase de compuestos es empleada por los botánicos como marcadores en estudios de taxonomía, pero también sirve como herramienta en la selección exitosa de familias, subfamilias y géneros, para ser investigados en función del tipo de metabolitos que producen. Por ello, se pueden seleccionar especies bien relacionadas filogenéticamente con actividad conocida o que contienen el mismo tipo de entidad química conocida por su actividad (Vuorela *et al.*, 2004). Este criterio se utiliza muchas veces en conjunto con los 2 primeros.

ANTECEDENTES

Descrito por Linneo hace 275 años, quien lo incluyó en la gran familia Euphorbiaceae, una de las más importantes entre las plantas superiores y a cuyas especies se les atribuye múltiples efectos curativos desde tiempos inmemoriales, el género *Jatropha* (del griego ἰατρός; iatros = médico y τροφή; trophé = alimento) está constituido por cerca de 175 especies (Martínez *et al.*, 2002), las cuales se encuentran discontinuamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo debido a la deriva continental (Dehgan, 1976).

En México se encuentran 45 especies, 35 de las cuales son endémicas; los estados con mayor riqueza son Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Jalisco, Guerrero, Michoacán, Sonora, Sinaloa, Puebla, Nayarit y Tamaulipas (Martínez *et al.*, 2002).

Se trata de hierbas, arbustos y árboles de morfología diversa. Exudan látex amarillo o rojizo, algunas veces turbio, el cual es típicamente tóxico o al menos irritante (Jiménez, 1990).

Este género ha sido estudiado principalmente debido a las distintas propiedades biológicamente interesantes (medicinales, terapéuticas, veterinarias, etc.) del látex, las hojas, el tallo, raíces y semillas (Gübitz *et al.*, 1999). Se conoce su riqueza en diterpenos y triterpenos bioactivos y péptidos cíclicos (Mongkolvisut, *et al.*, 2006). Los rizomas tienen propiedades antibacterianas (Márquez *et al.*, 2005), algunos péptidos cíclicos (apicidinas o ciclosporinas) que tienen actividad anti malaria han sido aislados de *J. mahafalensis* (Baraguey *et al.*, 2000); el

extracto metanólico de hojas de *J. gaumeri* tiene actividad antioxidante (Can-Aké *et al.*, 2004) y para *J. neoupaciflora*, está comprobado su efecto antibacteriano (Canales *et al.*, 2005). En tanto que el látex de *J. curcas* tiene efectos sobre la coagulación de la sangre dependiendo de la dilución del mismo (Osoniyi, 2003).

En una pequeña revisión, se reportan diferentes compuestos aislados de este género, muchos de ellos diterpenos y triterpenos con potencial para desarrollar medicamentos y otros productos (Zhang *et al.*, 2009).

J. rzedowskii es una especie endémica de México y aunque este género ha sido profundamente estudiado, no existe reporte alguno de las propiedades antimicrobianas, antioxidantes o de composición química específicas para *J. rzedowskii*, planta que además es endémica de México de tal suerte, que se planteó esta investigación, aplicando el enfoque Quimiotaxonómico

La descripción botánica de *Jatropha rzedowskii*, según Jiménez-Ramírez (1985) se incluye en el apéndice 1.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica del látex y extractos de *Jatropha rzedowskii*.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el rendimiento de los extractos obtenidos por maceración.
2. Evaluar cualitativamente la actividad antimicrobiana y anti fúngica (método de difusión en agar de Kirby Baüer e inhibición del crecimiento radial).
3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) por el método de microdilución en caldo de los extractos activos.
4. Determinar la actividad bacteriostática o bactericida de los extractos activos, mediante cinética del crecimiento bacteriano.
5. Determinar la Concentración Fungicida Media (CF_{50}) por el método de macrodilución en agar de los extractos que hayan mostrado actividad.
6. Evaluar la actividad antioxidante de los extractos y látex por reducción del DPPH.
7. Caracterizar cualitativamente la composición química del látex y extractos mediante análisis en HPLC y CG-EM.

MATERIAL Y MÉTODOS

COLECTA DE MATERIAL

Tallos, ramas y látex se colectaron en San Rafael, Coxcatlán, Puebla (Apéndice 2). Un espécimen montado se depositó en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (IZTA) para su caracterización botánica. El látex se obtuvo haciendo una pequeña incisión en los entrenudos de las ramas de ejemplares en campo, depositando el exudado en un frasco de vidrio y añadiendo hexanos para evitar su oxidación.

OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS Y RENDIMIENTO

Por medio de maceración con metanol (MeOH) se obtuvo el extracto crudo (**M1**) (Domínguez, 1973) (Apéndice 3). Se hizo una partición de éste, utilizando hexanos y MeOH (1/1) para obtener el extracto no polar (**H**) y la fracción libre de compuestos no polares (**M2**). Se calculó el rendimiento en porcentaje del peso del extracto respecto a la masa de material vegetal (**MV**).

ESTERILIZACIÓN DEL LÁTEX

Se utilizó el látex fresco (**Lf**) y una parte se sometió a esterilización en autoclave (**Le**).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se utilizaron 24 cepas de importancia médica (7 Gram positivas y 17 Gram negativas) donadas por diferentes instancias de investigación a las que se les asignó una abreviatura específica según su origen. El nombre de las cepas y su número según la American Type Culture Collection (ATCC) se detallan en los cuadros 1, 2.

Cuadro 1. Cepas de bacterias Gram positivas.

Bacterias	ATCC	Abreviatura.	Origen
<i>Bacillus subtilis</i>	-	B. s	C
<i>Enterococcus faecalis</i>		E. f	H
<i>Micrococcus luteus</i>	-	M. l	C
<i>Staphylococcus aureus</i> C	12398	S. aC	C
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		S. e	C
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	S. p	H

C, donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán a través de la profesora María de Jesús Sánchez Onofre; H, aisladas de casos clínicos, fueron donadas por el Hospital Los Ángeles (Metropolitano).

Cuadro 2. Cepas de bacterias Gram negativas.

Bacterias	ATCC	Abrev	Origen
<i>Enterobacter aerogenes</i> A	-	E. aA	A
<i>Enterobacter aerogenes</i> C	-	E. aC	C
<i>Enterobacter agglomerans</i>	27155	E. ag	C
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	E. cl	C
<i>Escherichia coli</i> C	25922	E. cC	C
<i>Escherichia coli</i> H	53218	E. cH	H
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	K. p	C
<i>Proteus mirabilis</i> C	-	P. mC	C
<i>Proteus mirabilis</i> H	-	P. mH	H
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> C	-	P. aC	C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> H		P. aH	H
<i>Salmonella thyphimurium</i>		S. t	C
<i>Vibrio cholerae</i> INDRE 206	-	agua	C
<i>Vibrio cholerae</i> cc	-	cc	C
<i>Vibrio cholerae</i> CDC V 12	-	Tor	C
<i>Yersinia enterocolitica</i> A	-	Y. eA	A
<i>Yersinia enterocolitica</i> H	-	Y. eH	H

A, donadas por el laboratorio de análisis de la Clínica Universitaria de Salud Integral (CUSI) de la FES Iztacala; C, donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán a través de la profesora María de Jesús Sánchez Onofre; H, aisladas de casos clínicos, fueron donadas por el Hospital Los Ángeles (Metropolitano). *Vibrio cholerae* INDRE 206 (aislada de agua contaminada), *Vibrio cholerae* cc (aislada de un caso clínico correspondiente al grupo 01, productor de enterotoxinas, serotipo Inaba, biotipo El Tor), *Vibrio cholerae* CDC V 12.

PRUEBA CUALITATIVA

Se realizaron pruebas de difusión en agar Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) utilizando sensidiscos (SSD) impregnados con 2 mg de extracto. Los controles consistieron en SSD con 25 µg de Cloranfenicol (Control +) y con 10

μL de MeOH (que se dejó evaporar; Control -). Todos los bioensayos fueron por triplicado. El mismo método se aplicó a las levaduras (Apéndice 4).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Consistió en obtener las medidas descriptivas (Media, desviación estándar, cuartiles: 1, 2, 3 y coeficiente de variación) (Apéndice 11) de los halos generados por extracto, cepa bacteriana y tipo de cepa bacteriana (Gram positivas y Gram negativas), así mismo se elaboraron diagramas de caja.

ESTADÍSTICA INFERENCIAL

Consistió en aplicar a los datos obtenidos de la actividad antibacteriana un análisis de varianza factorial (dos factores) para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos, entre las cepas microbianas, y entre el tipo de cepa bacteriana (Gram positiva y Gram negativa).

El análisis se realizó con el paquete de cómputo estadístico Minitab versión 15.

EVALUACIÓN CUANTITATIVA

Mediante microdilución en Caldo (Koneman, 1996) se determinó la CMI y la CBM, utilizando concentraciones de 6.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL (Apéndice 5).

*ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO
BACTERIANO*

Se evaluó el efecto sobre la curva de crecimiento bacteriano utilizando el método descrito por Muroi (1993). Se determinó el número de impactos y el comportamiento de los extractos analizados mediante el gráfico según Davis *et al.*, (1996) (Apéndice 6).

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Se utilizaron 6 cepas filamentosas y 4 levaduriformes de importancia médica, alimenticia y agropecuaria (cuadros 3, 4).

Cuadro 3. Cepas de Hongos Filamentosos.

Cepas Fúngicas	ATCC/ CDBB-H	Origen
<i>Aspergillus niger</i>	CDBB-H-179	-
<i>Aspergillus sp.</i>	-	Mic
<i>Fusarium moniliforme</i>	-	Fis
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	NRLL3299	Fis
<i>Rhizoctonia lilacina</i>	CDBB-H-306	-
<i>Trychophyton mentagrophytes</i>	CDBB-H-1112	-

Mic, donada por el Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz, laboratorio de microbiología UBIPRO; Fis, donadas por el laboratorio de fisiología vegetal UBIPRO; CDBB, Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares (CINVESTAV).

Cuadro 4. Cepas de Hongos Levaduriformes

Cepas Fúngicas	ATCC/ CDBB-H	Origen
<i>Candida albicans</i>	14065	M
<i>Candida albicans</i>	10231	M
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	M
<i>Candida albicans</i>	caso clinico	A

M, donadas por el laboratorio de Micología y Parasitología de la Facultad de Medicina U.N.A.M. Dr. Rubén López Martínez (responsable) Dra. Patricia Manzano Gayoso. A, aislada de un caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos de la F.E.S. Iztacala.

PRUEBAS CUALITATIVAS

Se probó la inhibición del crecimiento radial según Wang y Bun (2002), utilizando sensidiscos con 2 mg de extracto; sensidiscos con 7 µg de Ketoconazol

y con 10 μ L de MeOH fueron utilizados como controles positivo y negativo, respectivamente. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado (Apéndice 8).

EVALUACIÓN CUANTITATIVA

Mediante microtécnica de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002) se determinó la concentración fungicida media (**CF₅₀**), utilizando 4.0, 3.0, .2.0, 1.0, 0.5, y 0.25 mg/mL de los extractos a probar. Cada bioensayo se realizó por triplicado (Apéndice 8).

ANÁLISIS FITOQUÍMICO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Se probó la capacidad de cada extracto para reducir el radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH) utilizando el método modificado de Murillo (2006). Para determinar la CA₅₀, se evaluaron distintas concentraciones, desde 1 hasta 100 ppm (Yen y Duh, 1994; Canales, 2011) (Apéndice 9).

HPLC

Se hizo la caracterización preliminar de algunos componentes de **Lf**, **Le**, **M1** y **M2**, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés), utilizando una columna Discovery C-18, de 250 x 4.6 mm, tamaño de partícula 5 µm. Corrida isocrática con mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua (25-25-50), flujo de 1 mL/min. Detector de arreglo de diodos (DAD) a longitud de onda de 260 nm con barrido completo de 200-400 nm.

CG-EM

Se realizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para detectar componentes en **M1**, **M2** y **H**. Utilizando el Cromatógrafo de gases Modelo 6850 de Agilent technologies, acoplado a un Espectrómetro de masas modelo 5975C, de la misma marca, con Columna RTX 30 m de largo x 0.25 mm de diámetro con 25 µm de Película. Las condiciones para el extracto **H** fueron temperatura de 250°C, modo de inyección Split; Radio 33.5:1; flujo del split: 29.9 ml/min; flujo de Corrida 35 cm/seg; horno a temperatura inicial: 70°C x 2 minutos, 1a Rampa de calentamiento a 8°C por minuto hasta llegar a 270°C; 2a Rampa de calentamiento a 10°C por minuto, hasta llegar a 280°C durante 6 minutos. Tiempo total: 35 minutos. Línea de transferencia a 290°C. El Espectrómetro de Masas a Ionización por impacto electrónico con energía de 70 eV (electrón Volts); rango de masa: 35 a 600 m/z; barrido completo y Helio como gas de arrastre. Volumen de inyección 1 µL.

Las condiciones para los extractos **M1** y **M2** fueron temperatura de 250°C; modo de inyección Split; radio 80:1; flujo del split: 79.7 mL/mm; flujo de Corrida 37 cm/seg; temperatura inicial del horno de 70°C x 2 minutos; 1a rampa de calentamiento de 8°C por minuto hasta llegar a 270°C; 2a rampa de calentamiento de 10°C por minuto hasta llegar a 280°C, durante 6 minutos. Tiempo total: 35 minutos. Línea de transferencia a 290°C. Espectrómetro de Masas a Ionización por impacto electrónico con energía de 70 eV (electrón Volts); rango de masa: 35 a 600 m/z; barrido completo y Helio como gas de arrastre. Volumen de inyección 1 µL.

DETECCIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS

FENOLES

A una muestra de látex (**Lf** y **Le**) y se le agregó cloruro férrico, que al reaccionar se torna verde oscuro, debido a la presencia de derivados de catecol; precipitados de color azul intenso indican derivados del pirogalol (Domínguez, 1973).

RESULTADOS

COLECTA DE LA PLANTA

Las muestras se colectaron en Agosto del 2010 en la localidad de San Rafael - Coxcatlán, Puebla. En el cuadro 5 se detallan los datos etnobotánicos de acuerdo al herbario IZTA.

Cuadro 5. Datos de colecta.

Familia	Euforbiaceae
Nombre Científico	<i>Jatropha rzedowskii</i>
Nombre Común	'Sangre de Grado'
Forma de Uso	Tópico externo
Parte Utilizada	Látex
No. De Colecta	HCM 56

RENDIMIENTO DEL EXTRACTO Y FRACCIONES

Se utilizaron 5,840 g de material vegetal seco, del cual se obtuvo 115.05 g de extracto **M1** (rendimiento de 1.97%). Los rendimientos de las fracciones **M2** y **H** se calcularon con respecto al total del peso seco del material utilizado (Cuadro 6).

Cuadro 6. Rendimiento del extracto y fracciones.

Extracto	Peso (g)	Rendimiento (%)
M1	115.05	1.97
M2	78.45	1.34
H	36.57	0.62

M1 Extracto Metanólico Crudo; **M2**: Fracción Metanólica Libre de Compuestos No Polares; **H**: Fracción Hexánica.

DENSIDAD DEL LÁTEX

Después ser esterilizado cambió un poco su densidad, sin embargo se mantuvo muy cercana a 1 g/mL. (Cuadro 7).

Cuadro 7. Densidad del látex.

	Densidad (g/ml)
Lf	0.983
Le	1.031

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

EVALUACIÓN CUALITATIVA

Se realizaron en total 216 análisis cualitativos para comprobar la actividad antibacteriana de los distintos extractos y látex sobre las 24 cepas experimentales.

Todos los extractos fueron activos. Las 7 cepas Gram positivas evaluadas fueron sensibles a **M2**, **H**, **Lf** y **Le**; 5 sensibles a **M1**. Trece cepas Gram negativas resultaron sensibles a los extractos.

El látex **Le** presentó actividad en 17 cepas; 10 Gram negativas, como *V. cholerae* agua (aislada de agua contaminada), con halos de inhibición de 13.3 ± 0.5 mm de diámetro en promedio. *E. faecalis*, presentó halos de 12.3 ± 0.5 mm de diámetro, en promedio.

El látex **Lf** fue activo en 16 cepas, 9 Gram negativas. Destacan *S. pneumoniae*, con halos de 12 ± 0 mm y *Y. enterocolitica* A, con halos de 11.6 ± 1.1 mm promedio.

El extracto **M2** fue activo sobre 15 cepas. *P. mirabilis* H (una de las 8 Gram negativas) presentó halos de 13.3 ± 0.8 , mientras que *E. faecalis* presentó halos promedio de 12.5 ± 1 mm.

La partición **H** fue activa en 13 cepas (6 Gram negativas), como *B. subtilis* con halos de 9.8 ± 0.7 mm y *E. coli* con halos de 8.3 ± 0.5 mm.

Finalmente, **M1** presentó actividad sobre 11 cepas, 6 de estas Gram negativas, como *E. coli*, que presentó halos en el orden de 14.6 ± 0.5 mm. En el caso de *M. luteus* los halos fueron de 10 ± 1.7 mm en promedio.

En los cuadros 8 y 9 se muestra a detalle los resultados en cada caso. El control positivo (cloranfenicol) fue activo sobre todas las cepas.

Cuadro 8. Actividad antibacteriana de *J. rzedowskii* sobre cepas Gram positivas.

Cepa	M1	M2	H	Lf	Le	C+
B. s	9.6 ± 0.2	11.6 ± 0.7	9.8 ± 0.7	9.5 ± 0.5	8.3 ± 0.2	28.5 ± 1.4
E. f	s/a	12.5 ± 1	6.3 ± 0.5	9.6 ± 0.5	12.3 ± 0.5	24.0 ± 1.4
M. l	10 ± 1.7	7.1 ± 0.7	6.0 ± 0	10.0 ± 1	9.6 ± 2.5	25.5 ± 0.7
S. aC	8.5 ± 0	6.8 ± 0.4	6.3 ± 0.5	8.6 ± 1.1	9.0 ± 0	27.5 ± 0.7
S. aH	7.0 ± 0	6.0 ± 0	6.0 ± 0	9.6 ± 1.5	9.3 ± 0.5	20.0 ± 0
S. e	7.0 ± 0	6.4 ± 0.2	5.8 ± 0.5	8.5 ± 0.5	9.0 ± 0.5	29.5 ± 0
S. p	s/a	7.5 ± 1	8.0 ± 1	12.0 ± 0	9.0 ± 1.7	30.0 ± 0

Longitud promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición \pm la desviación estándar; (-), no presentó actividad; B. s, *B. subtilis*; E. f, *E. faecalis*; M. l, *M. lutea*; S. aC, *S. aureus* C; S. aH, *S. aureus* H; S. e, *S. epidermidis*; S. p, *S. pneumoniae*; s/a, sin actividad.

Cuadro 9. Actividad antibacteriana de *J. rzedowskii* sobre cepas Gram negativas.

Cepa	M1	M2	H	Lf	Le	C+
E. aA	7.0±0	6.0±0	s/a	9.0±1	9.0±0	22.0±0
E. aC	7.0±0	6.0±0	s/a	s/a	6.3±0.5	22.0±0
E. agg	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	24.5±0. 7
E. cl	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	25.5±0. 7
E. cC	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	27.5±2.1
E. cH	14.0±0.5	9.5±0.8	8.3±0. 5	8.6±0.5	11.6±1.5	35.0±0
K. p	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	26.0±0
P. mC	s/a	12±1.2	5.0±0	s/a	7.6±0.5	17.5±0.7
P. mH	s/a	13.3±0.8	5.0±0	7.6±0.5	12.0±2	14.5±0.7
P. aC	7.0±0	s/a	s/a	9.3±0.5	s/a	22.5±0. 7
P. aH	7.0±0	s/a	s/a	9.3±0.5	s/a	22.5±0. 7
S. t	s/a	s/a	s/a	s/a	s/a	22.0±0
agua	s/a	6.8±0.7	5.3±0. 5	9.3±0.5	13.3±0.5	22.0±0
cc	7.6±0.5	6.1±0.4	6.0±0	9.0±1	8.3±1.5	25.0±0
Tor	s/a	6.1±0.7	6.0±0	s/a	11.3±1.5	23.5±0. 7
Y. eA	s/a	s/a	s/a	11.6±1.1	7.3±0.5	23.5±0. 7
Y. eH	s/a	s/a	s/a	s/a	6.0±0	20.0±0

Longitud promedio en mm del diámetro de los halos de inhibición ± la desviación estándar;(-), no presentó actividad; E. aA, *E. aerogenes* A; E. aC, *E. aerogenes* C; E. cl, *E. cloacae*; E. cC, *E. coli* C; E. cH, *E. coli* H; K. p, *K. pneumoniae*; Pan, *P. agglomerans*; P. mC, *P. miriabilis* C; P. mH, *P. miriabilis* H; P. aC, *P. aeruginosa* C; P. aH, *P. aeruginosa* H; S. t, *S. thyphimurium*; agua, *V. cholerae* INDRE 206 (aislada de agua contaminada); cc, *V. cholerae* (aislada de un caso clínico correspondiente al grupo 01, productor de enterotoxinas, serotipo Inaba, biotipo El Tor); Tor, *V. cholerae* CDC V 12; Y. eA, *Y. enterocolitica* A; Y. eH, *Y. enterocolitica* H; s/a sin actividad.

Según el análisis estadístico aplicado a estos datos, los extractos y látex de *J. rzedowskii* presentaron medianas en halos de inhibición sobre las diferentes cepas bacterianas ensayadas, de 5 mm para **H**, de 9 mm para **Lf** y **Le**; de 0 mm para **M1** y de 6 mm para **M2**, independientemente del tipo de cepa bacteriana (fig. 1). Así, de acuerdo al análisis estadístico ANOVA factorial, existieron diferencias significativas entre las actividades antibacterianas de los extractos ($F = 26.39$, $P = 0.0$).

Tomando en cuenta el tipo Gram positivas y Gram negativas, resultaron más sensibles las primeras (mediana de 8 mm) que las segundas (mediana de 6 mm), lo cual se puede observar en la fig. 2. El análisis estadístico demostró diferencias significativas ($F = 36.81$, $P = 0.0$).

El análisis de los datos de acuerdo al tipo Gram positivo o negativo, contra diferentes extractos corrobora lo expuesto anteriormente; conviene apuntar que para cepas Gram positivas, el extracto **M2** presentó datos más cercanos a la mediana (7 mm), aun con casos extremos, al igual que **H**, (mediana de 6 mm). Hablando de bacterias Gram negativas, las medianas de cada extracto fueron, en general, más bajas que para Gram positivas, como se puede observar en la fig. 3. Estadísticamente se mantienen las diferencias significativas entre los extractos cuando se toma en cuenta el tipo de cepa bacteriana ($F = 16.36$, $P = 0.0$).

Cabe mencionar también que estadísticamente existieron diferencias significativas entre cepas bacterianas ($F = 13.38$, $P = 0.0$).

En el apéndice 11 se incluyen las tablas con los datos obtenidos del análisis.

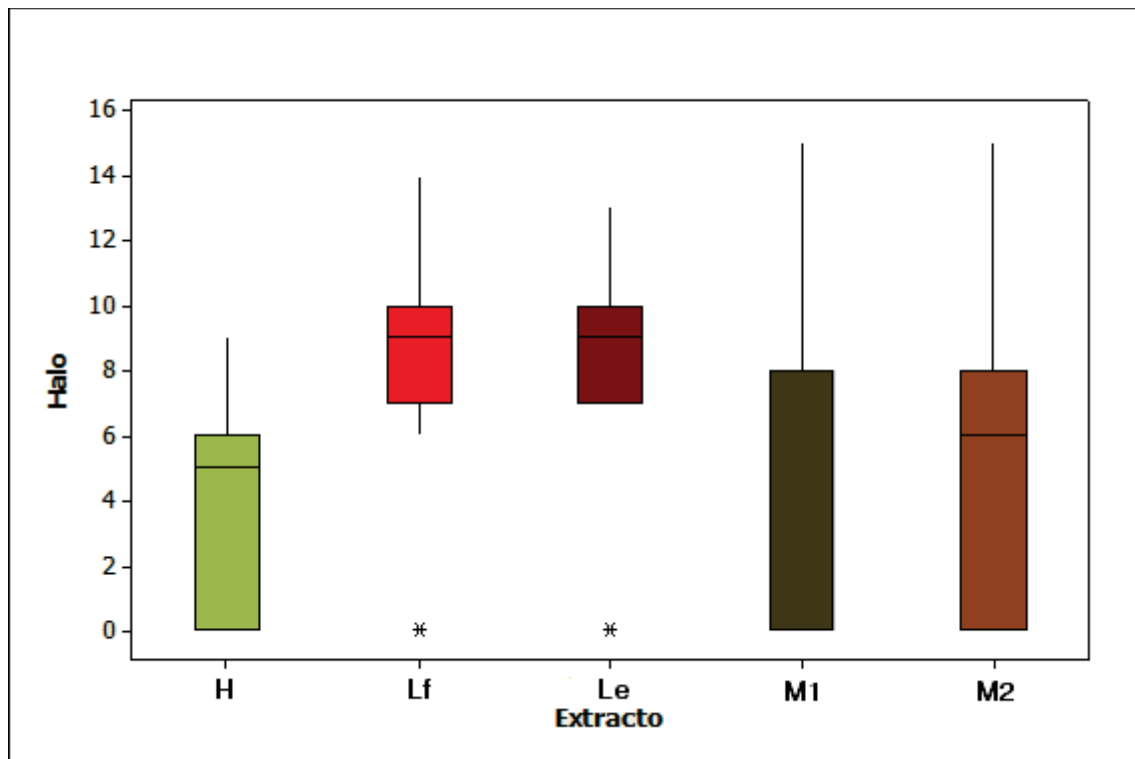


Figura 1. Gráfica de Caja de la Actividad Antibacteriana del látex y extractos.

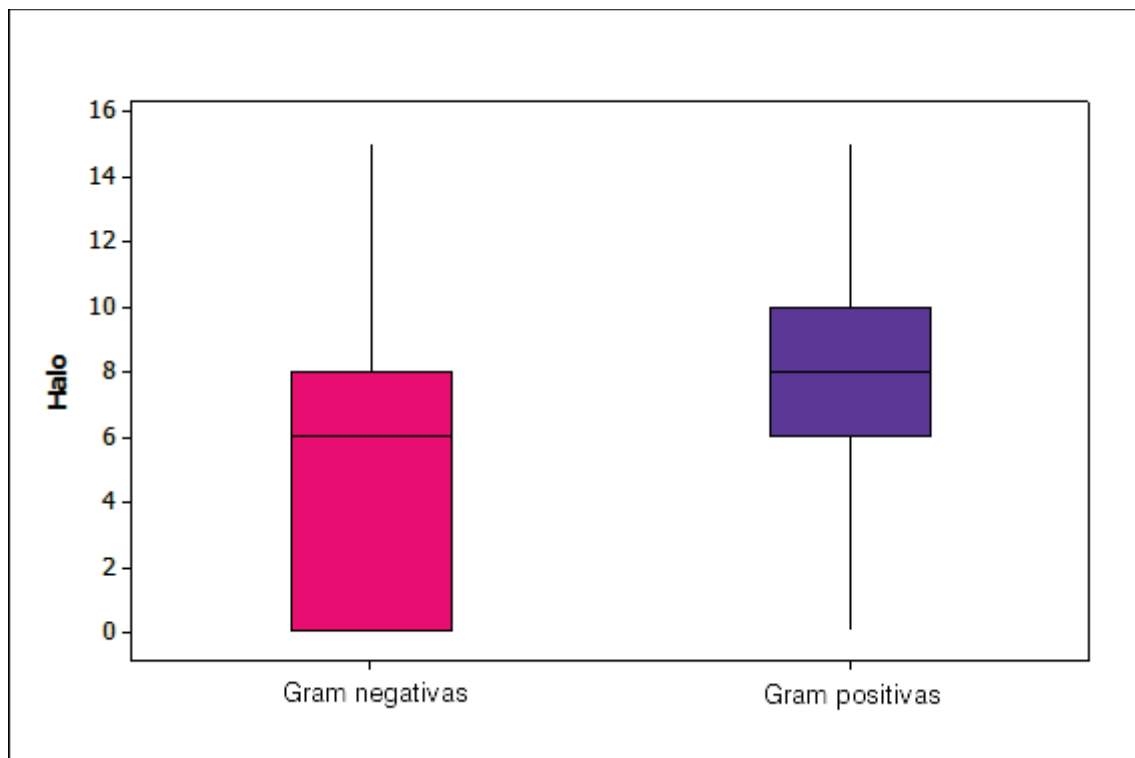


Figura 2. Gráfica de Caja de bacterias Gram negativas y positivas.

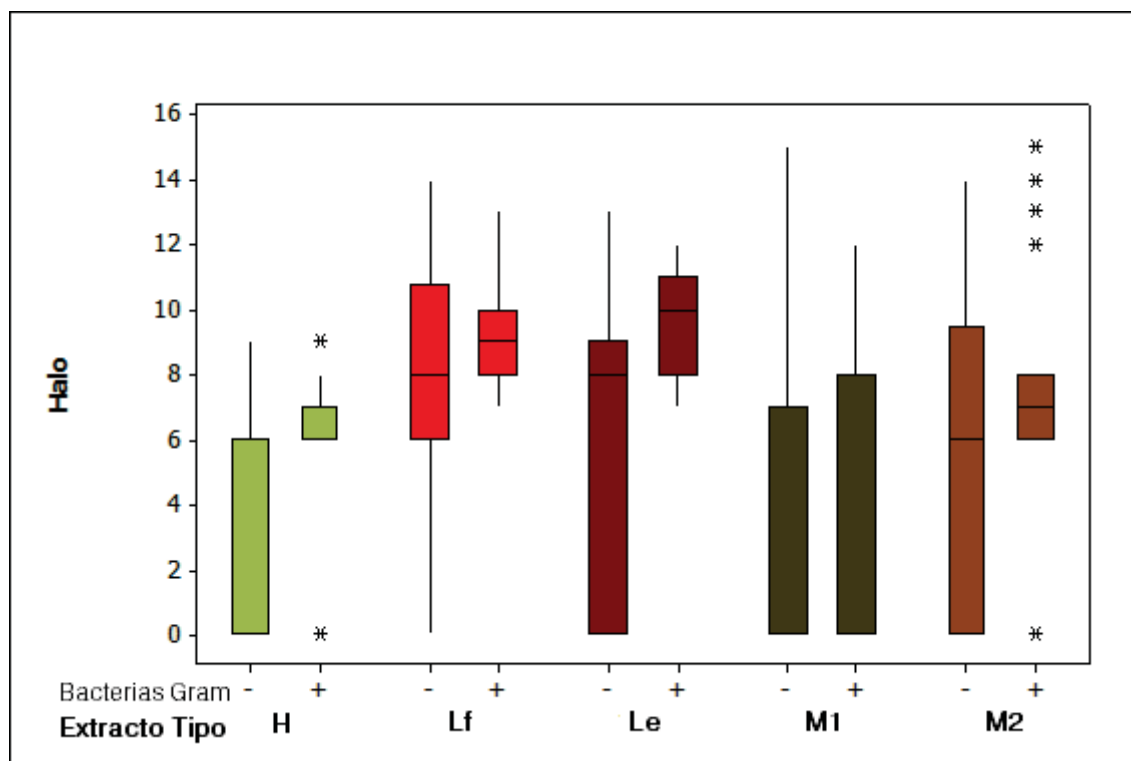


Figura 3. Gráfica de Caja del tipo bacteriano contra extracto.

EVALUACIÓN CUANTITATIVA

El extracto MeOH crudo (**M1**) resultó altamente efectivo contra *S. aureus* C (CBM =4.0, CMI = 0.25 mg/mL) y *B. subtilis* (CBM = 2.0, CMI = 1.0 mg/mL) con concentraciones relativamente bajas para inhibir su desarrollo. Este mismo extracto también inhibe fuertemente cepas de bacterias Gram negativas como *V. cholerae* cc (CBM = 0.25, CMI = 0.125 mg/mL), *E. coli* H (CBM = 4.0, CMI = 0.25 mg/mL) y *E. aerogenes* A (CBM = 4.0, CMI = 1.0 mg/mL).

Las CBM y CMI del extracto libre de compuestos no polares (**M2**) para *M. luteus* fueron de 4.0 y 2.0 mg/mL, respectivamente. Para *P. miriabilis* C y *V. cholerae* agua la CBM fue de 1.0 mg/mL y la CMI de 2.0 mg/mL.

La partición hexánica (**H**), efectiva sobre *M. luteus* (CBM de 2.0 y CMI de 1.0 mg/mL) y *E. coli* (CBM < 6.0, CMI 2.0 mg/mL), requiere valores mayores en CMI y CBM para establecer claramente la contención en el desarrollo de las otras cepas experimentales (CMI > 6.0, CBM>> 6.0 mg/mL).

La cepa bacteriana Gram positiva *B. subtilis* resultó más susceptible respecto a las demás cepas en interacción con el látex fresco de *J. rzedowskii* (**Lf**), siendo inhabilitada a CMI 1.0 y CBM 2.0 mg/mL. Aquí cabe mencionar que *E. coli* H, *Y. enterocolitica* A, *M. luteus* y *S. epidermidis* resultaron menos sensibles (CMI 2.0; CBM 4.0 mg/mL). Algo similar ocurrió con el látex esterilizado (**Le**) puesto que *M. luteus*, *S. epidermidis*, *Y. enterocolitica* H y *E. coli*, fueron sensibles todas a CMI de 2.0 y CBM de 4.0 mg/mL.

Las cepas bacterianas *E. faecalis* y *P. mirabilis* H se mostraron poco sensibles a todo extracto. Es importante mencionar que *M. luteus* (Gram positiva) y *E. coli* (Gram negativa) presentaron sensibilidad importante a la mayoría de las sustancias probadas (cuadro 10).

Cuadro 10. Valores de CMI y CBM para los extractos y látex de *J. rzedowskii*.

Bacteria	M1		M2		H		Lf		Le	
	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM	CMI	CBM
B. s	0.5	2.0	4.0	6.0	>6.0	>>6.0	1.0	2.0	4.0	6.0
E. f	n/a-	n/a-	4.0	6.0	>6.0	>>6.0	6.0	>6.0	6.0	>6.0
M. l	n/a-	n/a-	2.0	4.0	1.0	2.0	2.0	4.0	2.0	4.0
S. aC	0.25	4.0	4.0	6.0	>6.0	>>6.0	>6.0	>>6.0	6.0	>6.0
S. e	2.0	4.0	4.0	6.0	>6.0	>>6.0	2.0	4.0	2.0	4.0
E. aA	1.0	4.0	2.0	6.0	n/a-	n/a-	6.0	>6.0	6.0	>6.0
E. cH	0.25	4.0	4.0	>6.0	2.0	>6.0	2.0	4.0	2.0	4.0
P. mC	n/a-	n/a-	2.0	4.0	n/a-	n/a-	n/a-	n/a-	4.0	6.0
P. mH	n/a-	n/a-	6.0	>6.0	>6.0	>>6.0	6.0	>6.0	4.0	6.0
P. aC	2.0	4.0	n/a-	n/a-	n/a-	n/a-	4.0	6.0	n/a-	n/a-
agua	n/a-	n/a-	2.0	4.0	6.0	>6.0	4.0	6.0	4.0	6.0
cc	0.125	0.25	4.0	6.0	>6.0	>>6.0	6.0	>6.0	6.0	>6.0
Tor	n/a-	n/a-	2.0	6.0	>6.0	>>6	n/a-	n/a-	6.0	>6.0
Y. eA	n/a-	n/a-	n/a-	n/a-	n/a-	n/a-	2.0	4.0	2.0	6.0
Y. eH	n/a-	n/a-	n/a-	n/a-	n/a-	n/a-	n/a-	n/a-	2.0	4.0

Concentración en mg/mL; n/a, no alcanzada.

Dados los datos obtenidos en este ensayo, y la importancia médica de que poseen, se determinó que las cepas indicadas para valorar y caracterizar el efecto inhibitorio de **M1** sobre la curva de crecimiento, debían ser *S. aureus* C y *V. cholerae* cc; para **Le**, *S. epidermidis* y *E. coli* H.

EFFECTO DE M1 SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

El extracto **M1** resultó ser bacteriostático sobre *S. aureus* C y sobre *V. cholerae* cc en todas las concentraciones probadas (fig. 4, 5).

En un principio, el efecto de CBM (4.0 mg/mL) tiende a inhibir el desarrollo de *S. aureus* C; sin embargo, el efecto se atenúa a las 4 horas, aunque mantiene el desarrollo del patógeno, notablemente, por debajo de la pauta del crecimiento Testigo, hasta el final del ensayo. En comparación, CMI (0.25 mg/mL) y 1/2 CMI tienen un efecto similar; no obstante, a las 24 horas el mismo parece diluirse (fig. 4).

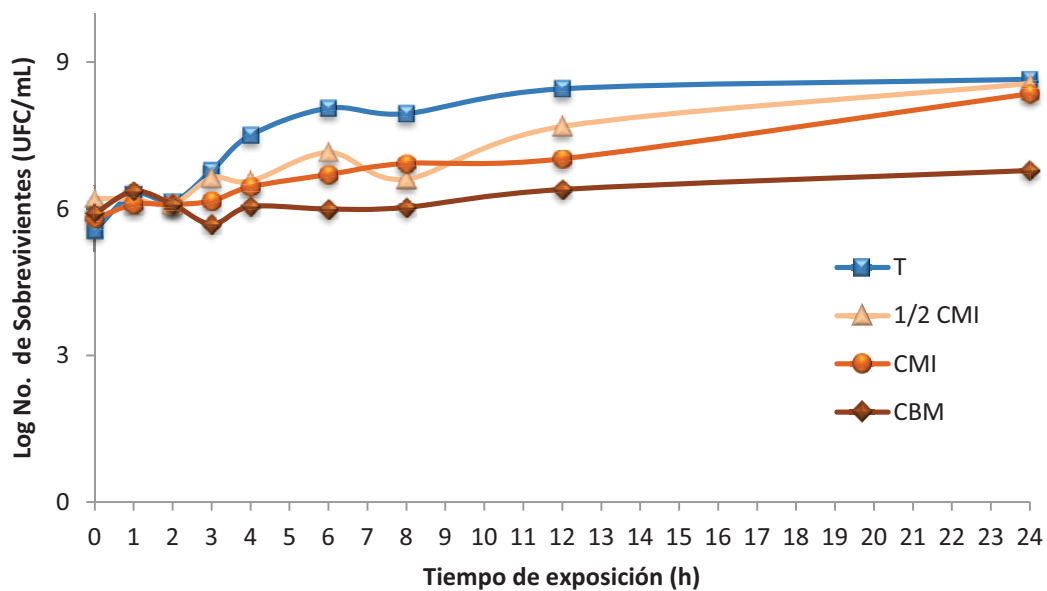


Figura 4. Actividad de **M1** sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* C.

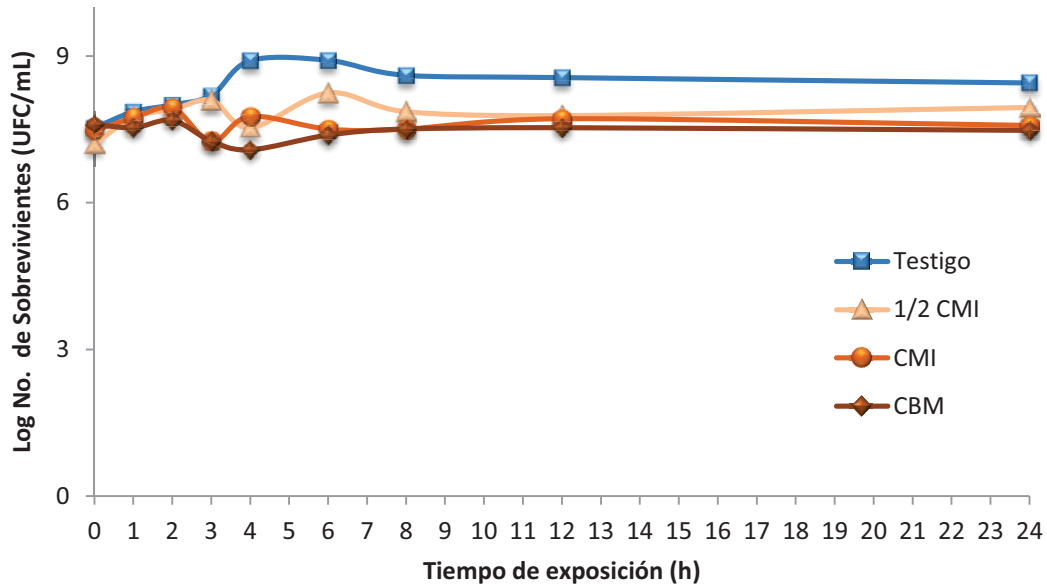


Figura 5. Actividad de M1 sobre la Curva de crecimiento de *V. cholerae* cc.

De la misma manera, la CBM para *V. cholerae* cc (0.25 mg/mL) muestra la pauta de crecimiento más baja, misma que se mantiene durante todo el ensayo; aunque se observa la tendencia a inhibir claramente el desarrollo del patógeno hasta pasadas cuatro horas, luego de lo cual sólo evita el despunte de la población. En cualquier caso, todas las concentraciones reducen la tasa de crecimiento de este patógeno y mantienen la población debajo del Testigo (CMI = 0.13 mg/mL) (fig. 5).

EFFECTO DE *Le* SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

La CBM de *Le* para *S. epidermidis* (4.0 mg/mL) muestra la pauta de crecimiento más baja, misma que se mantiene durante todo el ensayo aunque con repuntes a las 2 y 8 horas. Aunque en menor medida, tanto CMI (2.0 mg/mL) como ½ CMI mantienen inhibido el crecimiento de esta cepa, siendo CMI más efectiva. De cualquier forma, todas las concentraciones inhiben el desarrollo, manteniendo la tasa de crecimiento de este patógeno por debajo del Testigo, lo que se traduce en un efecto bacteriostático (fig. 6).

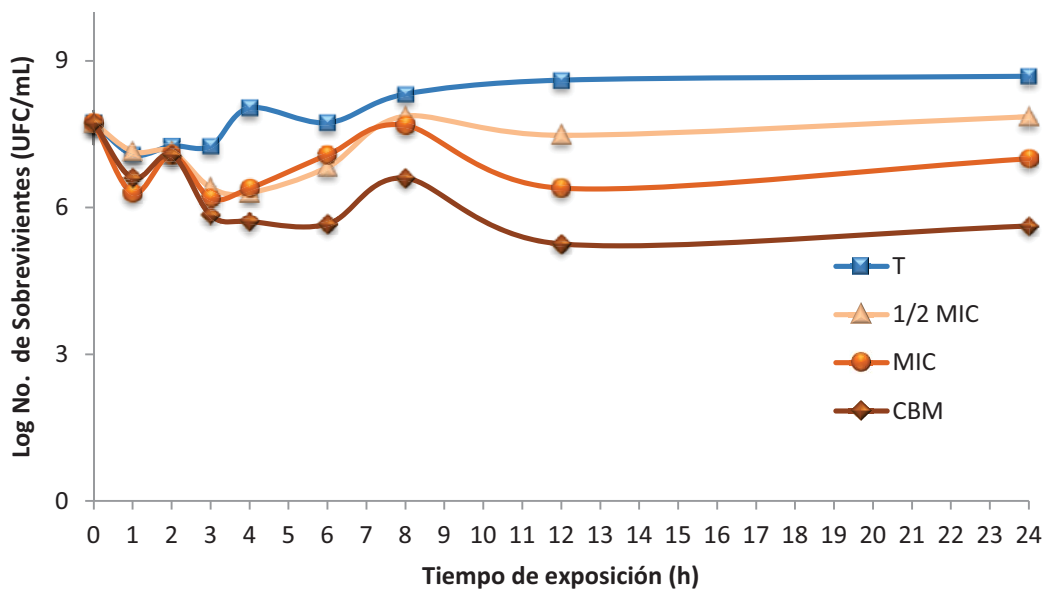


Figura 6. Actividad de *Le* sobre la Curva de crecimiento de *S. epidermidis*.

Debido a la tendencia inicial que muestra *Le* de inhibir el desarrollo de *S. epidermidis*, se decidió realizar un segundo ensayo, con una dosis adicional de CBM a las 4 hrs del inicio del experimento. De esta forma el efecto fue bactericida a las 24 hrs, mientras que para las demás concentraciones continuó el efecto bacteriostático; aunque es de resaltar que en esta ocasión disminuyó la tasa de

crecimiento del patógeno tanto en CMI como en $\frac{1}{2}$ CMI. Proyectando hacia el eje de las abscisas la línea de la CBM, se puede determinar que la actividad de **Le** es de impactos múltiples, ya que a proyectar la línea de crecimiento bajo la concentración de CBM, se observa una intersección con el eje de las "y" en un valor de 9.9 (fig. 7).

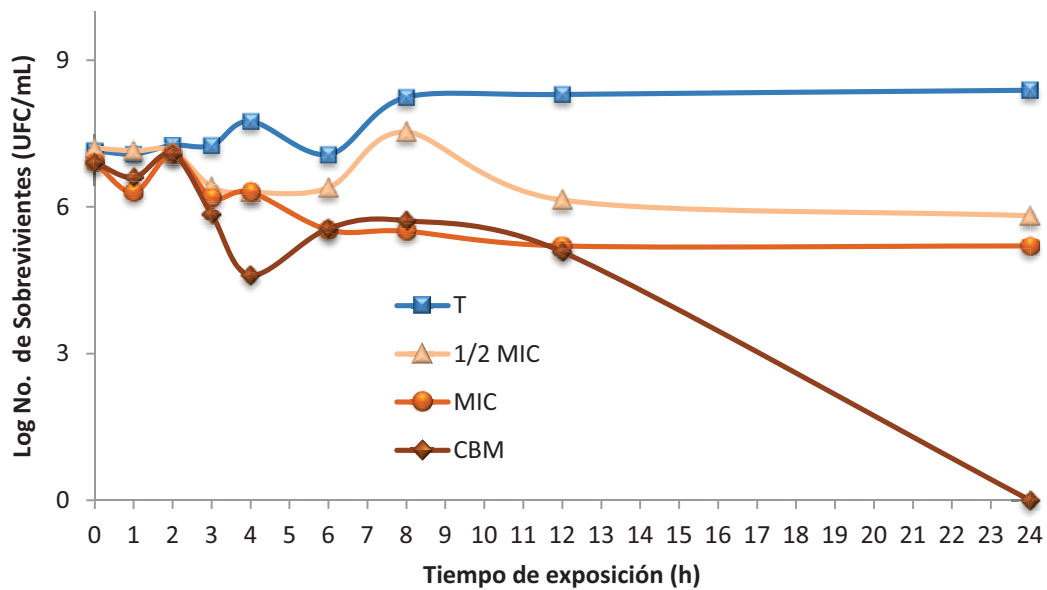


Figura 7. Actividad de **Le** sobre la Curva de crecimiento modificada de *S. epidermidis*. La modificación consistió en una segunda dosis de CBM a las 4 horas.

Los resultados del ensayo hecho sobre la curva de crecimiento de la cepa Gram negativa *E. coli* H, no permitieron definir claramente efecto o actividad alguna del látex.

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

EVALUACIÓN CUALITATIVA

Los extractos **M1**, **M2** y **H** fueron activos, cada uno, en al menos 4 de las cepas de hongos filamentosos. El látex no tuvo actividad (cuadro 11). Ninguno de los extractos o látex de *J. rzedowskii* presentó actividad sobre hongos levaduriformes.

Cuadro 11. Actividad cualitativa de los extractos sobre hongos filamentosos.

Cepas Fúngicas	M₁	M₂	H
A. n	-	+	-
A. sp	-	-	+
F. m	+	+	+
F. s	+	+	+
R. l	+	+	+
T. m	+	+	+

Todas las cepas fueron sensibles al Ketoconazol.+, Activo; -, No activo.

EVALUACIÓN CUANTITATIVA

La CF_{50} más baja registrada (0.46 mg/mL) corresponde al extracto **H** sobre *T. mentagrophytes*, seguida de **M1** sobre *R. lilacina* (0.94 mg/mL) y sobre *F. moniliforme* (1.16 mg/mL). El valor más alto corresponde a **M2** contra *A. niger* (4.77 mg/mL) (cuadro 12).

Cuadro 12. CF_{50} de los extractos de *J. rzedowskii* para las distintas cepas.

Cépa Fúngicas	M1 CF_{50} (mg/mL)	M2 CF_{50} (mg/mL)	H CF_{50} (mg/mL)	Ketoconazol CF_{50} (μ g/mL)
A. n	-	4.77	-	15.3
A. sp	-	-	3.98	9.76
F. m	1.16	1.82	2.7	7.55
F. s	2.36	3.13	2.2	3.9
R. l	0.94	3.47	3.11	21.56
T. m	1.36	1.92	0.46	1.17

(-) No activo.

ACTIVIDAD SOBRE *Fusarium moniliforme*

En la fig. 8 se observa el gráfico del comportamiento de las diferentes actividades de los extractos sobre este hongo, se puede notar que bajas concentraciones de **M1** llegan a inhibir de manera importante, lo que no ocurre a concentraciones más elevadas. Para **M2** y **H** el efecto es paulatino; la mayor concentración utilizada no llegó a inhibir al 100%.

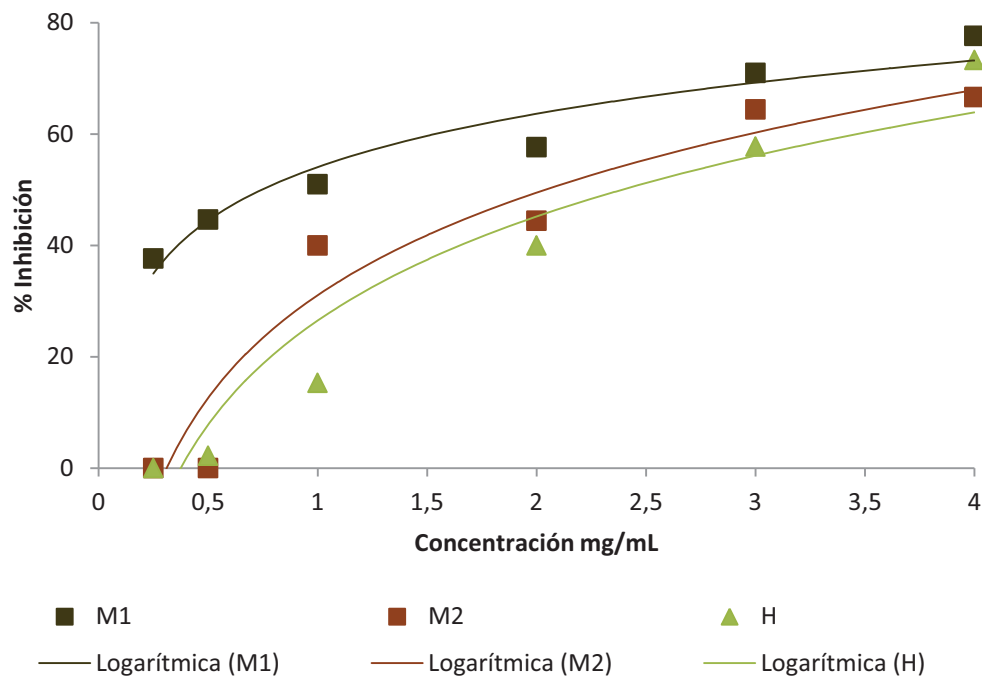


Figura 8. Inhibición del crecimiento radial de *F. moniliforme*. R^2 de **M1** = 0.93; **M2** = 0.91; **H** = 0.92.

ACTIVIDAD SOBRE *Fusarium sporotrichoides*

Al igual que el caso anterior, Los tres extractos tuvieron efecto similar, aunque la mayor concentración utilizada no logró inhibir el 100% del crecimiento micelial (fig. 9).

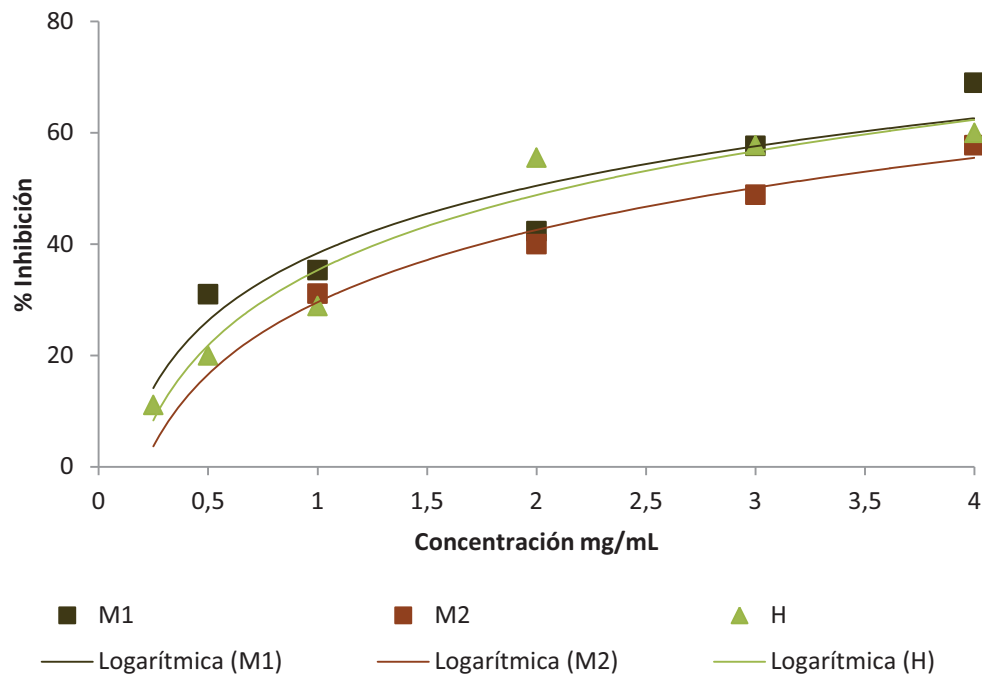


Figura 9. Inhibición del crecimiento radial de *F. sporotrichoides*. R^2 de M1= 0.86; M2 = 0.95; H = 0.96.

ACTIVIDAD SOBRE *Rhizoctonia lilacina*

La sensibilidad a los extractos fue diferente en este caso, pues mientras que **M1** presenta mayor porcentaje de inhibición, **M2** y **H**. fueron poco activos (fig. 10).

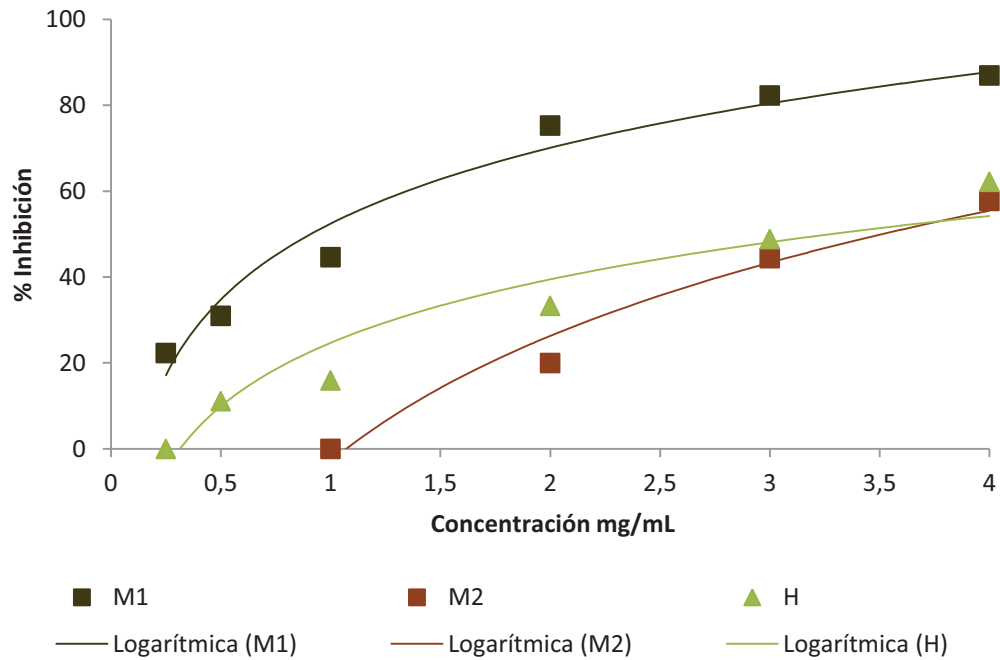


Figura 10. Inhibición del crecimiento radial de *R. lilacina*. R^2 de **M1**= 0.96; **M2** = 0.97; **H** = 0.92.

ACTIVIDAD SOBRE *Trychophyton mentagrophytes*

En esta prueba se logró inhibir al 100% el crecimiento micelial de *T. mentagrophytes*, además, dicha inhibición se alcanza a solo 3 mg/mL, con **H** y **M1**, mientras que **M2** lo hace a 4 mg/mL (fig. 11).

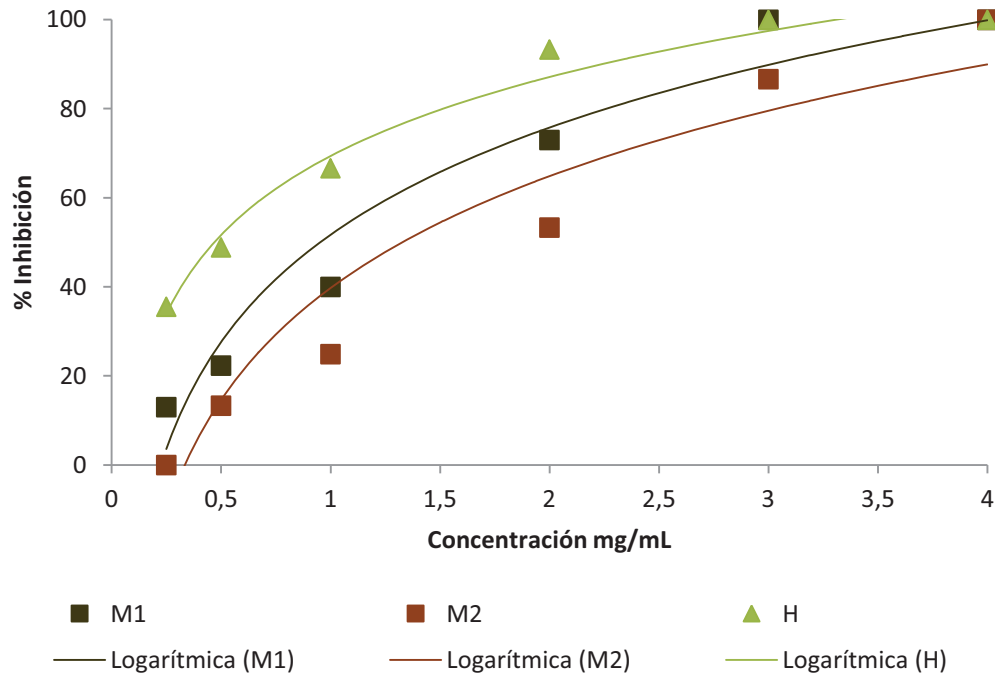


Figura 11. Porcentaje de Inhibición en *T. mentagrophytes*. R^2 de **M1** = 0.92; **M2** = 0.95; **H** = 0.97.

ACTIVIDAD SOBRE *Aspergillus sp.* Y *A. niger*

Sólo **M2** inhibió el crecimiento de *A. niger*, y de manera particular se necesitó la mayor concentración para lograr conseguir valores por arriba de CF_{50} . Para *Aspergillus sp.*, que fue sensible sólo a **H**, se necesitó la dosis de 4 mg/mL para obtener más del 50% de inhibición del crecimiento de este patógeno (fig. 12, 13).

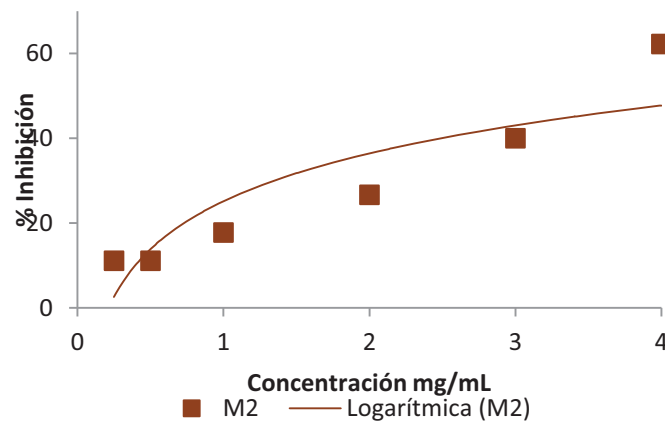


Figura 12. Inhibición del crecimiento radial de *A. niger* con **M2**. $R^2 = 0.77$.

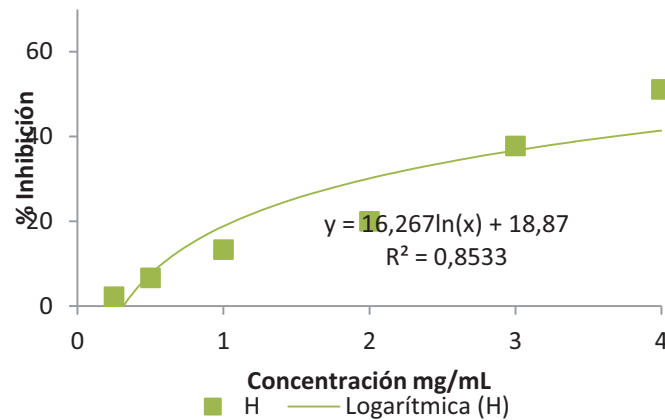


Figura 13. Inhibición del crecimiento radial de *Aspergillus. sp* con **H**. $R^2 = 0.85$.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Los valores de CA_{50} calculados para cada extracto se muestran en el cuadro 13. El látex de *J. rzedowskii* presenta la mayor capacidad antioxidante, sobre todo **Lf** ($CA_{50} = 6 \mu\text{g/mL}$), aunque **Le** también posee notable aptitud para reducir el DPPH ($CA_{50} = 10.5 \mu\text{g/mL}$). En contraste, **M1** y **M2** presentaron menor afinidad al radical ($CA_{50} = 18.5 \mu\text{g/mL}$ y $28.7 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). Se calculó una CA_{50} de $4.3 \mu\text{g/mL}$ para la Catequina (fig. 14)

Cuadro 13. Valores de CA_{50} para la Catequina y los extractos de *J. rzedowskii*.

Extracto	CA_{50}
M1	18.5
M2	28.7
Lf	6.0
Le	10.5
Catequina	4.3

Valores en $\mu\text{g/mL}$.

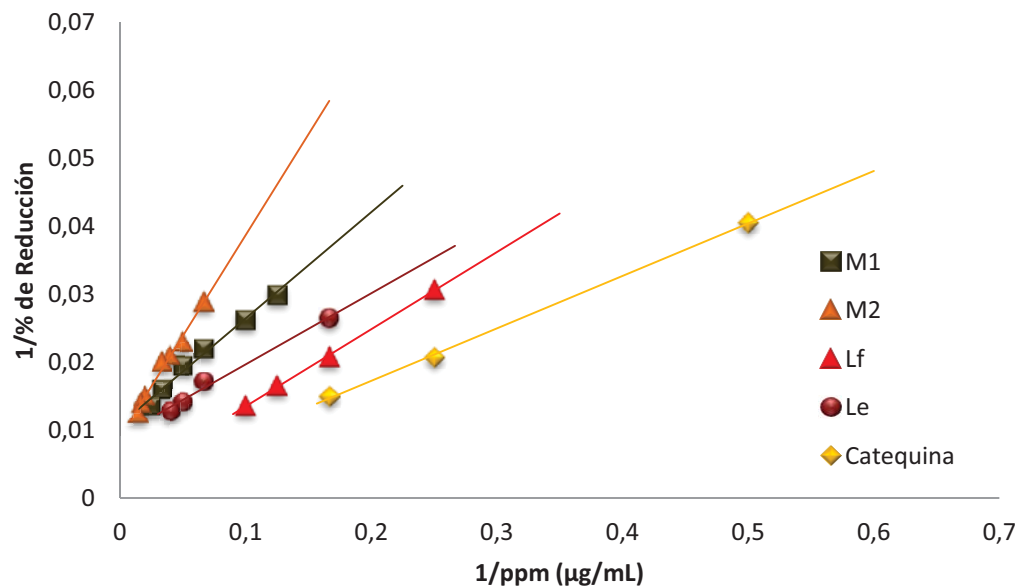


Figura 14. Análisis de Regresión lineal de la Actividad Antioxidante de Extractos de *J. rzedowskii* y Catequina con la fórmula y el coeficiente de determinación. Valores inversos. R^2 para **M1**= 0.98; **M2** = 0.98; **Lf** = 0.99; **Le** =0.98; Catequina = 0.98.

DETECCIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS

De acuerdo a las pruebas cualitativas hechas al látex de *J. rzedowskii*, resultaron positivos a la presencia de fenoles, acorde a la coloración de la reacción con cloruro férrico (fig. 15).

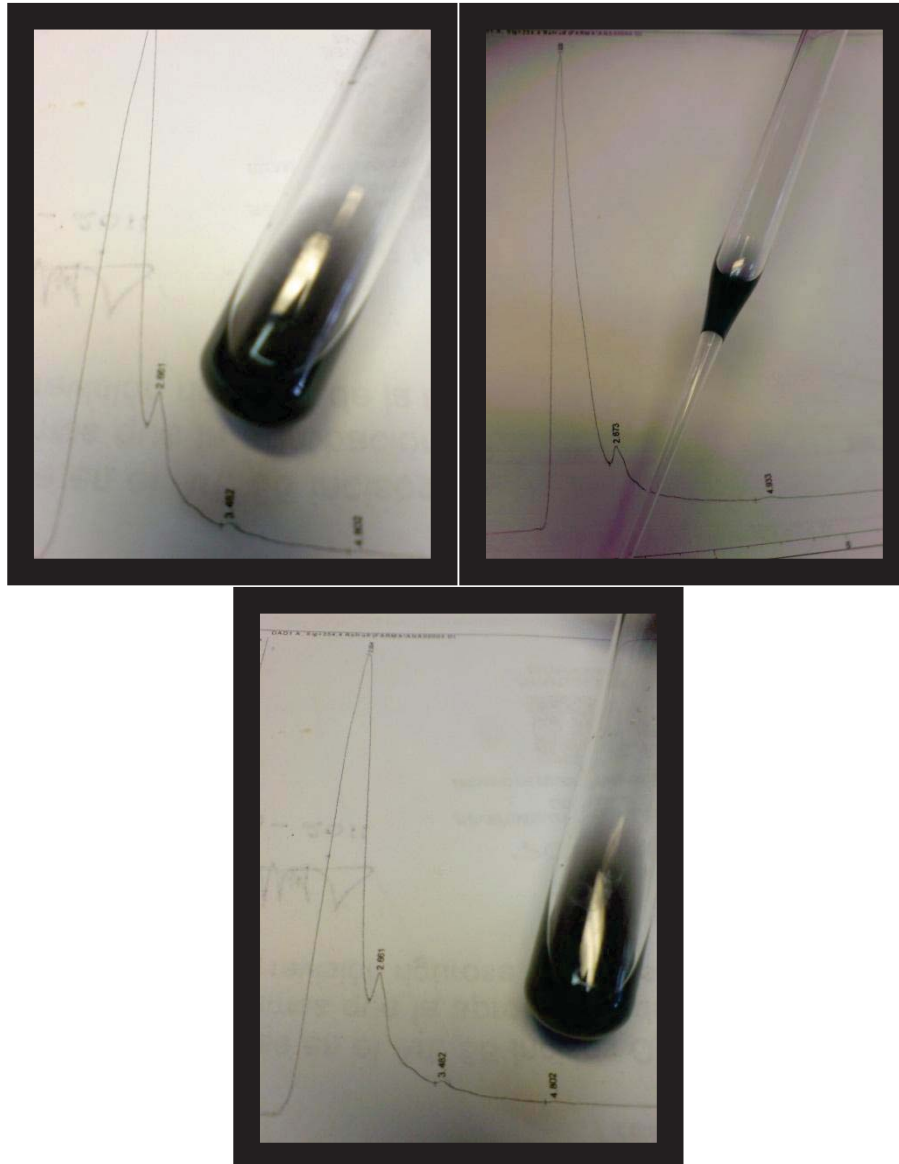


Figura 15. Prueba colorimétrica para detectar fenoles.

ANÁLISIS MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

La interpretación del análisis hizo posible reconocer al menos 5 grupos de compuestos fenólicos en los diferentes extractos y látex de *Jatropha rzedowskii*. En los cromatogramas (fig. 16-19) se observan los picos de absorción de las diferentes muestras sometidas a análisis. En el apéndice 10 están los espectros de luz UV de cada uno de compuestos detectados. En los cuadros 14-17 se muestran los datos característicos para cada extracto estudiado. En las muestras se observan compuestos fenólicos que tienen características similares (tiempo de retención, forma y espectros de absorción) a grupos fenólicos según lo reportado por Trease y Evans (1991).

Así, para el caso de **M1**, se encontraron 7 compuestos de acuerdo a los picos de absorción observados (fig. 16). Tales compuestos corresponden a 4 derivados de Fenol, un derivado de Flavananol y un derivado de Flavonoide (cuadro 14).

Cuadro 14. Características del espectrograma y cromatografía de los compuestos fenólicos detectados en M1 de *J. rzedowskii* mediante HPLC-DAD.

Pico	TR (min)	UV λ max (nm)	Compuesto Fenólico Asignado
1	1.713	276	Derivado de Fenol
2	2.674	216, 280	Derivado de Flavananol
3	2.967	276	Derivado de Fenol
4	3.054	276	Derivado de Fenol
5	3.267	276	Derivado de Fenol
6	3.980	256, 364	Derivado Flavonoide

(TR) tiempo de retención expresado en minutos. (UV λ max) Máximo de Absorción en el espectro UV expresado en nanómetros.

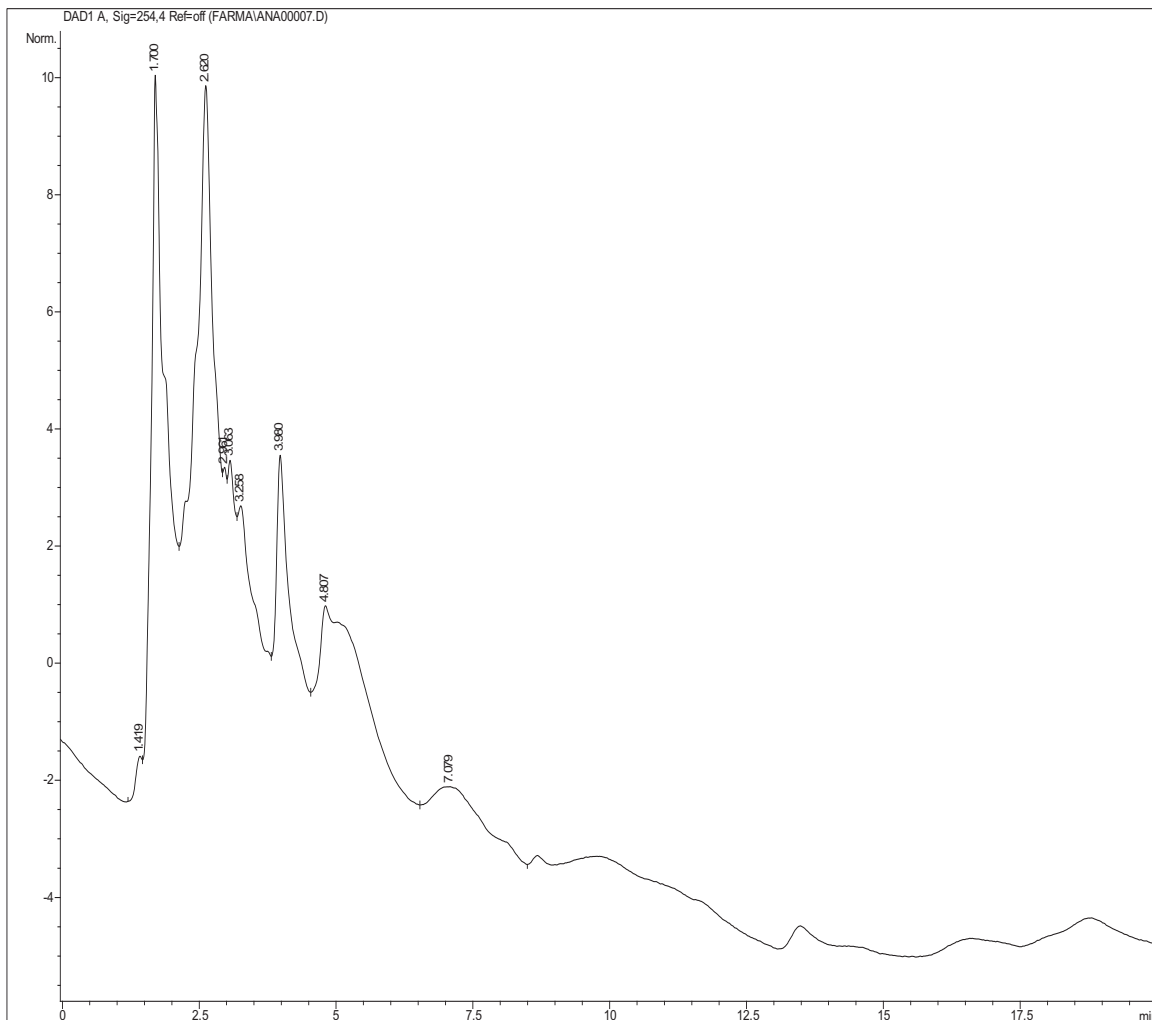


Figura 16. Cromatograma del Extracto M1 (Crudo) de *J. rzedowskii*.

Sin embargo, para **M2**, la situación es distinta, ya que se pueden observar al menos 20 picos de absorción en el Cromatograma (fig.17), 11 de los cuales corresponden a compuestos derivados de Fenoles, derivado de Flavananol, un derivado de Ácido Fenólico, otro de Flavonoide, un derivado del Ácido Hidroxicinámico y un derivado de Flavanona (Isoflavona)(cuadro 15).

Cuadro 15. Características del espectrograma y cromatografía de los compuestos fenólicos detectados en **M2** de *J. rzedowskii* mediante HPLC-DAD.

Pico	TR (min)	UV λ max (nm)	Compuesto Fenólico Asignado
1	1.895	276	Derivado de Fenol
2	2.428	212, 278	Derivado de Flavananol
3	3.228	274	Derivado de Fenol
4	4.042	256	Derivado de Ácido Fenólico
5	4.815	236, 284	Derivado de Flavonoide
10	7.228	278	Derivado de Fenol
11	7.675	278	Derivado de Fenol
12	8.295	278	Derivado de Fenol
13	8.775	230, 318	Derivado de Ácido Hidroxicinámico
17	13.742	242, 370	Derivado de Flavanona (Isoflavona)
18	14.628	290	Derivado de Fenol

(TR) tiempo de retención expresado en minutos. (UV λ max) Máximo de Absorción en el espectro UV expresado en nanómetros.

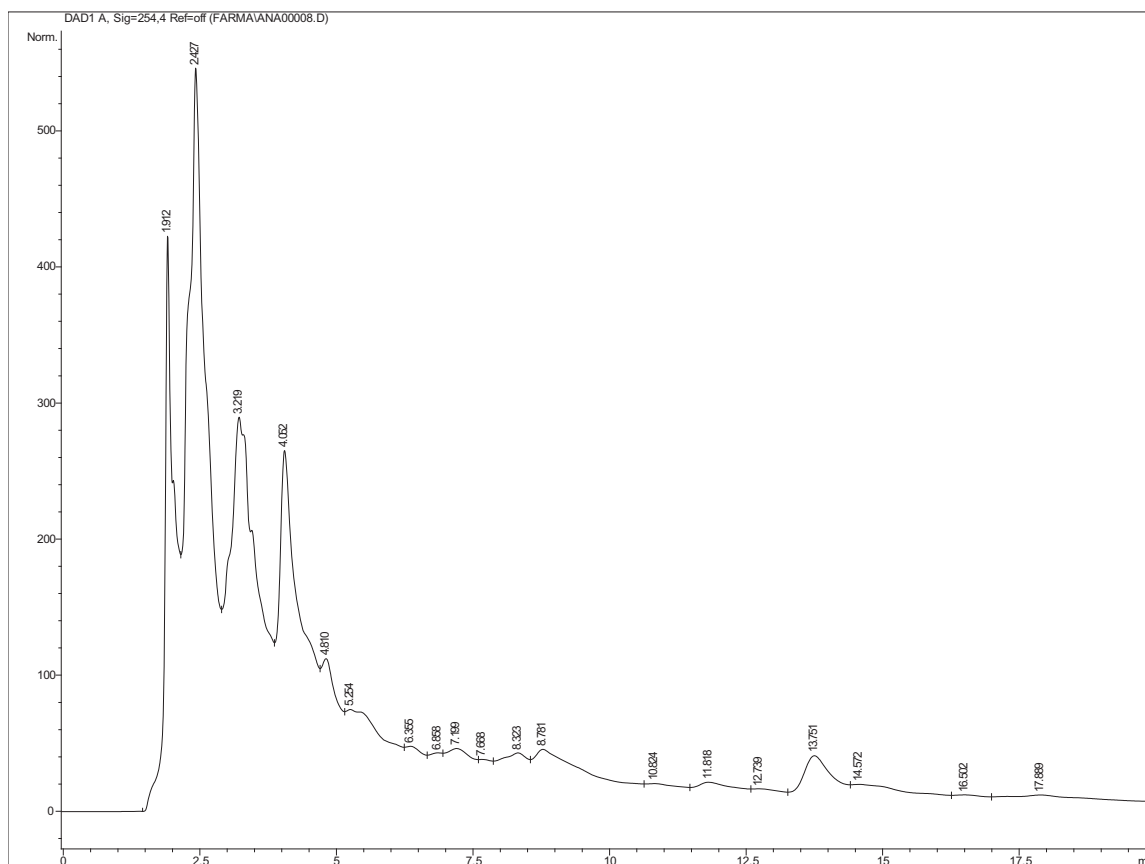


Figura 17. Cromatograma del Extracto **M2** (Libre de Compuestos No Polares) de *J. rzedowskii*.

En el caso de **Lf** se determinaron 3 compuestos, correspondientes a un derivado de Quinona y dos derivados de Fenoles (fig. 18; cuadro 16). En cambio para **Le** se logró inferir la presencia de 4 tipos de compuestos, correspondientes a un derivado Cumarínico y tres derivados de Fenol, según se observa en el cromatograma (fig. 19; cuadro 17). En el apéndice 9 se incluyen los espectros de absorción de luz UV correspondientes a cada compuesto detectado.

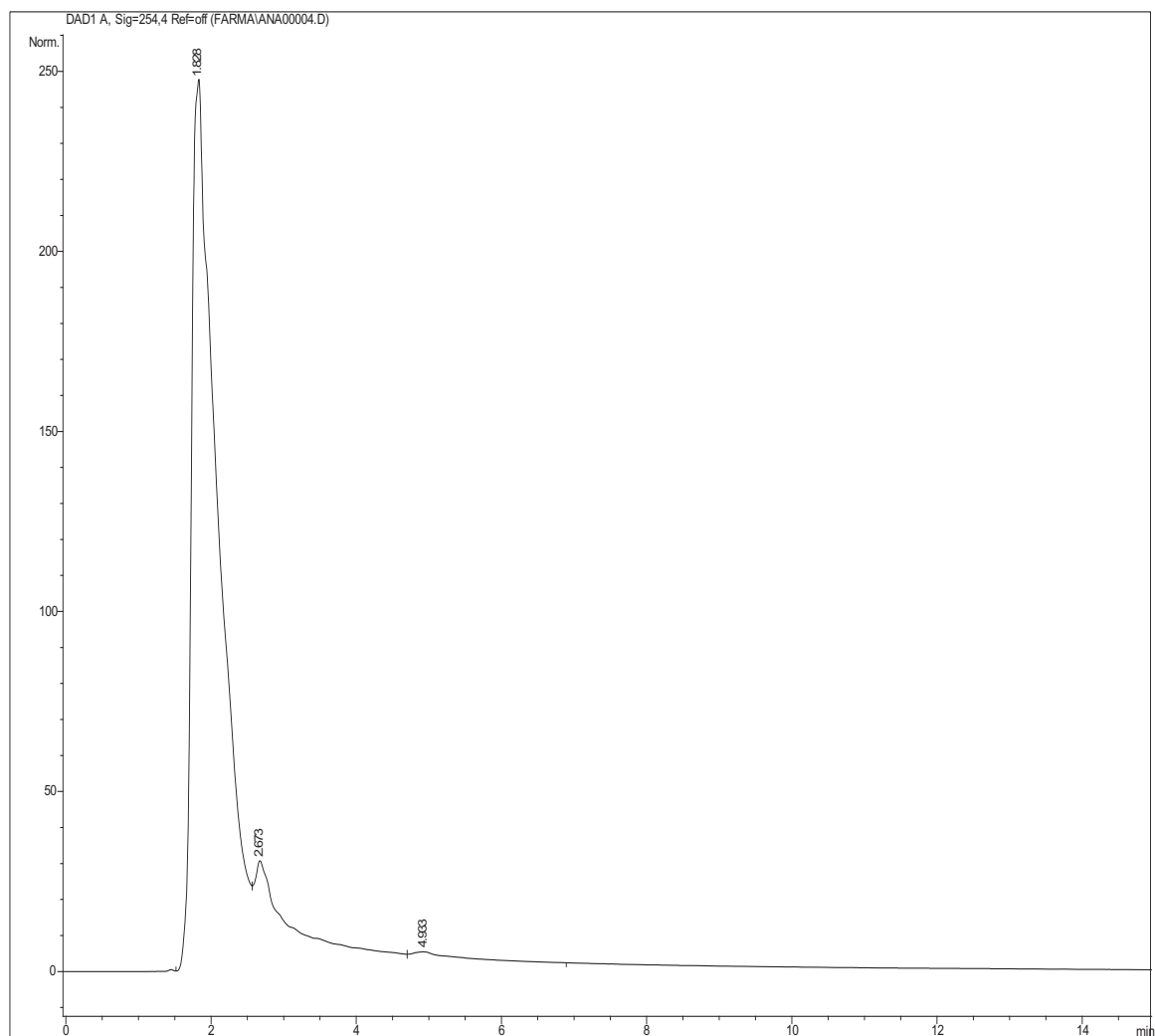


Figura 18. Cromatograma del Látex Lf (fresco) de *J. rzedowskii*.

Cuadro 16. Características del espectrograma y cromatografía de los compuestos fenólicos detectados en Lf de *J. rzedowskii* mediante HPLC-DAD.

Pico	TR (min)	UV λ max (nm)	Compuesto Fenólico Asignado
1	1.806	276	Derivado Quinona
2	2.672	272	Derivado Fenólico
3	4.899	274	Derivado Fenólico

(TR) tiempo de retención expresado en minutos. (UV λ max) Máximo de Absorción en el espectro UV expresado en nanómetros.

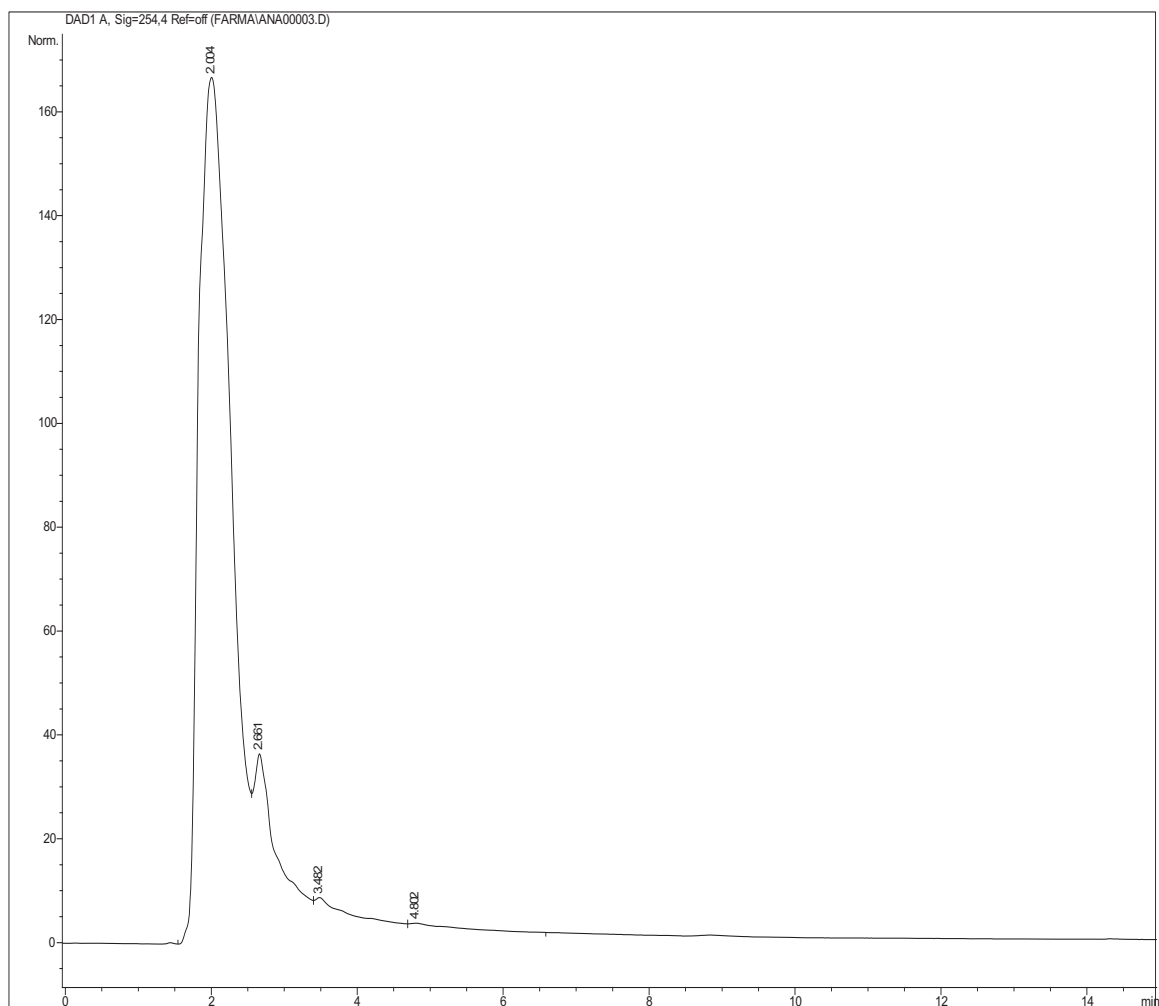


Figura 19. Cromatograma del Látex **Le** (esterilizado) de *J. rzedowskii*.

Cuadro 17. Características del espectrograma y cromatografía de los compuestos fenólicos detectados en **Le** de *J. rzedowskii* mediante HPLC-DAD.

Pico	TR (min)	UV λ max (nm)	Compuesto Fenólico Asignado
1	1.984	274	Derivado Cumarínico
2	2.658	272	Derivado Fenólico
3	3.484	276	Derivado Fenólico
4	4.804	274	Derivado Fenólico

(TR) tiempo de retención expresado en minutos. (UV λ max) Máximo de Absorción en el espectro UV expresado en nanómetros.

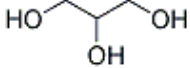

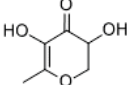
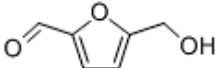
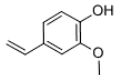
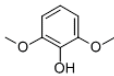
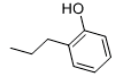
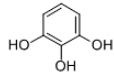
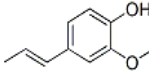

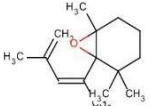

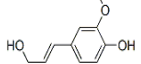
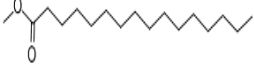


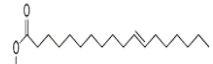

CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTRÓMETRÍA DE MASAS


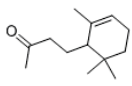
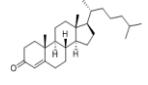

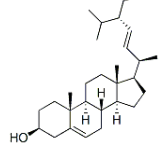
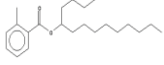
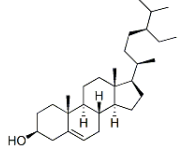
Los resultados de este análisis aplicado a **M1**, **M2** y **H**, demuestran la existencia de ciertos compuestos en los distintos extractos analizados de *J. rzedowskii*. De manera preliminar podemos decir que **M1** se compone principalmente de Gama Sitosterol (49.484%). Están presentes de manera importante otros compuestos como el Stigmasterol, el ácido Palmítico, Alcohol Coniferílico, el Pirogalol, y Glicerinas (cuadro 18).

El extracto **M2** se compone principalmente de Isoeugenol, ácido 4 acetamidobutírico, Pirogalol, Alcohol Coniferílico, y ácido palmítico (cuadro 19).

La fracción **H** presenta compuestos de naturaleza terpénica apolar como B – Sitostenona, Gama- Sitosterol, Stigmasteról, Lupenona y 5 α estigmastano-3, 6-diona (cuadro 20).

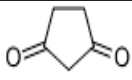
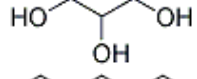
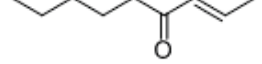
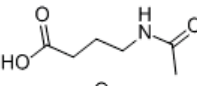
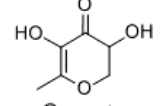
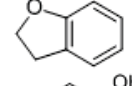
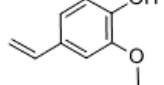
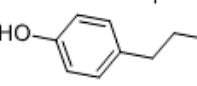
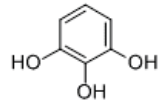
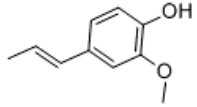
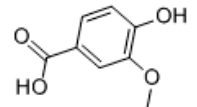
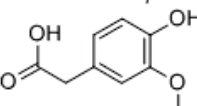
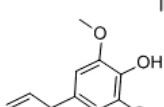
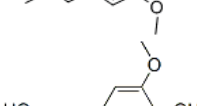
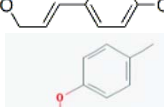
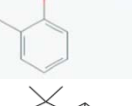
Cuadro18. Composición del extracto M1 de *J. rzedowskii*.

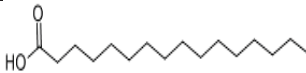
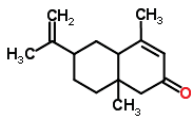
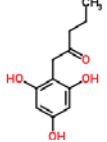
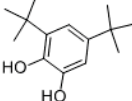
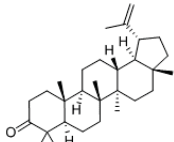
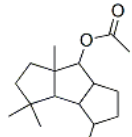
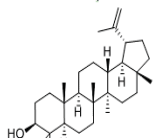
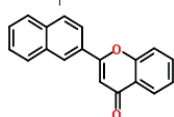
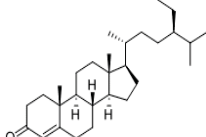
No.	Nombre (Inglés)	Nombre (Español)	TR	%	Estructura Química
2	Glycerin	Glicerina	4.742	1.307	
4	Furan, 2,3-dihydro-3-methyl	2,3-dihidro 3, metil furano	7.167	0.904	
5	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	2,3-dihidro-3, 5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona,	7.520	1.259	
6	Furancarboxaldehyde, 5-(hydroxymethyl)	5- hidroximetil 2- furancarboxaldehido	8.732	1.036	
7	2-Methoxy-4-vinylphenol	2-metoxi-4-vinilfenol	9.990	2.958	
8	2,6-Dimethoxyphenol	2,6-dimetoxifenol	10.490	0.974	
9	Phenol, 2-propyl	2- propilfenol	10.760	1.114	
10	1,2,3-Benzenetriol	Pirogalol	10.888	4.053	
11	Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)-(E)-	Isoeugenol	11.799	1.172	
12	Alloaromadendrene	Aloaromadrendreno	13.460	0.926	
13	7-Oxabicyclo[4.1.0]heptane, 1-dimethyl-1,3-butadienyl)-2,2,6-trimethyl-, (E)-	7-oxabicyclo[4.1.0]heptano,1-(1,3-dimetil-1,3-butadienilo)-2,2,6-trimetil-,(Z)-	14.211	1.228	
14	alpha.-Cadinol	Alfa cadinol	14.320	0.908	
15	Coniferyl alcohol	Alcohol coniferílico	15.205	4.348	
16	Hexadecanoic acid, methyl ester	Ácido hexadecanóico metil éster (ácido palmítico)	16.957	1.696	
17	Palmitic acid	Ácido Palmítico	17.303	1.885	
19	3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxyanisole	Topanol 354	18.291	1.162	
20	11-Octadecenoic acid, methyl ester	Ácido-11-octadecenóico metil éster	18.631	2.230	
21	Elaidic acid	Ácido elaidico	18.978	1.125	

22	N-Methyl-N-methoxy-5,6,7,8-tetrahydro-1-naphtamide	N-methoxy-N-methyl-5,6,7,8-tetrahydronaphthalene-1-carboxamide	20.575	1.278	
23	2-Butanone, 4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-	4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1-yl)-2-butanone	22.185	1.116	
24	Cholest-4-en-3-one	Colestenona	22.391	1.265	
25	Docosanoic acid	ácido docosanóico	22.583	1.201	
26	Stigmasterol	Estigmasterol	22.724	3.399	
27	o-Toluic acid, 5-tetradecyl ester	ácido 5-o-toluicotetradecil éster	22.942	2.968	
29	Gamma Sitosterol	Gamma Sitosterol	24.257	49.484	

TR. Tiempo de Retención en minutos. Porcentaje (%).

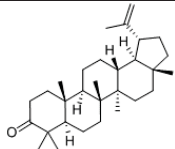
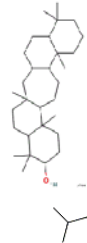
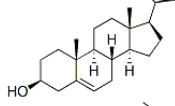
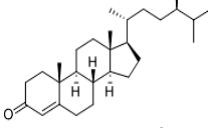
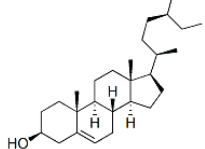
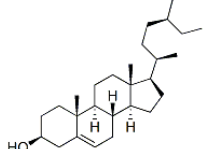
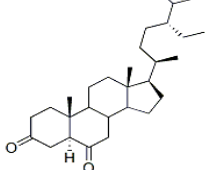
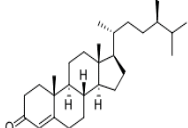
Cuadro 19. Composición del extracto M2 de *J. rzedowskii*.

No	Nombre (Inglés)	Nombre (Español)	T.R	%	Estructura Química
1	1,3-Cyclopentanedione	1,3-ciclopentanodiona	4.177	0.932	
2	Glycerin	Glicerina	4.748	0.894	
4	2-Nonen-4-one	2 nonen-4-ona	7.167	0.949	
5	4-Acetamidobutyric acid	ácido 4-acetamidobutirico	7.391	0.662	
6	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	ácido butanoico	7.520	0.756	
7	Benzofuran, 2,3-dihydro	Coumarán	8.585	0.584	
8	2-Methoxy-4-vinylphenol	4-vinil-guayacol	9.996	2.166	
9	Phenol, 4-propyl	4-propilfenol	10.772	0.577	
10	1,2,3-Benzenetriol	Pirogalol	10.907	5.457	
11	Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)	Isoeugenol	11.805	1.505	
14	Vanillic acid	Ácido Vanílico	13.217	0.778	
15	Homovanillic acid	Ácido homovanílico	14.211	0.565	
16	Phenol, 2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl)	Methoxyeugenol	14.763	0.740	
17	4-((1E)-3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxyphenol	Alcohol coniferilo	15.225	7.045	
18	Benzene, 1-methyl-2-(4-methylphenoxy)	1-metil-2-(4-metilfenoxi) benceno	16.026	0.763	
19	Longifolenaldehyde	Longifolenaldehido	16.585	1.463	

20	Palmitic acid	Ácido palmítico	17.303	0.799	
21	6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydro-1H-naphthalen-2-one	6-Isopropenil-4, 8a - Dimetil -4a, 5,6,7 , 8,8 a-hexa hydro-1H -Naftalen-2-ona	17.701	3.075	
22	2-Pentanone, 1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)	2-pentanona, 1-(2,4,6-tri hidroxifenil)	17.797	1.907	
25	1,2-Benzenediol, 3,5-bis(1,1-dimethylethyl)	Pirocatecol	18.567	1.702	
26	LUPENONE	Lupenona	20.459	9.337	
27	1H-Cyclopenta[a]pentalen-7-ol, decahydro-3,3,4,7a-tetramethyl-, acetate	Decahidro-3, 3,4,7 a-tetrametil-1H-ciclopenta [a] pentalen-7-ol	21.691	5.443	
28	Lupeol	Lupeol	21.922	4.827	
30	4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(2-naphthalenyl)	4H-1-benzopirano-4-ona, 2 - (2-naftalenilo)	23.590	0.660	
32	Stigmast-4-en-3-one	β-sitostenona	24.090	27.672	

TR. Tiempo de Retención en minutos. Porcentaje (%).

Cuadro 20. Composición del extracto H de *J. rzedowskii*.

No	Nombre (Inglés)	Nombre (Español)	T.R.	%	Estructura Química
2	LUPENONE	Lupenona	24.528	1.864	
3	C(14a)-Homo-27-nor-14beta-gammaceran-3alpha-ol	C (14a)-Homo-27-nor-14beta-gama ceran 3alfa-ol	25.971	3.461	
4	Stigmasterol	Stigmasterol	27.119	1.920	
5	Stigmast-4-en-3-one	β -sitostenona	28.467	9.400	
6	Gamma Sitosterol	Gama-Sitosterol	28.640	1.885	
7	Gamma Sitosterol	Gama Sitosterol	28.807	7.395	
8	Stigmastane-3,6-dione, (5.alpha.)	5-alfa Estigmastano-3,6-diona	30.096	2.983	
9	Stigmast-4-en-3-one	β -sitostenona	31.771	4.223	

TR. Tiempo de Retención en minutos. Porcentaje (%). Algunos nombres en español no encontrados.

DISCUSIÓN

En los bosques tropicales caducifolios y en el matorral xerófilo se registra la mayor riqueza de especies de *Jatropha* en nuestro país; estos tipos de vegetación poseen, de manera particular, un alto porcentaje de endemismos (Rodríguez *et al.*, 2009).

Estudios etnobotánicos han demostrado que la comunidad de San Rafael ocupa diversas especies vegetales para aliviar enfermedades de probable origen bacteriano (Canales *et al.*, 2005; 2006).

Los reportes confirman actividad antibacteriana, anticancerígena, e insecticida en diferentes especies de *Jatropha*, como *J. neopauciflora*, *J. curcas*, *J. gaumeri*, *J. ciliata* y *J. gossypiifolia* (Canales *et al.*, 2005; Mothana *et al.*, 2005; Hamza *et al.*, 2006), lo cual está muy relacionado con la alta toxicidad de sus extractos, aunque el grado puede variar, dependiendo de la parte de la planta que se utilice y del extractante utilizado. En este sentido, estudios de toxicidad del extracto de éter de petróleo (baja polaridad) de hojas frescas de *J. curcas* reportan alta mortalidad en larvas de *Culex quinquefasciatus* a altas concentraciones; *J. neopauciflora*, presenta fracciones tóxicas del extracto crudo de tallos hojas y ramas sobre larvas Nauplio II de *Artemia salina* (Karmegan *et al.*, 1997; Hernández, 2010).

La presente investigación reporta, de manera particular, que el rendimiento del extracto crudo (**M1**) de *Jatropha rzedowskii* fue pobre (1.97%); sin embargo,

colectas en determinadas épocas del año, pueden mejorar la cantidad y calidad de los extractos, incrementando el rendimiento de los mismos y aumentando el número de compuestos de interés biológico que contienen, ya que, como se ha observado, la variación de los metabolitos secundarios se debe a las diferentes condiciones ambientales a las que está sometida la planta durante su ciclo biológico, pues estos compuestos son sintetizados en respuesta a factores como la intensidad de la luz, estrés hídrico, suministro de nutrientes, altas temperaturas, etc. (Lambers *et al.*, 1998; Harborne, 1989).

Observando los rendimientos de los distintos extractos queda claro que el extracto metanólico crudo **M1** *J. rzedowskii* posee una mayor proporción de compuestos de naturaleza polar (68.18 %) en contraste con la cantidad de compuestos no polares (31.78 %). Si bien en una primera instancia esto parece lógico, debido al contexto acuoso de las células vegetales, conviene mencionar que los metabolitos de las plantas ocurren variablemente, acorde con lo mencionado en el párrafo anterior. Moléculas de diversa naturaleza química participan de una compleja dinámica, por lo que la presencia de moléculas polares puede estar condicionada a la presencia o ausencia de compuestos no polares, lo que también puede explicar en parte los efectos sinérgicos –es decir, que se incrementan los efectos al actuar conjuntamente- o antagonistas –es decir, que se inhiben algunos de sus efectos- que presentan cuando se les somete a pruebas biológicas.

En el género *Ficus*, el látex suele ser antihelmíntico debido a la ficina, un

enzima proteolítico (Trease y Evans, 1991). En este sentido, el látex de *J. rzedowskii*, que es una suspensión coloidal, acuosa y compleja, que contiene sustancias diversas, sea disueltas, como azúcares, gomas y alcaloides, o en emulsión, como grasas, ceras y resinas gomosas, y que se halla contenido dentro de células tubulosas especializadas llamadas tubos laticíferos, fue analizado para corroborar su actividad biológica, y caracterizar, de manera preliminar, los posibles compuestos causantes de dicha actividad.

Así, es posible atribuir a la compleja naturaleza polar –alta, baja o intermedia– de las diferentes moléculas (metabolitos secundarios) que se encuentran en el látex de la especie, la actividad antibacteriana que pudiera poseer (Toledo *et al.*, 2008). En esta investigación, esto quedó comprobado, sobre todo en lo que a bacterias Gram positivas se refiere (cuadro 8; fig. 2, 3). Inhibida por el látex **Lf**, *S. pneumoniae* presentó halos importantes (de 12± mm en promedio). No es trivial esta actividad, pues aunque esta bacteria existe de manera natural dentro del tracto respiratorio superior y digestivo del hombre, y a pesar de que normalmente no causa malestar alguno, es oportunista, por lo que, en caso de inmunodepresión, ocasiona, desde infecciones menores, como otitis media, aguda y sinusitis, hasta severos cuadros por infección invasiva, como neumonía, meningitis, septicemia, fiebre, artritis y peritonitis, sobre todo en niños y personas de la tercera edad (Chart, 2002; Foster, 2000; Ruvinsky, 2001)

Hoy por hoy, aceptamos que son bacterias Gram positivas quienes frecuentemente infectan la cavidad bucal y las heridas en la piel (Jawetz *et al.*,

1995; Burrows, 1974); es el caso de *S. aureus*, típicamente asociada a enfermedades del tracto respiratorio superior, o *B. subtilis*, causante de infecciones en ojos, oídos tracto urinario y tracto respiratorio. Estas especies (cuadros 8, 10) se mostraron altamente sensibles en pruebas cualitativas y cuantitativas con los extractos **M1** y látex **Le** de *J. rzedowskii*, lo que en el caso de *B. subtilis*, es comparable a la actividad del extracto crudo de raíces de *J. gaumeri* (Can- Aké *et al.*, 2004).

Dado que múltiples trastornos gastrointestinales de origen infeccioso son causados por bacterias Gram negativas como *V. cholerae*, *E. coli* y *Salmonella sp.*, las cuales se manifiestan con diarreas, vómitos y deshidrataciones (Chart, 2002; Foster, 2000; Mims *et al.*, 1999), también resulta trascendente la actividad que presentaron **Lf** y **M1**, sobre este tipo de bacterias, el caso de *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, *Y. enterocolítica*, o *E. aerogenes* (cuadros 9,10; fig. 2, 3).

Además, los principales problemas de resistencia a antibióticos detectados en América Latina están relacionados con tipos Gram negativos, principalmente los bacilos no fermentadores, como *Pseudomonas 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) y otras enterobacterias productoras de β -lactamasas cromosómicas inducibles (Zampini *et al.*, 2007).

Particularmente, el tipo Gram positivas presentaron halos más grandes y fueron más sensibles (cuadros 8, 9, 10; fig. 2, 3) que cepas Gram negativas. Esta diferencia radica, además de la susceptibilidad inherente a cada cepa, en el modo

de acción de los antimicrobianos frente a las diferentes conformaciones estructurales de las bacterias. En Gram positivas, los péptido glucanos, inmersos en la matriz, compuesta de ácidos teicoicos, teicurónicos y lipoteicoicos, confieren a la pared celular carga negativa neta, necesaria para asimilar cationes divalentes, que también las hace vulnerables a la intromisión de moléculas polares, presentes en el extracto. Por el contrario, la membrana de las Gram negativas, más compleja, es menos permeable, o al menos más selectiva (Cimanga *et al.*, 2002; Gros *et al.*, 1985; Nikaido y Nakae., 1979).

Los antimicrobianos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos; los primeros se unen fuertemente a su diana, provocando la muerte celular. En cambio, los agentes bacteriostáticos suelen acoplarse a los ribosomas, impidiendo la síntesis de proteínas, pero cuando la concentración de antimicrobiano disminuye, se reanuda la síntesis (Madigan *et al.* 2009).

Observando el efecto bactericida que presentó *S. epidermidis* frente a **Le**, en el segundo ensayo, Davis *et al.* (1996) nos dice que antes de que se produzca la inactivación es necesario que se acumulen varios impactos; resulta que fueron necesarias dosis adicionales de CBM para hacer válida esta condición (fig. 7).

Un fármaco bactericida destruye la bacteria, en cambio uno bacteriostático inhibe su crecimiento sin destruirlo del todo. Para que un antibiótico sea útil, debe presentar toxicidad selectiva, es decir, la inhibición selectiva de la proliferación del patógeno sin dañar al hospedero. Esto se consigue explotando las diferencias estructurales y metabólicas del microorganismo, en contraste con las características

de las células humanas. Para ello existen 4 dianas en las células bacterianas que son suficientemente diferentes como para direccionar a ellas la acción de fármacos clínicamente efectivos: la pared celular, los ribosomas, los ácidos nucleicos y la membrana celular (Levinson, 2004).

Por ello se infiere que el látex está causando daños en alguna de las dianas anteriormente mencionadas, criterio que ya antes había sido propuesto por Davis *et al.* (1996), cuando propone que la acción bactericida depende de la lesión irreversible de un elemento celular que no puede ser sustituido, como el ADN o la cubierta celular; otro punto de acción bactericida son las proteínas requeridas para la síntesis de ARN y los ribosomas.

La base de un buen antibiótico y de un fármaco en general es conocer el tipo de acción, sobre que organismos actúa y de que forma, las concentraciones activas y el tiempo que dura esta actividad. También por ello es importante purificar los compuestos causantes de la actividad, a fin de conocer sus propiedades específicas, y de esta manera, proponer metodologías encaminadas a la creación de nueva farmacia, más eficaz, y ¿por qué no?, más natural también.

Acerca de esto, Canales (2005) refiere que en el látex de *J. neopauciflora* hay un compuesto que presenta actividad antibacteriana, que es muy polar, es un compuesto aromático, presentan grupos OH, que son muy importantes en la actividad sobre las bacterias.

Aunque no es lo único a tomar en cuenta. Las bacterias poseen mecanismos

propios de resistencia a agentes tóxicos que activan cuando las condiciones de su medio cambian bruscamente (Baquero, *et al.* 2002). Por lo tanto a pesar de haber realizado pruebas de sensibilidad en *E. coli* a **Le**, es muy probable que en el ensayo hecho para probar su efecto bactericida o bacteriostático, este patógeno haya activado algún recurso de este tipo, que no permitió observar inhibición alguna.

Como ya hemos visto, la acción antimicrobiana de los metabolitos secundarios de *J. rzedowskii* está demostrada, comparándose a la actividad que presentan otras especies de este género sobre microorganismos de importancia médica, económica y alimentaria.

Cualitativamente hablando el extracto crudo **M1**, así como las particiones **M2** y **H** poseen actividad inhibitoria sobre hongos filamentosos de importancia, no siendo así para el Látex (cuadros 11, 12). Sin embargo, en cuanto a la parte cuantitativa se debe enfatizar un fenómeno importante. **M1** resulta con CF_{50} más bajas que el resto, esto debido probablemente a la sinergia de los compuestos no polares y polares (Katzung y Trevor, 1997) contenidos en tallos y ramas, aun así, no logra inhibir el 100% del desarrollo miceliar (fig. 8 a 13). La partición **H**, en cambio (cuadro 12), mostró la inhibición de *T. mentagrophytes* en un 100% con la CF_{50} más baja obtenida en este estudio (0.46 mg/mL). Lo que se observa es que bajas concentraciones de los extractos inhiben de manera clara el desarrollo del micelio del hongo, lo que no ocurre a concentraciones más elevadas; donde la tendencia incluso parece revertirse. Este fenómeno está bien conocido, pues se adjudica a la capacidad del organismo para resistir condiciones adversas, desarrollando y activando mecanismos de resistencia como la sobreproducción de blancos enzimáticos, la implementación de vías metabólicas alternas y la producción de bombas de flujo externo que expulsarán cualquier sustancia nociva al espacio extracelular (Loeffler y Stevens, 2003). Dicho de otro modo, las bajas concentraciones de antimicrobianos, evitan activar esos mecanismos, lo que conlleva la intoxicación paulatina del organismo hasta su muerte irremediable. Aunque también tendrá que ver la diferencia entre el modelo de *in vitro* e *in vivo*. Conviene recordar que el control utilizado, el ketoconazol, fármaco antimicótico azólico, de la clase imidazol, actúa a nivel de la membrana citoplasmática inhibiendo la enzima citocromo P-450 que interviene en la síntesis de ergosterol, un

esterol casi exclusivo del reino Fungi, que cumple la función análoga del colesterol en células animales (Escobar y Zuluaga, 2004).

De cualquier forma, la actividad de **H** sobre *T. mentagrophytes*, causante del pie de atleta (Myrvin y Weiser, 1991), es cotejable a reportes etnobotánicos de otras especies del género, utilizadas para el tratamiento contra los desagradables síntomas de esta micosis (Arias *et al.*, 2001; Canales, 2005).

Otras plantas de la familia Euphorbiaceae también han sido estudiadas para probar su actividad antifúngica, como *Croton urucurana*, probada contra los hongos dermatofitos *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum canis* y *Epidermophyton floccosum*, (CF50 = 1.25-2.5 mg/mL). El extracto clorofórmico de la parte aérea de *Phyllanthus amarus* inhibe al también dermatofito *Microsporum gypseum* (Abad *et al.*, 2007). Especies del género, como *J. neopauciflora* son activas contra hongos filamentosos como *Aspergillus niger* y *A. sp* además de *T. mentagrophytes* (Hernández, 2010).

Parte de la respuesta inmune de organismos pluricelulares consiste en generar sustancias oxidantes para inhibir el desarrollo de microbios, lo que también afecta las propias células. Estos radicales libres son causantes del deterioro progresivo de los tejidos y su generación es provocada por reacciones llamadas sistemas antioxidantes defensivos. La inclusión de un buen agente antioxidante en esta dinámica neutraliza el efecto adverso, protegiendo los tejidos e incrementando la efectividad de la respuesta inmune, aminorando el proceso de envejecimiento prematuro de los tejidos involucrados; así, la eliminación de

radicales libres contribuye a prevenir los efectos nocivos de las especies reactivas del oxígeno generadas por las condiciones inflamatorias de un proceso infeccioso (Halliwell y Gutteridge, 1999; Singh *et al.*, 2006).

Un antioxidante es una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas (Céspedes y Sánchez 2000).

El hecho de que un determinado compuesto posea capacidad antioxidante es algo muy valorado hoy día. Numerosos estudios apuntan a la integración de este tipo de sustancias a cuestiones relacionadas con la salud física de las personas, por sus notables efectos al sistema nervioso y cardiovascular y por disminuir el deterioro general debido al estrés oxidativo (Sies, 1997).

Lo anterior resulta relevante, puesto que las capacidades antioxidante y cicatrizante han sido reportadas ya en otras Euphorbiaceae; en *Acalypha indica* ($CA_{50} = 37.9$ mg/mL; 28% equivalentes de ácido gálico) el extracto EOH tiene efecto cicatrizante; y en *A. langiana* el uso tópico externo del extracto acuoso de hojas disminuye del 9 a 88% el área de las heridas y del 8 a 82% la escisión y la herida (Pérez Gutiérrez y Vargas, 2006; Marwah *et al.*, 2007).

Conviene hacer énfasis en la relación que guarda la actividad antioxidante y la capacidad cicatrizante de una sustancia, pues se mejora significativamente la respuesta del organismo a eventos como heridas en la piel y posibles procesos infecciosos derivados de esta, reduciendo el tiempo que tarda en sanar la herida, mientras se protege de agentes patógenos oportunistas (García, 1984).

De la capacidad antioxidante que presentó *J. rzedowskii* se puede decir que, tanto extractos como látex, poseen notable actividad, aunque es aventurado, al momento, conferirle alguna capacidad en el proceso de cicatrización. No obstante, reportes en otras especies del género avalan dicha posibilidad, como ocurre con el látex de *J. curcas*, utilizado como hemostático de manera tradicional. Se corroboró su actividad coagulante, toda vez que reduce significativamente el tiempo de coagulación de la sangre humana; diluido, sin embargo, prolonga el tiempo de coagulación y muy diluido ocasiona que la sangre no coagule en absoluto, lo que comprueba que posee ambas actividades, procoagulantes y anticoagulantes (Osoniyi y Onajobi, 2003). Estudios posteriores podrían probar esta hipótesis, en el caso de *J. rzedowskii*.

En contraste con la Catequina, que siendo un compuesto puro tiene $CA_{50} = 4.3 \mu\text{g}/\text{mL}$, el látex fresco (**Lf**) requirió $6.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ para conseguir la CA_{50} (cuadro 13; fig. 14). Siendo un flavonoide, la Catequina es un potente inhibidor de la oxidación, y en muchos estudios *in vitro* los compuestos fenólicos demuestran su alta actividad antioxidante, incluso mayor que la presentada por vitaminas (Bravo, 1998; Re, *et al.*, 1999). Los extractos y el látex en cambio, son una mezcla de distintas moléculas, en diferentes proporciones y acaso con interacción entre las mismas (sinergismo), por lo que la dinámica de su acción antioxidante es más compleja y los mecanismos de acción pueden estar sujetos a esta. **Le**, que contiene moléculas de polaridad alta, presenta actividad antioxidante ($CA_{50} = 10.5 \mu\text{g}/\text{mL}$) y se necesita menor cantidad que los extractos (**M1**, $CA_{50} = 18.5 \mu\text{g}/\text{mL}$; **M2**, $CA_{50} = 28.7 \mu\text{g}/\text{mL}$) para reducir el DPPH (cuadro 13). Esto es comparable con lo

obtenido para *J. gaumeri*, en el que el extracto MeOH de hojas, el cual también posee actividad antioxidante significativa (Can-Aké, *et al.*, 2004).

Ahora bien, las diferencias observadas en los valores de CA_{50} , se asocian a las características químicas de cada extracto y fracciones hechas, y al hecho de que la componente química de **Le** y **Lf** pudo haber variado debido al proceso de esterilización al que fue sometido, favoreciendo la presencia de compuestos de naturaleza polar (Sacchetti *et al.*, 2005).

De todas las clases de compuestos con actividad antioxidante que existen en el reino Plantae, es de considerarse a los fenil propanoides, a los que además se les atribuye acción antimicrobiana, antiviral y antifúngica (Cowan, 1999).

Casi todas las plantas sintetizan una gran cantidad de productos secundarios que contienen grupos fenoles (substancias como los polifenoles, las flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas) o sus derivados de oxígenos substituidos, (quinonas). 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; Cowan, 1999).

Tenorio *et al.*, (2006) indica que estos compuestos (flavonoides) 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 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.

La presencia de fenoles se comprobó de manera cualitativa en el látex de *J. rzedowskii*, aplicando cloruro férrico a una muestra, luego de lo cual, la tonalidad cambió y se tornó oscura (fig. 15) (Domínguez, 1973). Así, es posible, de manera preliminar, inferir la presencia de polímeros (polifenoles) al menos en el látex.

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 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 linoléico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos rojos o de la autooxidación de los homogeneizados de cerebro (Konigsberg, 2008).

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

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 libres en posición C5 o C7 del anillo A de los flavonoides favorece el poder antibacteriano de los mismos (Pérez, 2003).

Sin embargo, de acuerdo a la literatura, los flavonoides no ocurren frecuentemente en el género. Hasta ahora sólo se han reportado nueve compuestos, entre los que se incluyen la Vitexina, Isovitexina y Apigenina en *J. gossypifolia* o la Isoorientina y Orientina en *J. ciliata* (Zhang *et al.*, 2009).

Otro de los puntos importantes es, en el caso del látex, que tratar de aislar sus componentes es una tarea compleja. Canales (2005) aisló un compuesto del látex de *J. neopauciflora* describiendo su estructura, destacando la presencia del grupo funcional OH; anillos aromáticos y dobles ligaduras, metilos y metilenos, de

estructura simétrica. Determinó que la actividad biológica de este compuesto está relacionada con la presencia de grupos funcionales OH presentes en la molécula, pues al ser acetilada, pierde dicha actividad. Cabe mencionar que la presencia de átomos de oxígeno en la molécula hace que sea más pesada, lo que aumentará el tiempo de retención del compuesto, es decir, el tiempo que tarda la molécula en recorrer toda la columna.

Debido a que no existen reportes para *J. rzedowskii*, es muy importante el análisis fitoquímico de esta especie, ya que en otras especies del género se han aislado lignanos y cumarinas, tal es el caso de *J. gossypiifolia*, de la que se aisló Gadaina, Jatrophan, Propacín, Prasanthalina, Gossypifan, Jatrodieno, Gossyphiline, Arylnaftaleno, y escopoletina, entre otros (Zhang *et al.* 2009).

La longitud de onda de absorción de los fenoles está en el rango de 236 a 278 nm, esto datos dan la pauta para deducir su presencia en las muestras, ya que estos compuestos tienen un pico de absorbancia de 270 nm (Olsen, 2003).

No obstante, según lo que se observa en los cromatogramas de **M1** y **M2**, pareciera que *J. rzedowskii* posee un porcentaje importante de compuestos de poco peso molecular, al menos en lo que a moléculas polares se refiere (fig. 16, 17; cuadros 14, 15). En ambos casos, la altura de los primeros picos indica abundancia de este tipo de moléculas en las muestras. Sin embargo, los demás compuestos presentan picos muy anchos, característicos de la corrida isocrática. Tal vez convendría hacer una elución con gradiente, a fin de aumentar la resolución del cromatograma, después de todo, las muestras presentaron un gran

número de componentes, aunque no es posible, por el momento, caracterizarlos de manera precisa.

Los cromatogramas del látex (**Lf** y **Le**) solo muestran 2 o 3 picos, lo que pudiera dar la idea de que su composición es muy simple (fig. 18, 19; cuadros 16, 17).

Tomando en cuenta además los datos de la longitud de onda de absorción de los compuestos encontrados (cuadros 14-17) y de acuerdo a las tablas publicadas por Pretsch *et al.* (1980), se infiere la presencia de quinonas, hidroxycumarinas, y demás precursores de fenoles, flavonoides, etc. Da la impresión de que estas moléculas tendrían el mismo efecto que un agente quelante, o acción prooxidante en contra los microorganismos patógenos, debido a las sustituciones cetónicas que se presume, presentan. El hecho de encontrar este tipo de compuestos es evidencia importante de que la planta expresa mecanismos de protección resultado de la interacción con el ambiente, como daños mecánicos que probablemente desencadenan la síntesis de toda una serie de compuestos, lo que nos permite observar, en mayor o menor medida, precursores químicos o sus derivados, producto del sistema de defensa de la planta.

Debido a esto y dados los resultados del análisis HPLC, la actividad antimicrobiana que presenta, además de la capacidad antioxidante, se presume que en el látex de esta especie existan compuestos fenólicos y polifenólicos, sin embargo es necesario afinar el análisis para esclarecer esta hipótesis con mayor resolución.

La cromatografía de gases tiene la ventaja de disponer de detectores mucho más universales (ionización de llama), además, para numerosas aplicaciones los métodos son más simples, más rápidos y más sensibles que los correspondientes a HPLC, sin embargo, la influencia de la temperatura es considerable. Así, entre sus inconvenientes podemos decir que no detecta en forma cuantitativa compuestos poco volátiles y que puede ocasionar artefactos en compuestos sensibles a elevación de temperatura moderada, generalmente de interés biológico. Tampoco es muy eficiente para detectar compuestos que se encuentran en estado iónico.

En cambio este método de análisis es preferible cuando los compuestos son volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas de hasta 350°-400°C. (Lough y Wainer 1995).

Haciendo el análisis de los extractos de *J. rzedowskii*, se determinaron, principalmente, ácido palmítico, ácido 4 acetamidobutírico, isoeugenol, pirogalol, alcohol conferílico, gamma sitosterol, estigmasterol, b-sitostenona, lupenona y lupeol (Cuadros 18, 19 y 20).

La presencia de fitosteroles está bien descrita en este género. Así, en diferentes extractos de tallos, hojas, raíces y semillas de *J. neopauciflora*, *J. curcas* y *J. gaumeri* se reporta la presencia de β -sitosterol (Hernández, 2010; Gubitz *et al.*, 1999; Can-Aké, *et al.*, 2004) y no es raro que el extracto M1 de *J. rzedowskii*, se componga, entre otras cosas, de β -sitostenona, gamma-sitosterol y estigmasterol, lupenona y lupeol.

Canales (2005) reporta sesquiterpenos como espatulenol, irisona (compuesto intermediario en la síntesis de vitamina A), platambina, en fracciones activas del extracto de acetato de etilo de *J. neopauciflora* con su correspondiente actividad antibacteriana.

En estudios hechos a *J. curcas* se determinó la presencia de 5 α estigmastano-3, 6- diona, de un fitosterol de la raíz de esta especie (Kong, *et al.*, 1996; Zhang, *et al.*, 2009). Este punto es importante, pues en este análisis se reporta la existencia del mismo compuesto, lo cual de acuerdo a los mismos autores no es raro, pues está presente de manera común en especies de este género.

Hernández (2010) también reporta Lupeol, terpeno que posee una amplia gama de propiedades medicinales como son: potente antioxidante, anti-mutagénico y por tener efectos anti- inflamatorios y anti- artríticos (Rodríguez-Gamboa, *et al.*, 2001).

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

El género *Colliguaja*, de la familia Euphorbiaceae también presenta entre otros, la presencia de este terpeno (Bittner *et al.*, 2001). El lupeol es un componente común en la familia Euphorbiaceae, Hernández lo propone como responsable de la actividad antioxidante que presenta *J. neopauciflora*.

La actividad antibacteriana de los terpenos se atribuye a su acción como disolventes de las membranas celulares, produciendo un efecto de lisis bacteriana (Helander *et al.*, 1998; Barre *et al.*, 1997; Ahmed *et al.*, 1993;).

A los fitosteroles se les atribuye propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y antifúngicas, sin embargo su efecto más relevante es como hipocolesterolemiante, para colesterol total y colesterol LDL (Valenzuela, 2006). Los fitosteroles también son capaces de desestabilizar la membrana celular de bacterias Gram positivas haciéndola más permeable, lo que causa estrés osmótico (Dantas *et al.*, 2002; Greenway y Dike, 1979).

Por su naturaleza no polar (lipofílica) pasan a través de la pared celular y la membrana citoplasmática perturbando la estructura de sus diferentes capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos y permeabilizarlos, por lo mismo se ven implicados en citotoxicidad. En Bacterias, la permeabilización de las membranas se asocia con pérdida de iones, reducción del potencial de membrana, el colapso de la bomba de protones y el agotamiento de las reservas de ATP (Knobloch *et al.*, 1989; Sikkema *et al.*, 1994; Helander *et al.*, 1998; Ultee *et al.*, 2002; Di Pasqua *et al.*, 2006; Turina *et al.*, 2006; Bakkali, 2008).

Está reportado que los ácidos grasos ejercen una acción benéfica en los vasos sanguíneos y corazón, pues aumentan la concentración de HDL (llamado "colesterol bueno"). Contribuyendo a reducir el riesgo cardiovascular. (Saavedra, 2010). En este caso, el ácido palmítico, un ácido graso saturado, favorece el aumento de colesterol, aunque no posee reportes de actividad antimicrobiana, es

muy común encontrarlo en los vegetales (Alenguer, *et al.*, 2002).

Es de suma importancia tomar en cuenta los aspectos de actividad antimicrobiana, y antioxidante de una especie vegetal, para deducir las partes de la planta dónde es posible encontrar la mayor cantidad de compuestos interesantes. Estudios etnobotánicos han demostrado que la comunidad de San Rafael ocupa diversas especies vegetales, entre las que destaca *J. neopauciflora*, para aliviar enfermedades de probable origen bacteriano (Canales *et al.*, 2005, 2006). Utilizan particularmente el látex de forma tópica y se respaldó dicho uso, comprobando su actividad (Canales, 2005).

El látex fresco así como las infusiones hechas con la parte aérea de *J. neopauciflora* son utilizados como paliativos en heridas e infecciones bucales, cuando existen piezas dentales flojas, así como en 'pie de atleta' por la comunidad de San Rafael Coxcatlán, Puebla (Canales *et al.*, 2006; Arias *et al.*, 2001).

De *J. neopauciflora* ha sido reportado el uso del látex como coadyuvante en infecciones cutáneas y aquellas de las mucosas, localizadas principalmente en la cavidad bucofaríngea (Canales *et al.*, 2005, 2006)

Resulta muy importante elucidar el nivel de toxicidad de *J. rzedowskii*, ya sea que los compuestos más tóxicos se encuentren en las ramas, en las hojas, frutos, flores, las raíces o el látex.

Tomando en cuenta lo reportado en otras especies de este género y los datos obtenidos en esta investigación, se justifica que *J. rzedowskii*, es una especie que

tiene el potencial fitoquímico, como materia prima, para la elaboración de toda clase de paliativos útiles para aliviar infecciones de origen bacteriano, por lo que no se debe perder de vista y es conveniente, seguir haciendo pruebas de toxicidad y del modo de acción en modelos *in vivo* a fin de establecer una línea de investigación que elucide la mejor forma de aprovechar el recurso fitoquímico que representa esta especie endémica con probada actividad biológica. Finalmente se puede afirmar que *J. rzedowskii* presenta diversos compuestos con capacidad antibacteriana, antifúngica y antioxidante que ayudarán a mejorar las condiciones de vida de las personas que sepan dónde buscarlos.

CONCLUSIONES

Tanto el látex fresco y esterilizado, así como los extractos metanólico crudo, la fracción libre de compuestos no polares y la fracción hexánica de *J. rzedowskii* poseen propiedades antimicrobianas.

Tanto el extracto metanólico crudo, como la fracción libre de compuestos no polares presentan un efecto bacteriostático, mientras que el látex esterilizado tiene efecto bactericida.

El látex esterilizado de *J. rzedowskii* presenta actividad antifúngica sobre *T. mentagrophytes*.

En los extractos con actividad antimicrobiana se identificó la presencia de compuestos con probada actividad antimicrobiana como el pirogalol y lupeol.

PERSPECTIVAS

Se propone continuar los ensayos con *J. rzedowskii* a fin de afinar y completar el conocimiento fitoquímico que se tiene de esta especie endémica de nuestro país.

Analizar fenoles totales de los extractos y látex de esta especie.

Realizar estudios fitoquímicos como el fraccionamiento biodirigido y evaluar la actividad antimicrobiana y otras actividades biológicas como antitumorales, cicatrizantes y antiparasitarias.

Evaluar la actividad diferenciada de extractos de partes de la planta como frutos, semillas, flores y en distinta época del año.

Hacer análisis más detallados con el látex en estado fresco, recién colectado y en diferentes épocas.

Aislar, purificar y caracterizar los compuestos responsables de dichas actividades.

Realizar pruebas de toxicidad.

APÉNDICES

APÉNDICE 1. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE *Jatropha rzedowskii* Jiménez-Ramírez.

Son arbustos dioicos, de 3 m de altura: corteza gris-rojiza; lámina cuneiforme, de 1-2.1 cm de largo, 2-3 mm de ancho; base redondeada, aguda, decurrente, ápice obtuso; glabra, venación pinnada (la vena principal cambia su trayectoria donde surgen las secundarias). Pecíolo de 1 mm de largo; estípulas triangulares de 0.5-0.6 mm de largo, glabras. Inflorescencia masculina casi sésil, de pocas flores; las femeninas solitarias, el pedicelo de 3-4 mm de largo. Flor masculina campanulada, blanca; cáliz de 1.6-2 mm de largo, lóbulos ovado-triangulares, de 0.7-0.8 mm de largo, diminutamente pubérulo interna y externamente; corola dialipétala, blanca; pétalos cuneiformes (muy estrechamente ovados), de 3.8-4.25 mm de largo por 0.6-0.8 mm de ancho, pilosos en toda su superficie; disco de 5 glándulas libres, piramidales, de 0.5 mm de longitud estambres 7-10, biseriados 4.5 mm de largo, anteras de 0.8-1 mm de largo por 0.3-0.4 mm de ancho. Flor pistilada blanca, campanulada; sépalos oblongos-lanceolados de 2.8-4 mm de largo por 0.5-0.7 mm de ancho, pubérulos interna y externamente; corola blanca; pétalos cuneiformes de 3-4 mm de largo por 0.4-0.6 mm de ancho con el ápice redondeado e intensamente pubérulo internamente y externamente; ovario unicarpelar, de 2.5-3 mm de largo; esparcidamente piloso, de 1.5-1.6 mm de largo; estilo glabro, de 1.3-1.5 mm de largo; estigma lateral triangular y carnosos. Fruto unilocular, de 1.4-1.5 cm de alto, 0.9-1 cm de diámetro, con una semilla verde, tardíamente dehiscente,

semilla de 1-1.5 cm de largo por 8.5-9.5 mm de ancho, ovoide, de color pardo oscuro; carúncula vestigial (fig. 20).

Un punto a recordar es que *J. rzedowskii* es la única especie de la sección *Mozzina* con la corola dialipétala y 7-10 estambres de la misma longitud. Esta especie está dedicada al Dr. Jerzy Rzedowski, reconocido botánico mexicano.

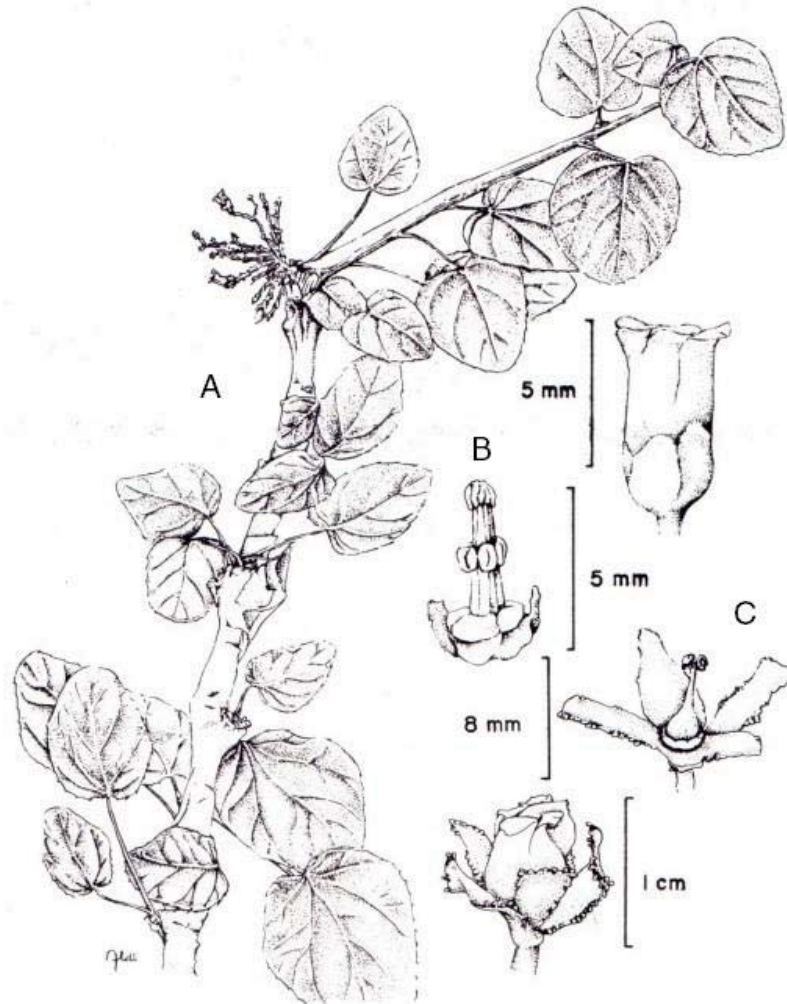


Figura 20. *Jatropha rzedowskii*. A, rama con flores; B, flor estaminada; C, flor pistilada. Tomada de Jiménez, 1985.

De acuerdo a Reyes (2004), se le conoce popularmente como “sangre de grado”, y se la encuentra en los estados de Puebla y Oaxaca (Fig. 21).

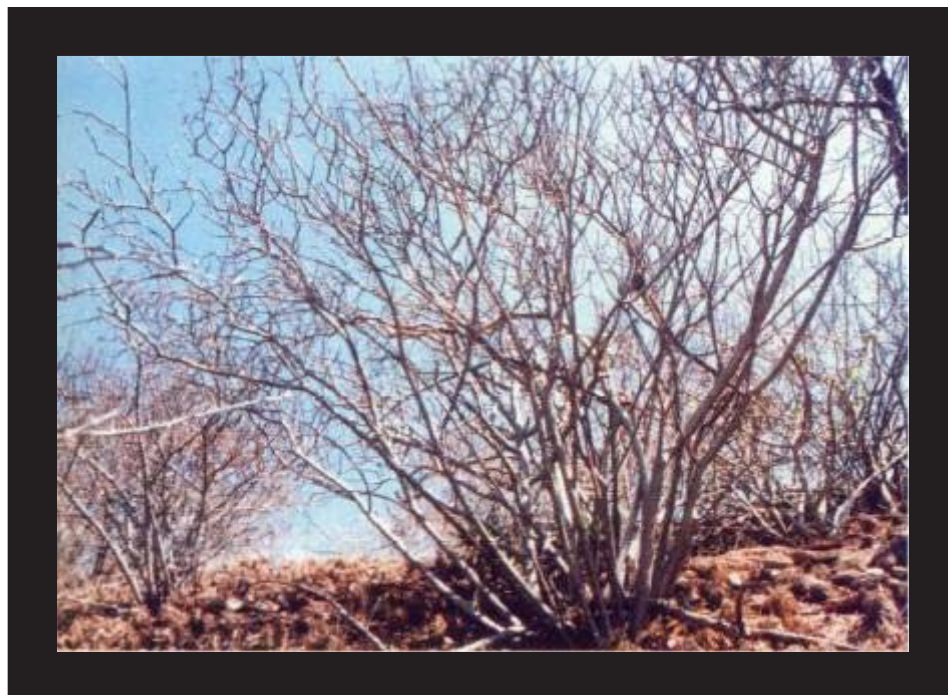


Figura 21. *J. rzedowskii*, en campo, tomada de Reyes, 2004.

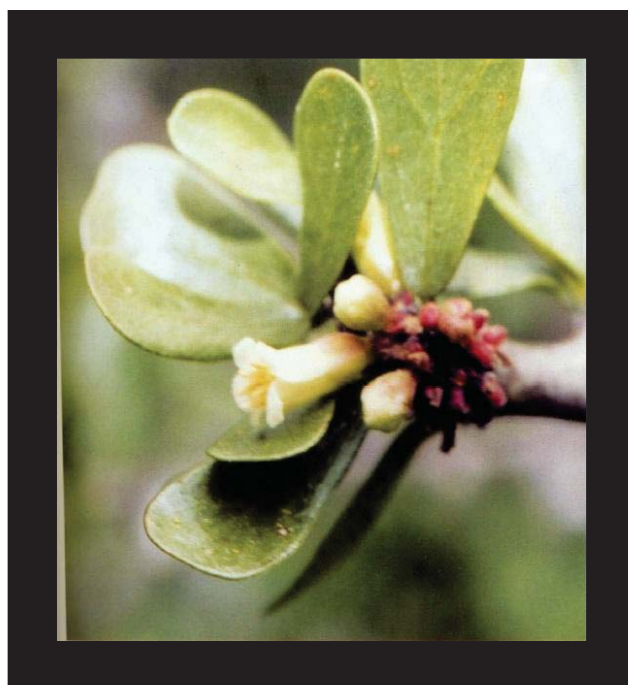


Figura 22. Detalle de la flor de *J. rzedowskii*, tomada de Reyes, 2004.

APÉNDICE 2. ZONA DE COLECTA.

La colecta de los materiales vegetales utilizados se realizó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, localizado al sureste de Tehuacán, en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre $18^{\circ}12' - 18^{\circ}14' N$ y $97^{\circ}07' - 97^{\circ}09' O$; a una altitud de entre 957 y 1400 m.s.n.m. (fig. 22).

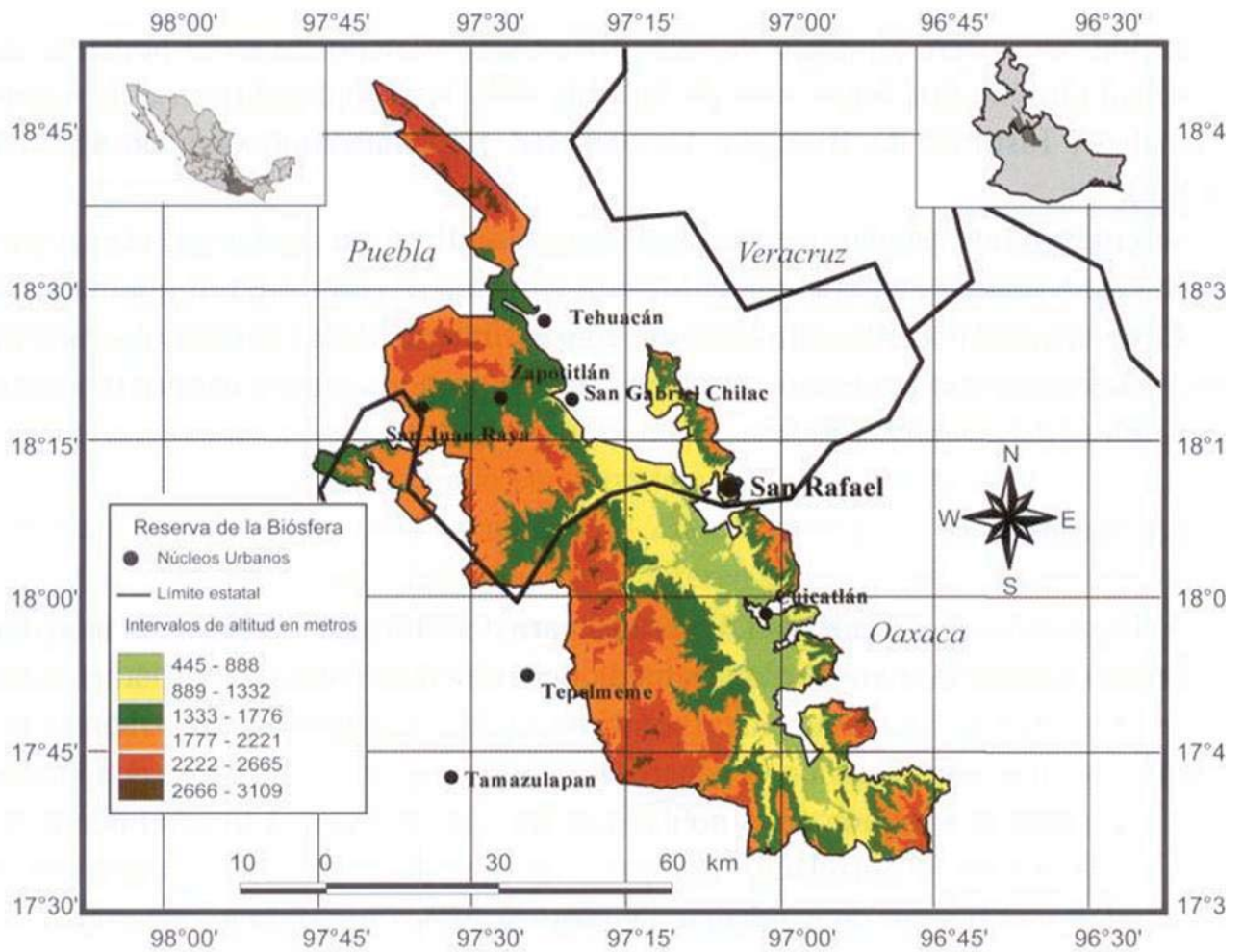


Figura 23. Mapa topográfico de la reserva de Tehuacán Cuicatlán.

Situada en una región montañosa árida y de tierras altas, esta reserva de biosfera es uno de los sitios donde se da uno de los más altos grados de diversidad biológica y de presencia de especies endémicas de todo México. Su

paisaje milenario es uno de los más emblemáticos de Mesoamérica y su territorio está poblado por ocho grupos étnicos diferentes. La reserva se considera un sitio clave en lo que respecta al origen y desarrollo de la agricultura en la región mesoamericana, y más concretamente en lo referente a la domesticación del maíz, la calabaza, el aguacate y el frijol. La característica más destacada del ecosistema es la presencia de zonas densamente pobladas de cactáceas columnares, así como de un bosque tropical bajo de hoja caduca (UNESCO, 2012)

CLIMA

El clima es de tipo Bs (h') w" (w) de acuerdo con la clasificación de Koeppen, modificado por García (1981), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22 °C, variando entre 25 °C en abril y mayo, y 18 °C en enero (Medina, 2000). Valiente (1991) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación casi duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

HIDROGRAFÍA

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

número de cortas ramificaciones alcanzando la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste (Salcedo-Sánchez, 1997).

EDAFOLOGÍA

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

VEGETACIÓN

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

Fernández (1999), reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael:

- Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).
- Chiotillal de *Escontria chiotilla*, en el nivel próximo al cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal de esta región, con una alta densidad arbustiva.
- Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* Ramírez, *Mimosa polyantha* (Brandeggee), *Fouqueiria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fructicosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.
- Fouqueria con especies dominantes como *Fouqueria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba parvifolia* (Rose),

Manihotoides pasiflora (Brandege), *Senna wisliseni* (DC), *Mimosa luisiana* (Brandege) y *Sanvitalia fructicosa*, localizada en el nivel más alto, de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal.

La densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fructicosa*.

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

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

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido, con el cual se obtienen una serie de compuestos de una determinada materia prima. Se utiliza un agente extractante, por lo general en fase líquida (agua y otros solventes) para extraer la componente química de la muestra a macerar. Para el caso de plantas el método es el siguiente:

Secar ramas y tallos, frutos, raíces, hojas, así como cualquier parte de la planta a evaluar, lo que constituye el material vegetal (MV). En un recipiente adecuado (un matraz de vidrio, por ejemplo), agregar suficiente solvente (en este caso MeOH, por ser de polaridad alta), hasta empapar todo el MV. Se deja reposar en un lugar fresco y seco durante determinado tiempo (24 hrs., aprox.), al cabo del cual se observa una coloración verde amarilla, naranja, etc. Se filtra el extracto con papel Whaltham del número 5, para eliminar impurezas y trazas de polvo, y se retira el exceso de solvente mediante destilación a presión reducida. El extracto obtenido se coloca en charolas de vidrio para evaporar lo que quede de solvente. Finalmente se colecta en recipientes adecuados, no sin antes calcular 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 antimicrobiana de los extractos, la metodología es la siguiente.

LOS SENSIDISCOS

Los sensidiscos (SSD) se utilizan para evaluar biológicamente los extractos y las fracciones separadas mediante cromatografía.

Se esterilizan discos de 5 mm de diámetro hechos con papel Whatman del N° 5, luego de lo cual serán impregnados con las sustancias a probar.

Dependiendo de la naturaleza polar del extracto se utiliza el vehículo para solubilizarlo. En todos los casos se hacen los cálculos y las diluciones necesarias para que cada SSD lleve la cantidad exacta de extracto (2 mg por sensidisco). El control negativo (C-) consiste en SSD impregnados con 10 µL del solvente utilizado para diluir el extracto, mismo que se deja evaporar durante 12 hrs. al igual que los SSD experimentales. El control positivo (C+) consiste en SSD con 25 µg de Cloranfenicol para ensayos con bacterias y con 7 µg de Ketoconazol para ensayos con hongos.

Una vez listos, los SDD se colocan, utilizando pinzas estériles, sobre la superficie del agar en la placa experimental a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. En el caso de hongos filamentosos, a una distancia aprox. de 30 mm del límite de crecimiento micelial. Los SSD se deben

presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar.

MEDIO DE CULTIVO

Las placas de Kirby-Baüer se hacen con cajas de Petri estériles. Para ensayos con cepas bacterianas se utiliza, de manera estándar, agar Müeller-Hinton (Bioxon 110-1), que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Para hongos filamentosos y levaduras se utiliza agar papa-dextrosa (PDA). Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm, lo que se consigue con aprox. 20mL de agar por caja Petri de 100 X 15 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.

PRUEBA DE SUCEPTIBILIDAD

Una vez preparadas convenientemente las placas se someten a una prueba de susceptibilidad; se colocan en una incubadora (aparatos de laboratorio E-51 con termostato) a 35 °C, sin mayor tensión de CO₂, esto debido a la posible formación de ácido carbónico en la superficie húmeda del agar, mismo que conlleva a un descenso del pH, lo que provoca la inhibición en el desarrollo de ciertos microorganismos, 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.

INÓCULO BACTERIANO

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

El estándar 0.5 de McFarland se prepara 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 puede efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales, o en su defecto con un espectrofotómetro (Spectrónic 21 Milton Roy) a 660 nm. Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina al 0.9 % hasta igualarlas.

Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster, seco y estéril en la suspensión bacteriana, y antes de retirarlo se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa de agar Müeller-Hinton (Bioxon 110-1). Previamente se deja que la placa alcance una temperatura ambiente. Es

aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente, se siembra mediante estría por lo menos en tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Una vez seco el inóculo, la placa de Mueller-Hinton está lista para la aplicación de las muestras a evaluar (SSD impregnados de extracto). Se incuban a 35 °C durante 12 horas, luego de lo cual se leen. Es importante incubar placas con SSD libres de solventes (C-), lo cual se evita preparándolos correctamente, dejando evaporar el mismo antes de realizar este ensayo.

Todos estos procedimientos se realizan bajo condiciones de total asepsia.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En todos los casos en que existan zonas de inhibición el extracto se reporta como activo. El diámetro de los halos se mide con regla o vernier, se reportan los datos en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio.

APÉNDICE 5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MINIMA (CBM)

MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN AGAR (Koneman 1996)

PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y DILUCIONES

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

INOCULACIÓN E INCUBACIÓN DE LOS TUBOS

Se prepara un inóculo que contiene 1×10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colonia/mL) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utiliza el estándar 0,5 de MacFarland). Incubar los tubos a 35°C durante 24 horas. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO₂ a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo. Con un hisopo se puntean los microorganismos en todas las concentraciones a ensayar.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

antimicrobiano para matar a un organismo se realiza la prueba de actividad bactericida que emplea el mismo sistema de dilución en agar. En aquellas cajas en donde se observa un descenso drástico de la población bacteriana (99.9 % de inhibición), se denomina Concentración Bactericida Mínima (CBM).

MICROTÉCNICA DE DILUCIÓN EN CALDO (Koneman, 1996)

La microtécnica de dilución en caldo sigue el mismo principio que el método de macrodilución en agar, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos (bacterias y levaduras) a los antimicrobianos se determina en fase líquida, en una serie de microtubos moldeados en una placa de ELISA de noventa y seis pozos. La placa se prepara colocando 50 μ L de caldo (Müller-Hinton para ensayos con bacterias o Sabouraud para levaduras) más extracto en cada celda a diferentes concentraciones experimentales (en este caso 6.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL)

Se prepara la suspensión bacteriana de acuerdo al método descrito anteriormente (Apéndice 4, apartado 'Inoculo: Bacterias') hasta alcanzar el estándar N° 0.5 de McFarland. De esta suspensión se toman 100 μ L y se le adicionan 99.9 mL de solución salina al 0.9% obteniendo así una concentración de 1×10^5 bacterias/mL. Cada celda se inocula con 50 μ L de esta suspensión bacteriana. Una vez inoculada la placa se tapa para evitar la desecación y se incuba por 24 hrs. a 37 °C.

Pasado este tiempo se añaden 50 μ L a cada celda de una solución de cloruro de tetrazolio (TTC) al 0.08% y se incuba a 37°C esta vez por 30 min. En las celdas donde se desarrollan los microorganismos esta sustancia es reducida a

formazán, produciéndose una coloración rojiza-violácea, de lo contrario significa que no hay desarrollo bacteriano y la solución permanece clara. Es muy importante mantener protegida la placa de la luz, debido a que esto puede alterar los resultados.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la CMI y la concentración que produce una inhibición completa del desarrollo representa la CBM. Para obtener significancia estadística esta prueba se hace por triplicado.

APÉNDICE 6. ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO (Muroi *et al.*, 1993)

Este método se emplea para determinar el efecto que tiene el extracto sobre el desarrollo in vitro de cierto patógeno susceptible a CMI y CBM del extracto activo; de esta forma se determina el tipo de inhibición, sea bactericida o bacteriostática, así como el número de impactos necesarios para que ocurra.

Las placas de cultivo se preparan como describe el apéndice 4 (sección *Medio*), utilizando cajas de Petri estériles de tres septos.

Se prepara el inóculo de la cepa a desafiar como se describe en el apéndice 4, (*Inóculo Bacteriano*) hasta alcanzar el estándar N° 0.5 de McFarland.

Por cada cepa se requieren, al menos, 4 tubos con 10 mL c/u, de caldo M-H previamente esterilizado, en los que se diluye la cantidad de extracto que marque

la CBM, la CMI y $\frac{1}{2}$ de CMI (uno por cada concentración), rotulándolos, cuidando de no confundirlos. Uno de ellos, que no contiene extracto, será el Testigo.

Alícuotas de 100 μ L del inóculo se depositan en los tubos problema y el testigo al inicio del ensayo (Tiempo cero). La concentración final de los tubos debe ser aproximadamente 1×10^5 bacterias/ mL.

Este ensayo consiste en una serie de muestreos de los tubos problema, incubados a 35°C sin presión de CO₂ durante todo el tiempo que dura el experimento. Luego del tiempo cero, se muestrea cada hora los primeros 4, seguido de 2 muestreos cada 2 horas; uno a las 12 hrs de iniciado el experimento y el último a las 24 hrs. En cada uno se hacen al menos 2 diluciones en tubos con solución salina al 0.5% para una mejor determinación de las unidades formadoras de colonias que ocurren en cada tiempo.

Se grafica el logaritmo del número de sobrevivientes en el eje de las “Y” contra el tiempo de incubación del eje de las “X”, para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la muerte de la bacteria, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas (Davis et al, 1996).

APÉNDICE 7. MÉTODO CUALITATIVO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL (WANG Y BUN, 2002)

Este ensayo se fundamenta en el método de difusión en agar (apéndice 4), con modificaciones inherentes a la biología propia de los hongos filamentosos.

La preparación de los SSD así como de las placas de cultivo se detalla en el apéndice 4. Conviene aclarar que se utilizan cajas Petri de 100 X 15 mm con agar PDA y los SSD de C+ contienen Ketokonazol. Es importante también, que estas placas cumplan con la prueba de susceptibilidad.

METODO.

Con la boca de una pipeta Pasteur, se toma un botón de 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Se deposita este botón de micelio dentro de la placa de Kirby-Baüer. Una vez que el micelio ha crecido alrededor de 10 mm de diámetro se colocan los SSD a una distancia aprox. de 30 mm del límite micelial. Acto seguido, se incuban a 23 °C durante 72 horas. Para determinar que existe actividad inhibitoria, se debe observar que el micelio no crece más allá de la zona de difusión del extracto, formando un medio círculo alrededor del SSD. Por el contrario, si se extiende sobre el área del SSD, significa que no hay inhibición del crecimiento. Para obtener significancia estadística, en todos los casos esta prueba se hace por triplicado.

APÉNDICE 8. MÉTODO CUANTITATIVO DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL (WANG Y BUN, 2002)

Se utilizan 5 mL de agar papa dextrosa a 45°C para diluir cada concentración del extracto o látex a probar (4.0, 3.0, 2.0, 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL), mismos que se vierten por triplicado en cada pozo de placas ELISA de 24 celdas. Luego de 24 horas, se coloca una pequeña cantidad de micelio (1x1 m) en cada celda. Se diluyen 200 µL de DMSO en 5 mL de agar como C- y Ketoconazol en 6

diferentes concentraciones (0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 y 1.70 µg/mL) como C+. Las placas se incuban a 23° C durante 48 horas, luego de lo cual se mide el área ocupada por el micelio.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (Canales *et al.*, 2011)

Se reportan los resultados en términos de la Concentración Fungicida Mínima (CFM), que es la concentración que representa el 100% de inhibición y de la Concentración Fungicida Media (CF₅₀), que representa al 50% de inhibición del crecimiento micelial. Ambos datos se calculan mediante el modelo de regresión lineal, ajustado al inverso de la hipérbola rectangular, donde las abscisas representan la concentración de extracto y las ordenadas el porcentaje del promedio de inhibición del crecimiento del hongo por triplicado. Los porcentajes son calculados mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{de Inhibición} = \frac{dc - df}{dc} \times 100$$

Dónde

dc, es el diámetro del crecimiento micelial del Testigo o Control

df, es el diámetro del crecimiento micelial del Tratamiento

APÉNDICE 9. MÉTODO DE REDUCCIÓN DEL RADICAL 2, 2- DIFENIL-1- PICRILHIDRACIL (DPPH) (MODIFICADO DE MURILLO, 2006).

El estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, es por ello que el uso de antioxidantes en farmacología es estudiado de forma intensiva, actualmente existen diversos métodos para determinar la actividad antioxidante, los cuales se basan en su capacidad para

captar radicales libres. Entre ellos se encuentra el uso del 2,2-difenil-1-picril hidracilo (DPPH \cdot), el cual consiste en un radical con un electrón desapareado, es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por la reacción de la presencia de una sustancia antioxidante, siendo medida espectrofotométricamente a 517 nm.

Por diferencia de absorbancia se determina el porcentaje de captación de radical libre DPPH (Ramos *et al.*, 2008)

La actividad antioxidante de los extractos se evalúa midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución MeOH de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-100 ppm), midiendo la colorimetría al término de la reacción por medio de espectrometría UV-VIS. Los datos obtenidos se expresan de acuerdo al cálculo de la Concentración Antioxidante Media (CA₅₀) la cual indica el 50% de la reducción de las moléculas de DPPH en una muestra.

MÉTODO

En una placa de ELISA de noventa y seis pozos, se adicionan, por triplicado, 50 μ L de cada disolución problema a diferentes concentraciones (2-100 ppm) utilizando MeOH de alta pureza (grado HPLC). Posteriormente a cada pozo experimental se adicionan 150 μ L la solución MeOH de DPPH cuya concentración final es 100 μ M/mL. Acto seguido, se debe proteger de la luz y en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA (Método modificado de Murillo, 2006).

CONTROL NEGATIVO

Pozos con 200 μ L de MeOH.

CONTROL POSITIVO

Se utiliza quercetina en las mismas concentraciones que el compuesto problema.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS (YEN Y DUH, 1994)

Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con

la siguiente fórmula:

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

En donde:

C= Absorbancia del control positivo

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

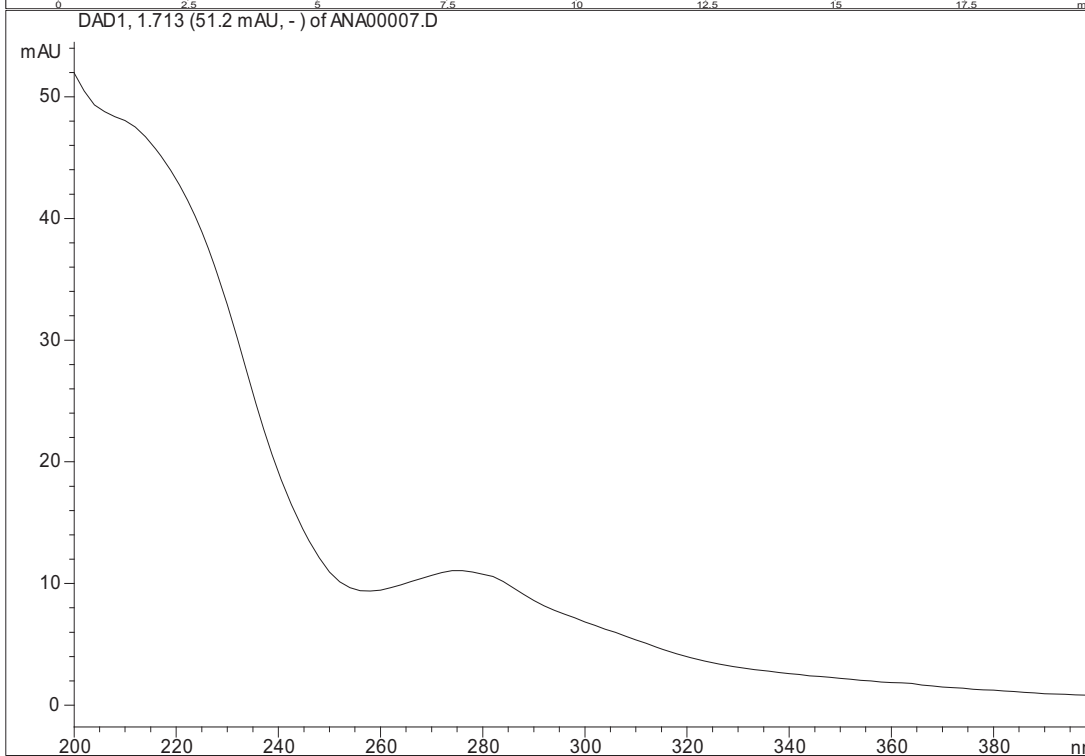
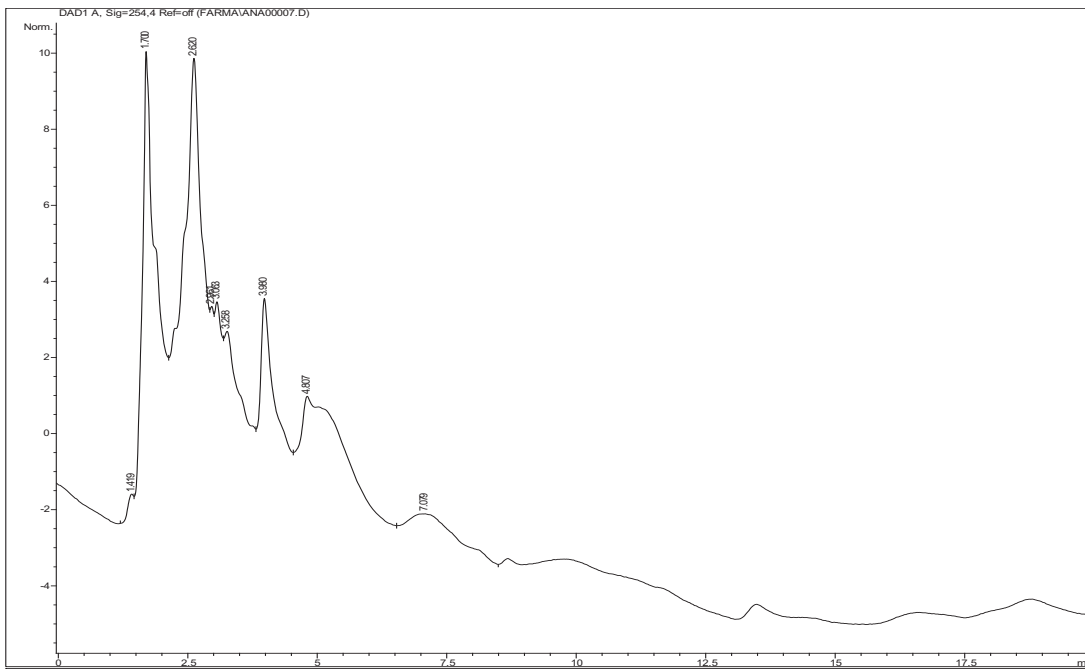
Cuadro 21. Concentraciones para preparar las soluciones problema para evaluar la actividad antioxidante.

[] ppm	μ l STOCK	μ l MeOH
1	4	996
2	8	992
4	16	984
6	24	976
8	32	968
10	40	960
15	60	940
20	80	920
25	100	900
30	120	880
35	140	860
40	160	840
45	180	820
50	200	800
60	240	760
70	280	720
80	320	680
90	360	640
100	400	600

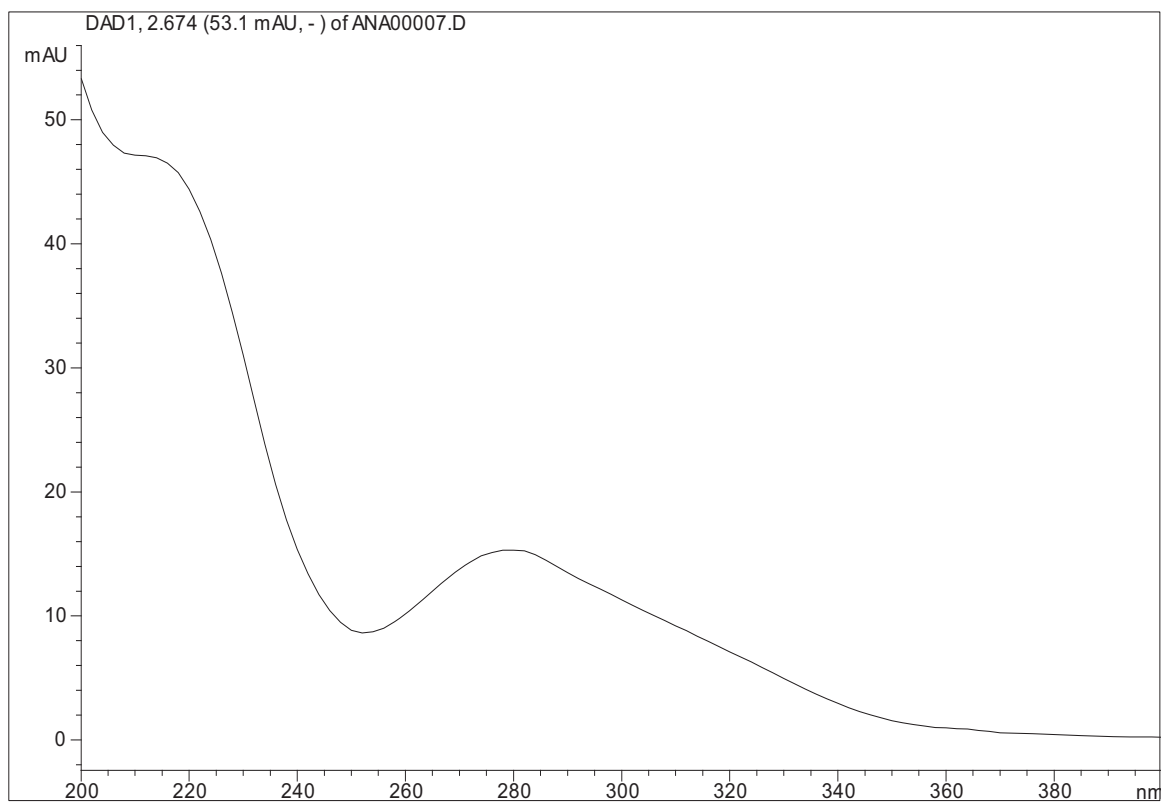
Debido a que los datos se comportaron como una hipérbola rectangular la ecuación se ajusta sacando los inversos de X y Y, en la ecuación de hipérbola rectangular (Canales 2011).

APÉNDICE 10. ESPECTROS DE LUZ ULTRAVIOLETA

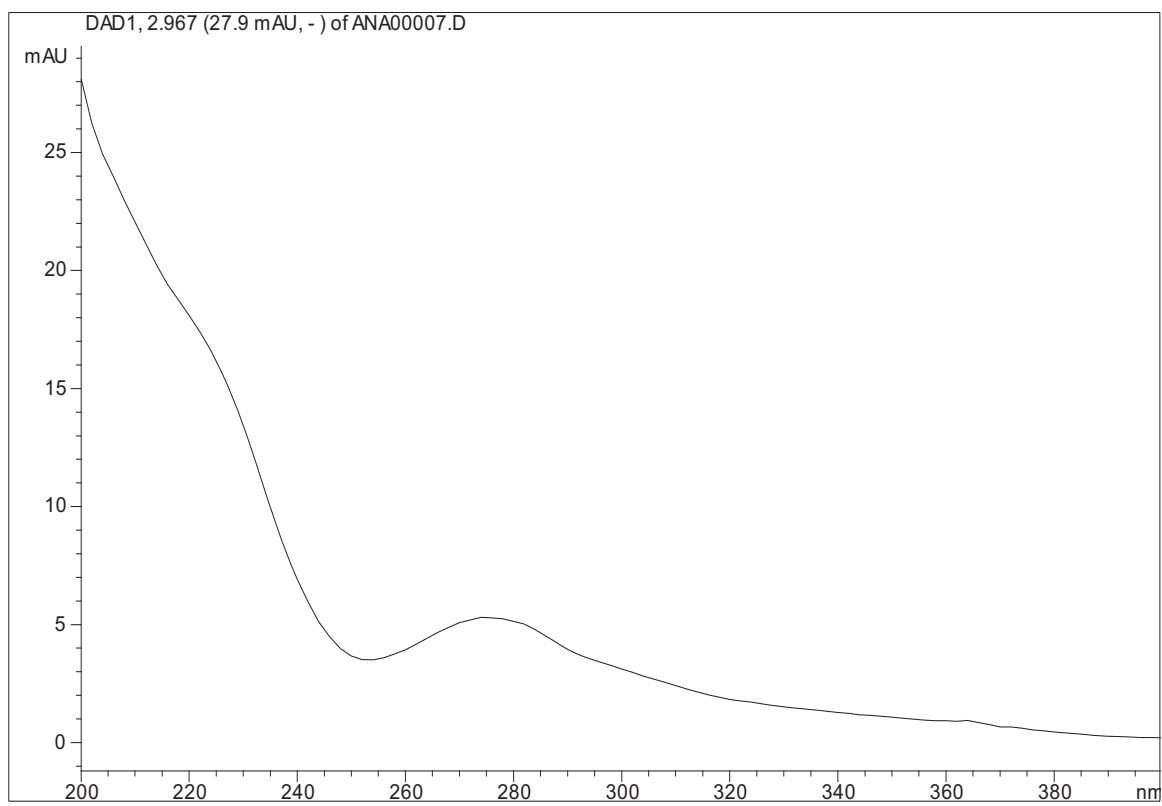
EXTRACTO METANÓLICO CRUDO (M1).



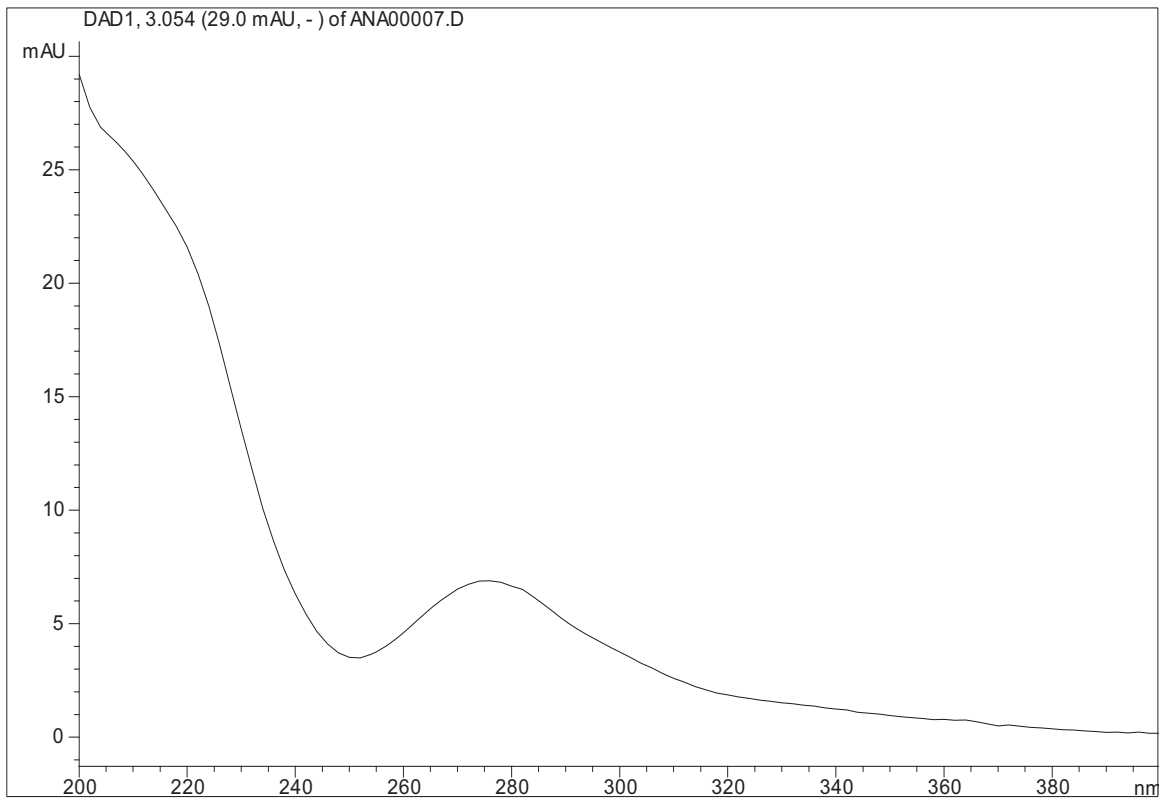
276 NM



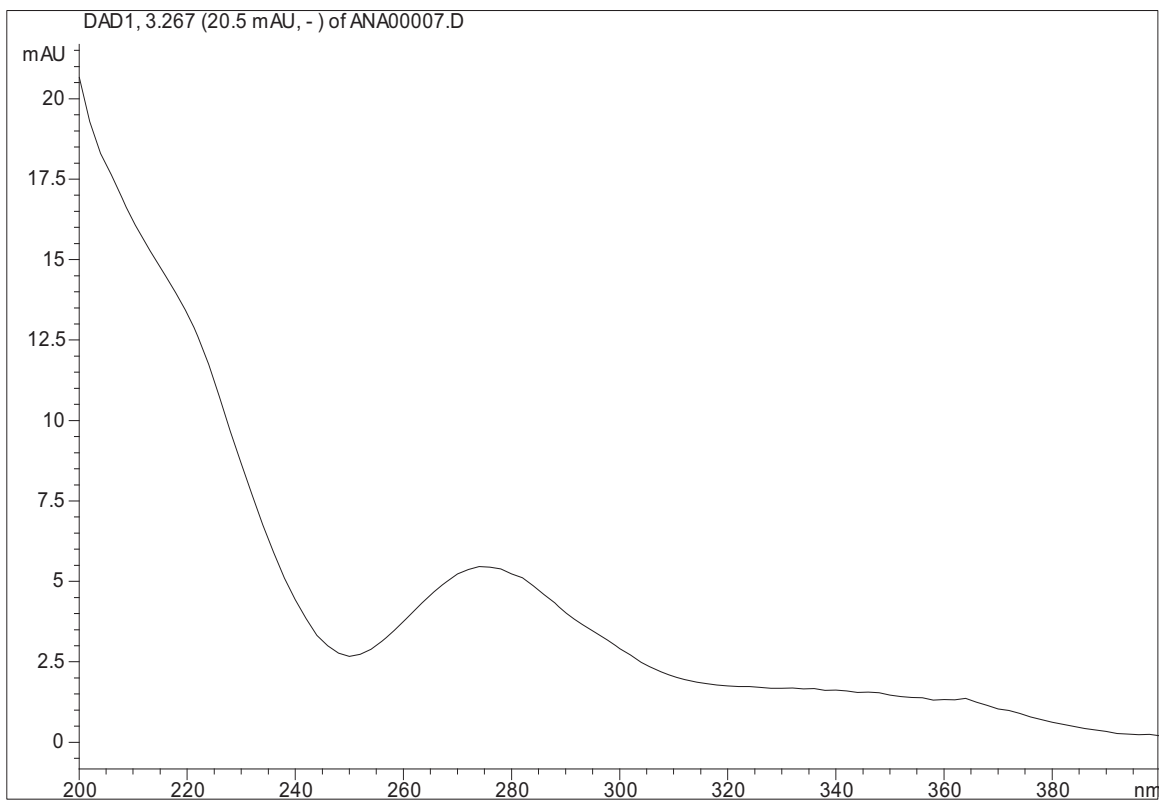
216 280



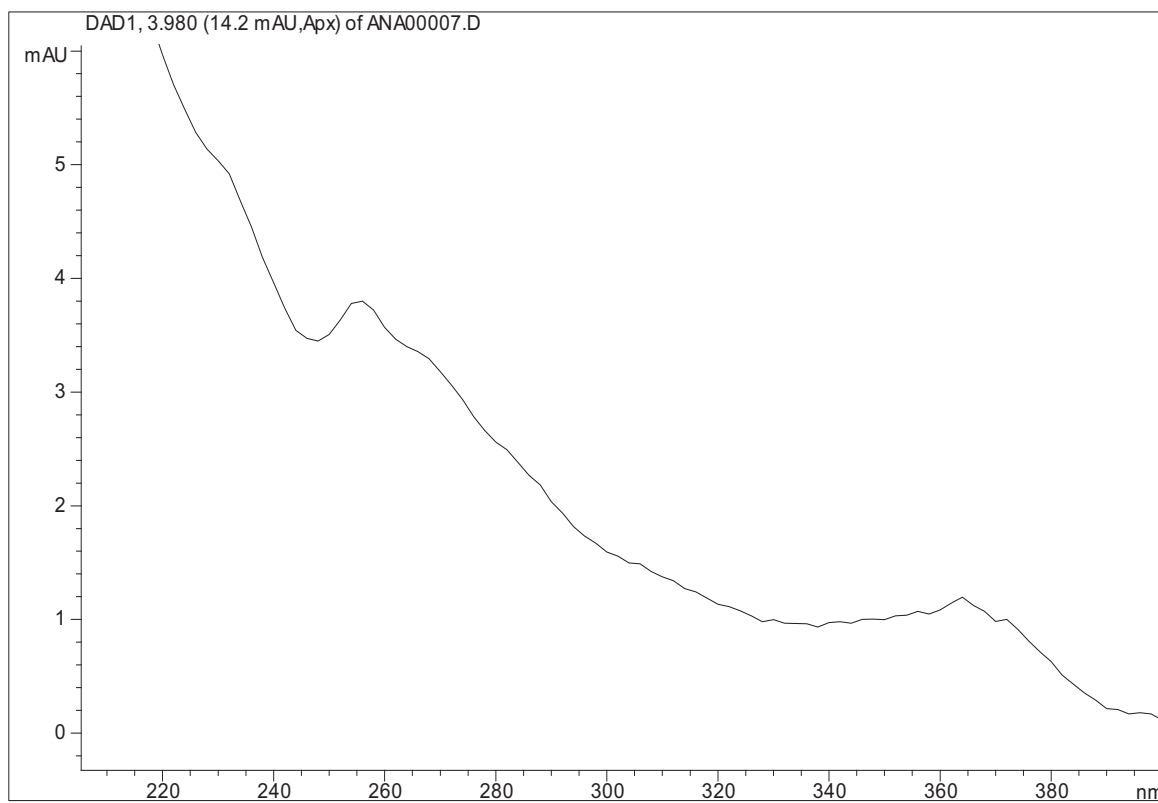
276



276 NM

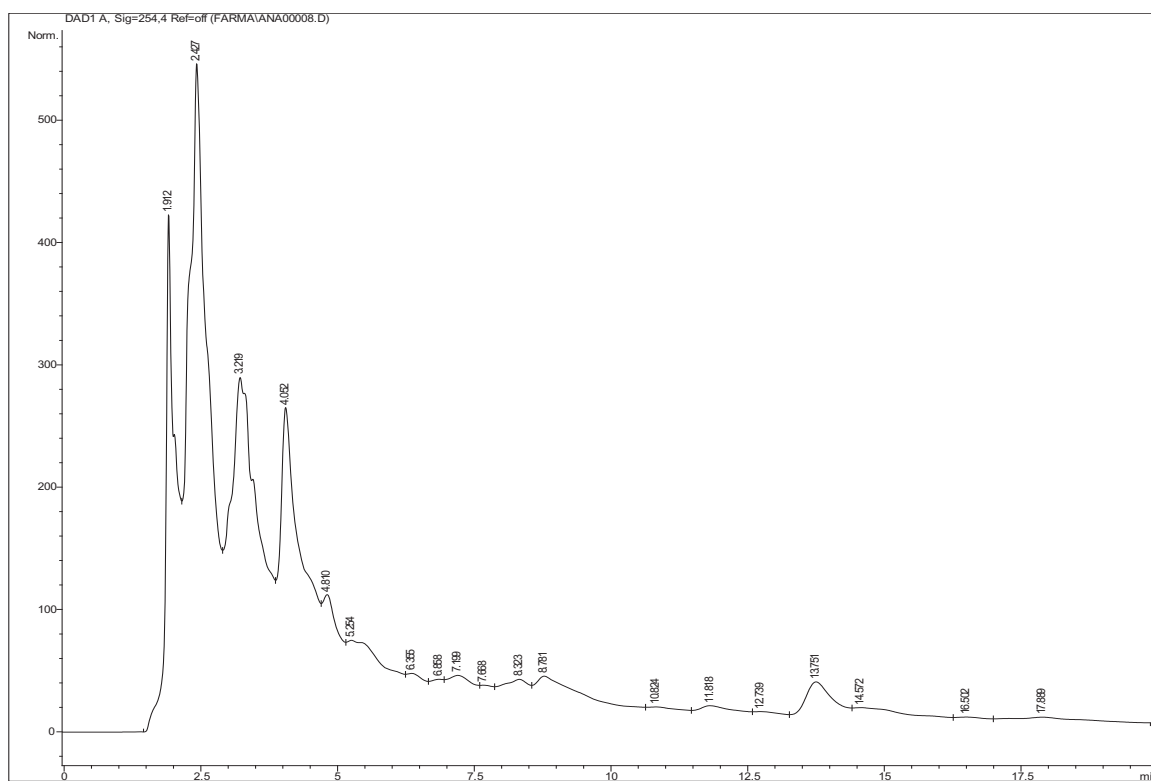


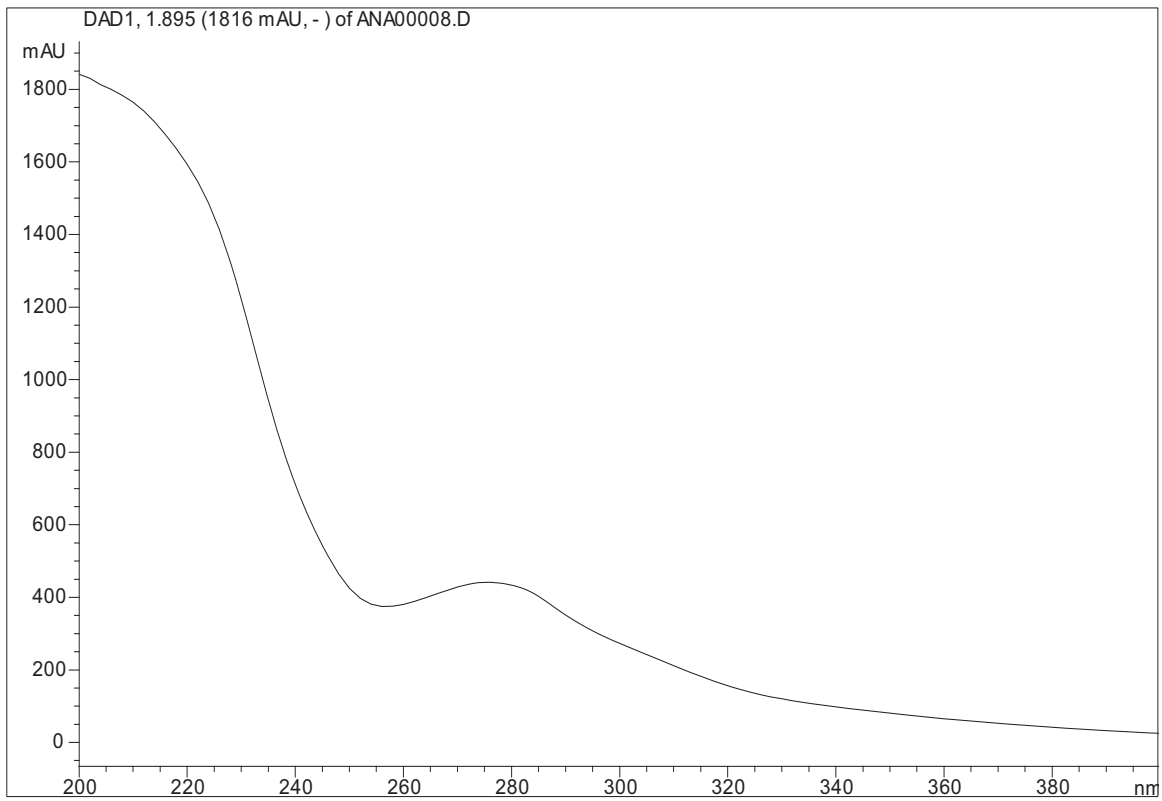
276 NM



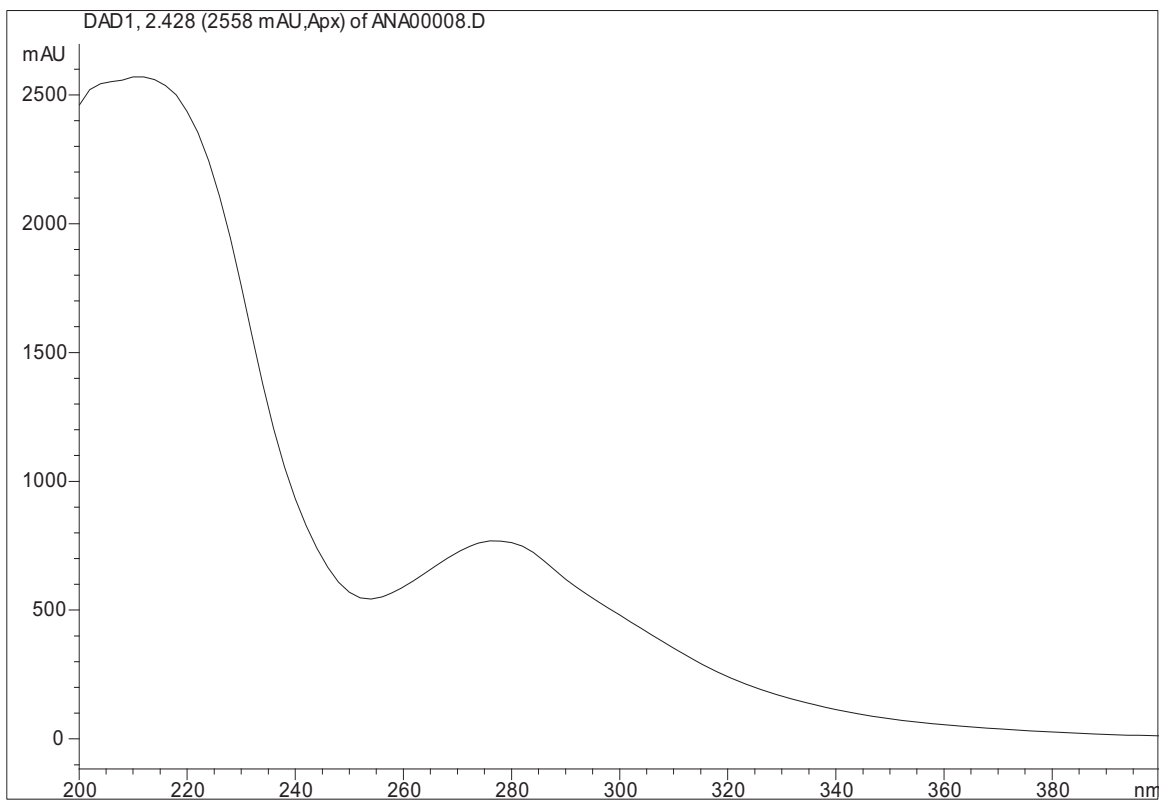
256 364 NM

EXTRACTO METANÓLICO, LIRE DE COMPUESTOS NO POLARES (M2).

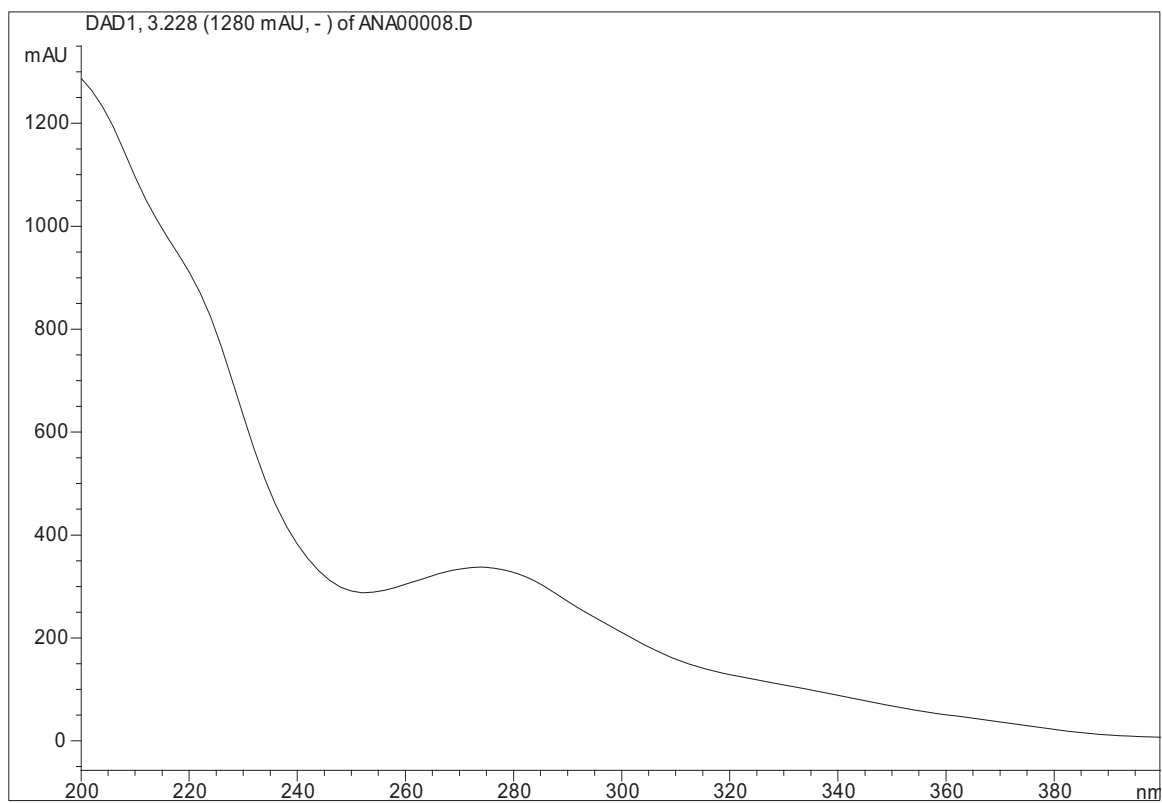




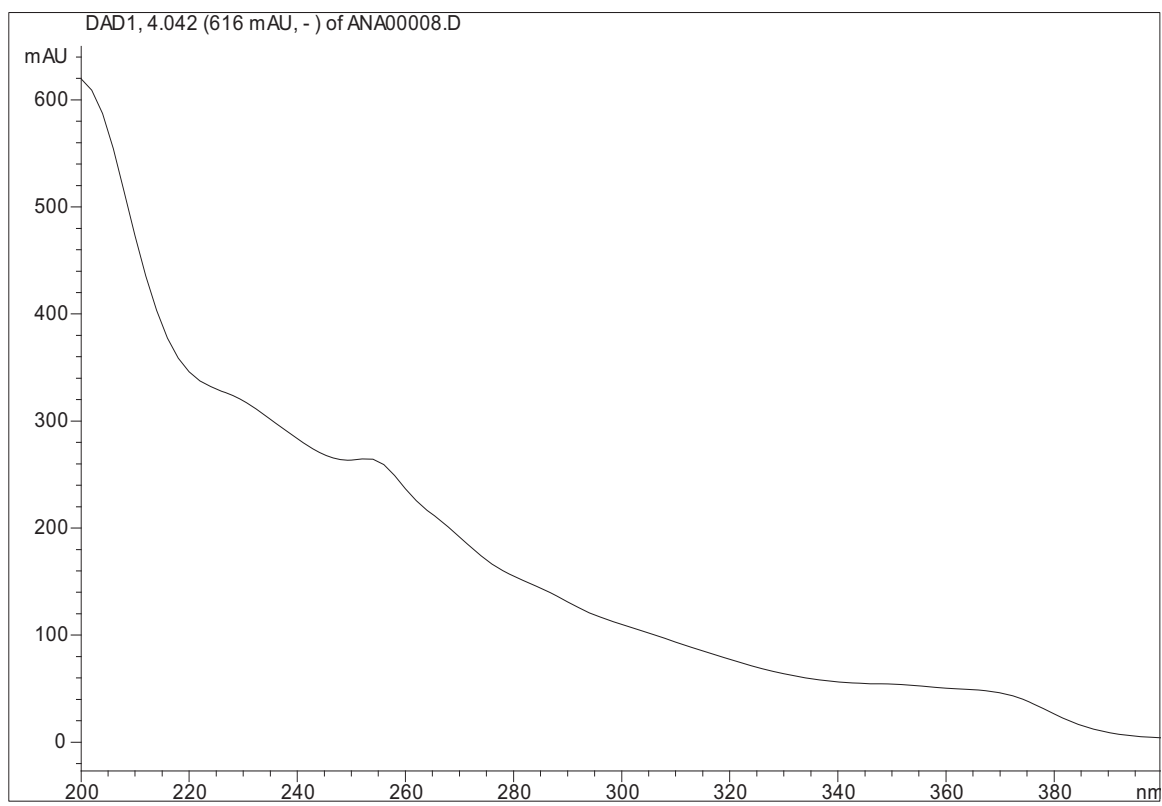
276 NM



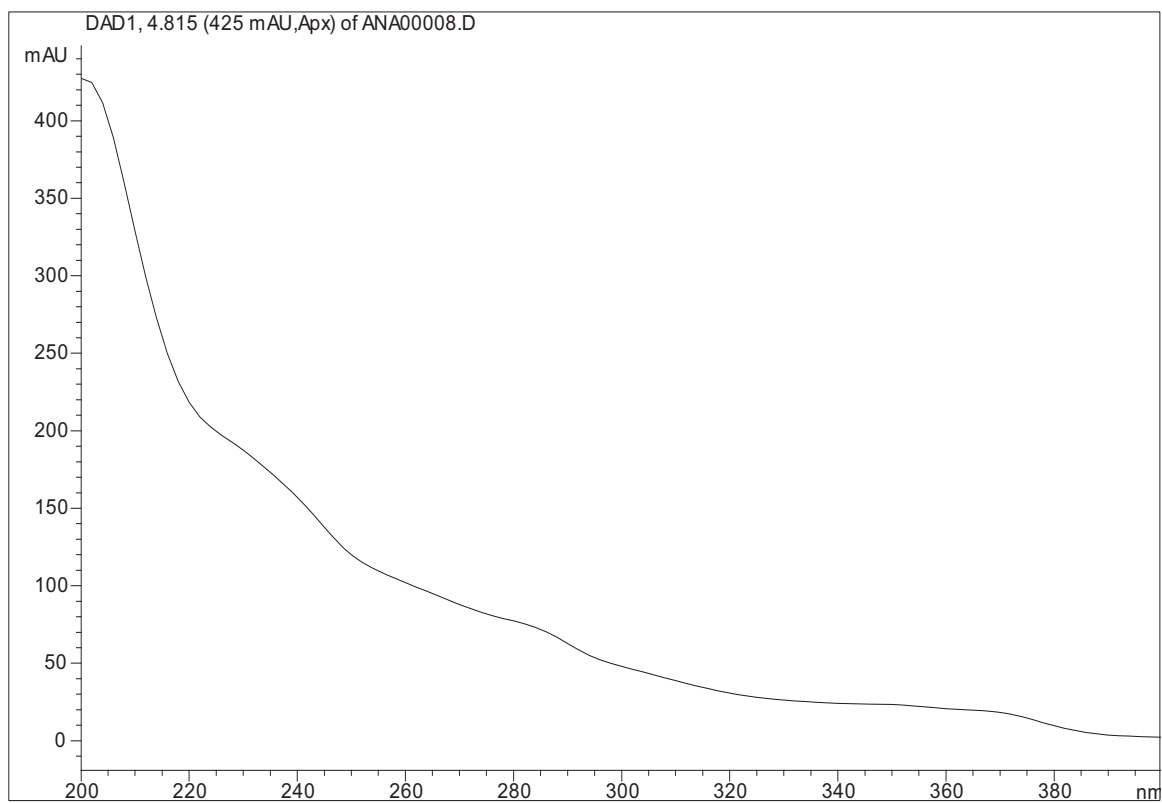
212 278 NM



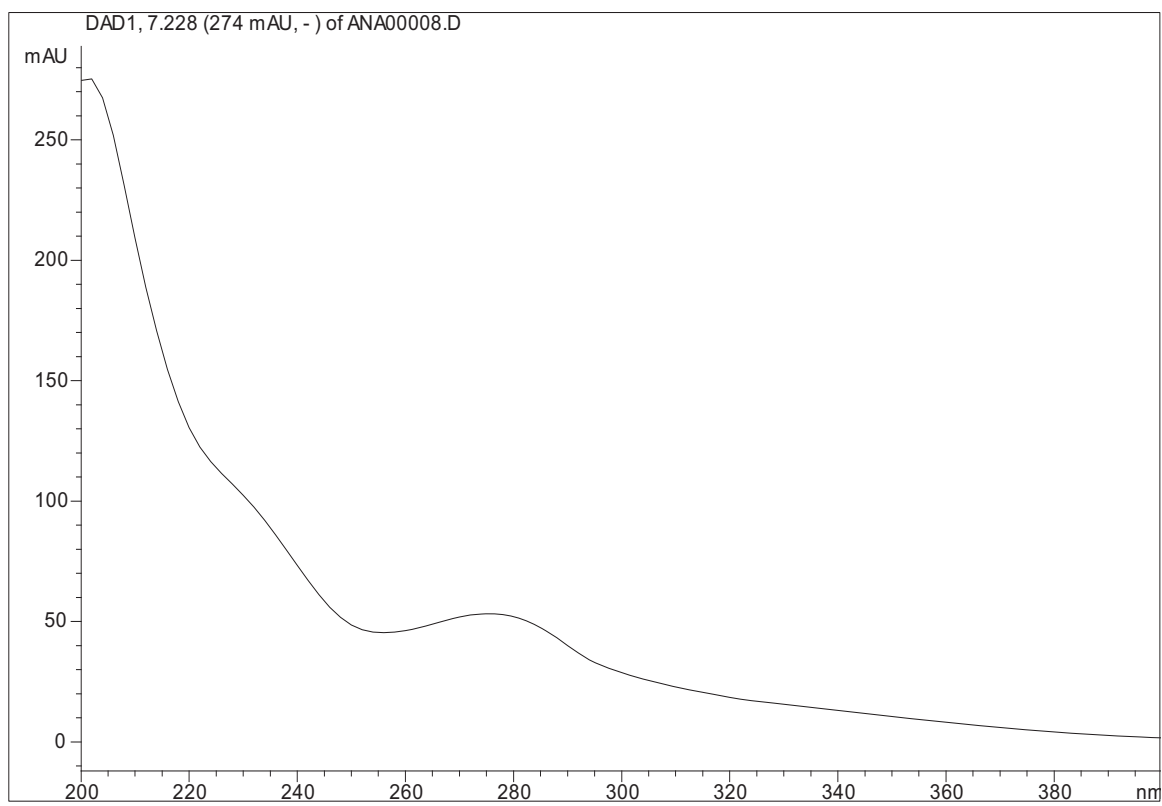
274 NM



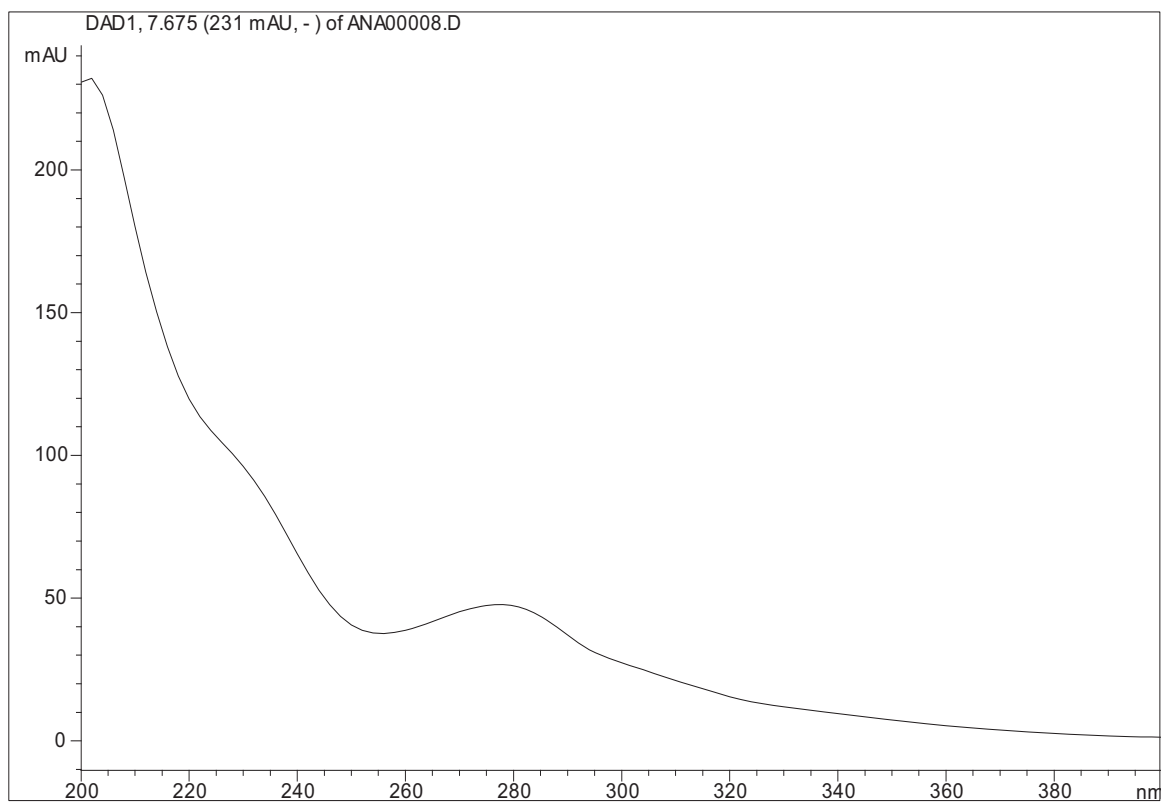
256 NM



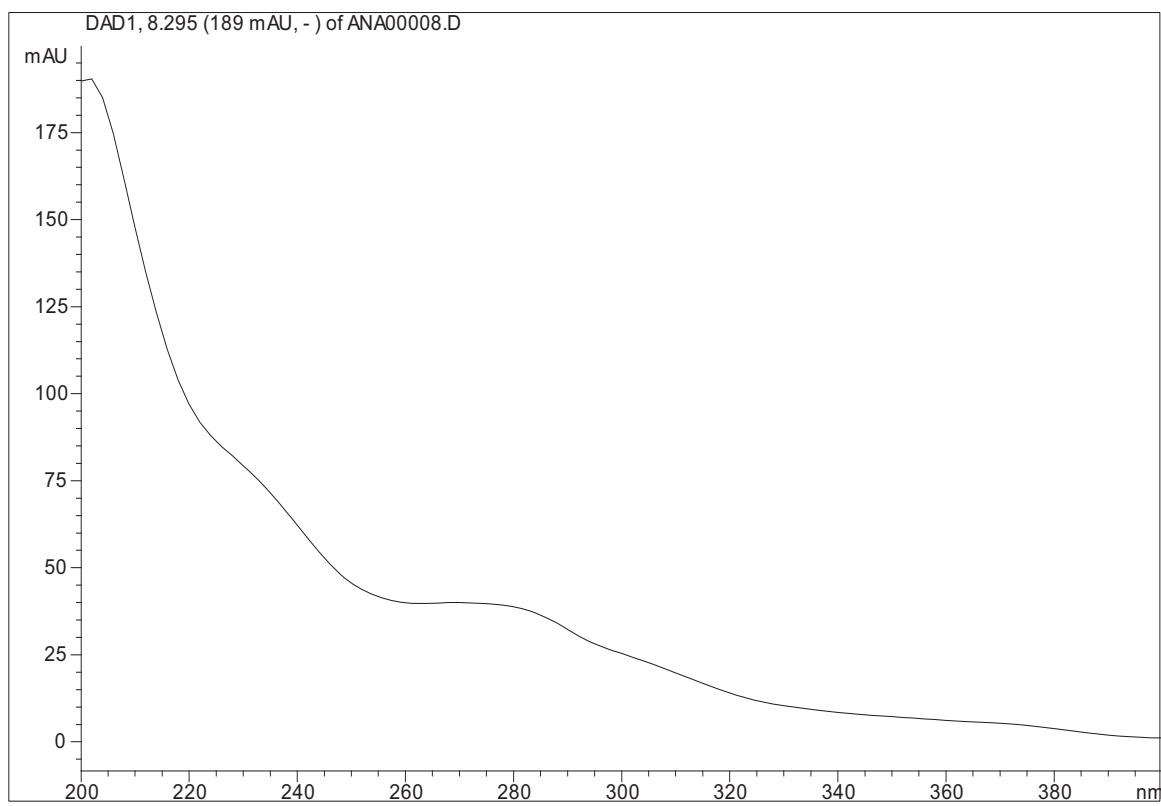
236 284 NM



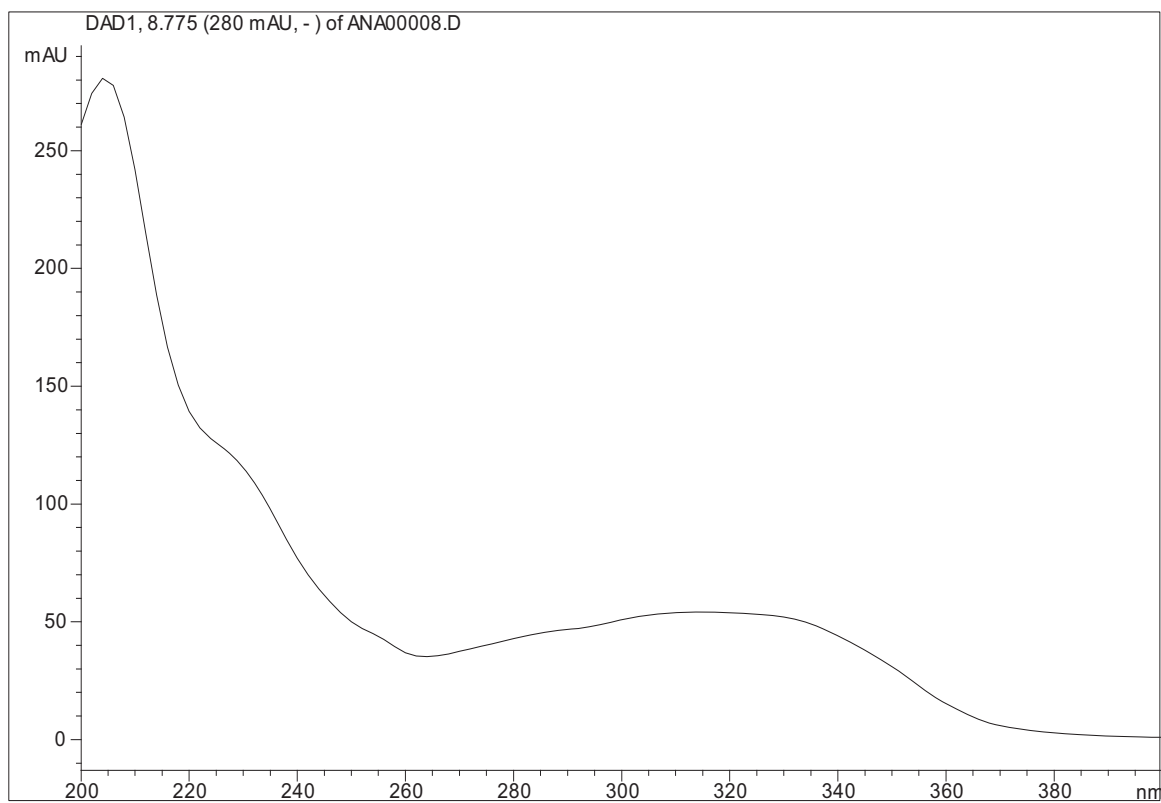
278 NM



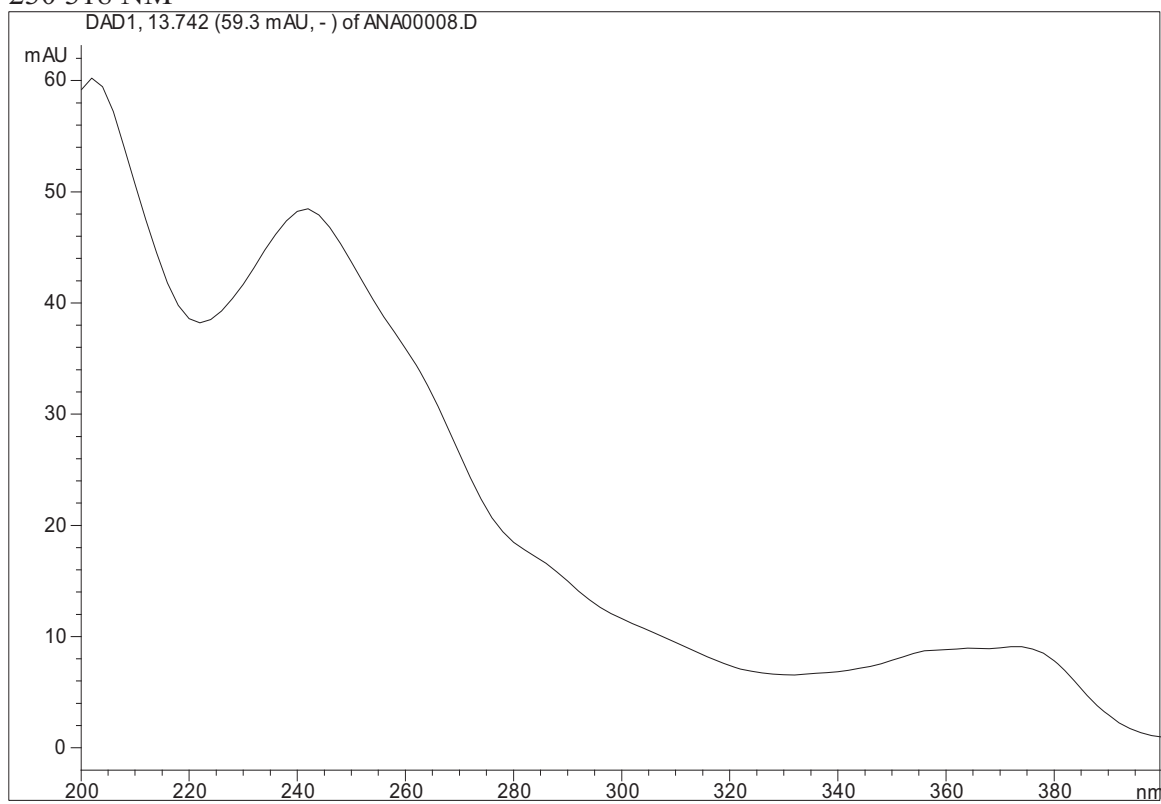
278 NM



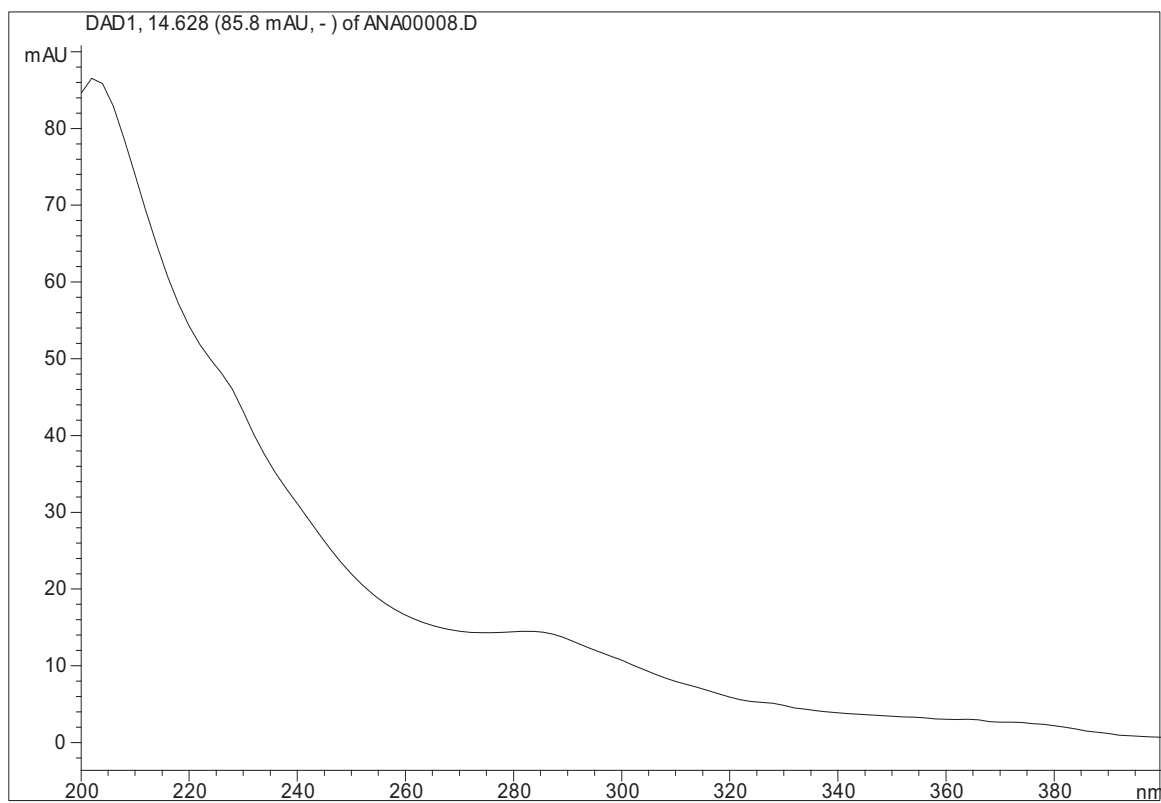
278 NM



230 318 NM

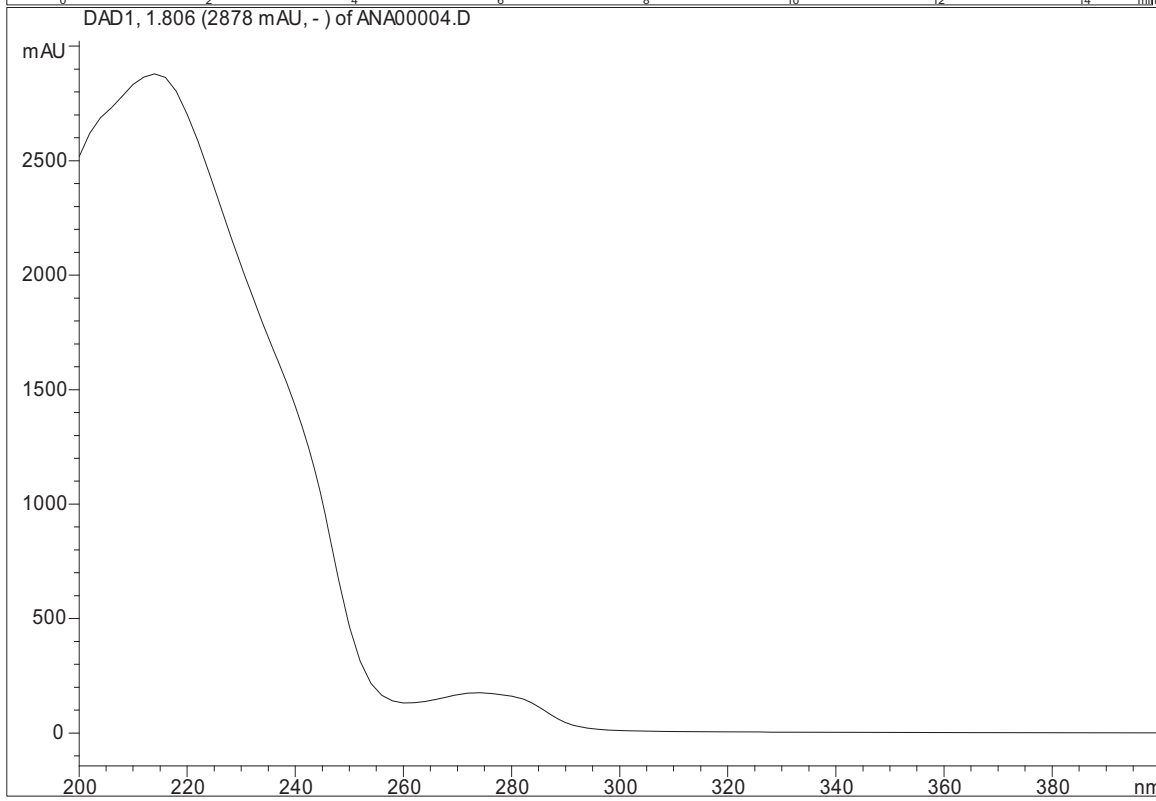
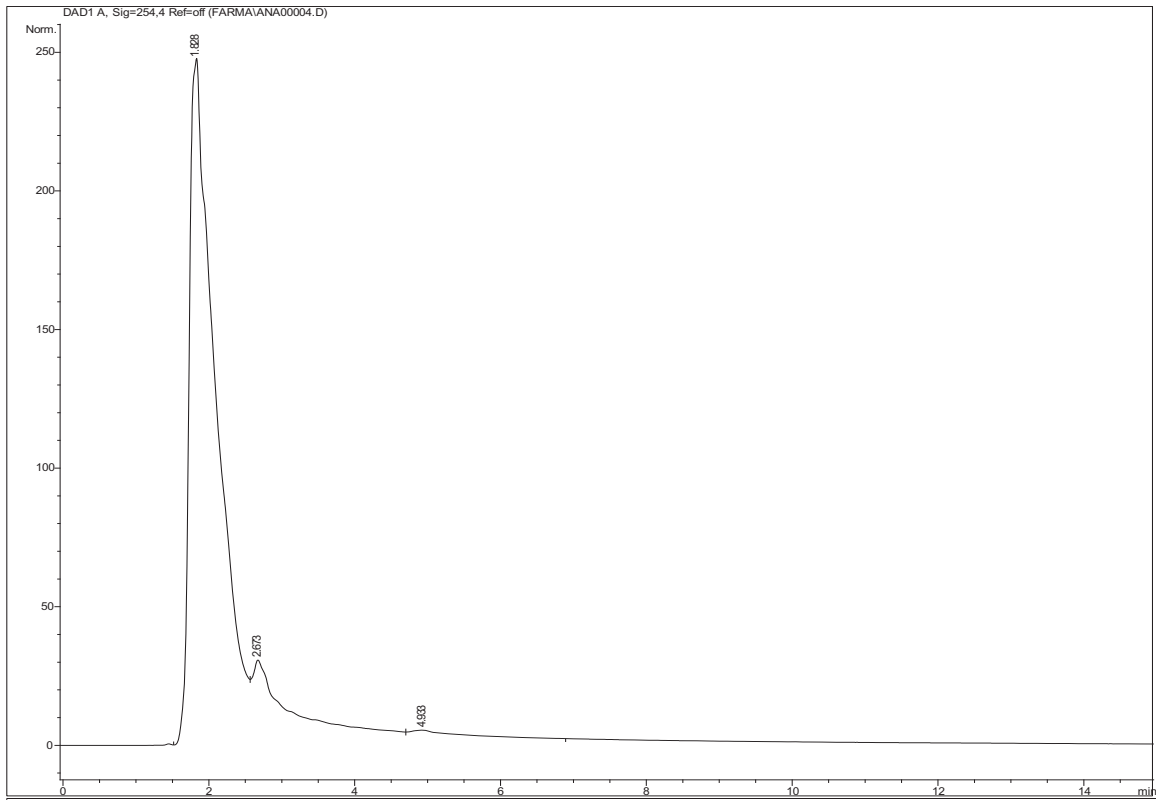


242 370 NM

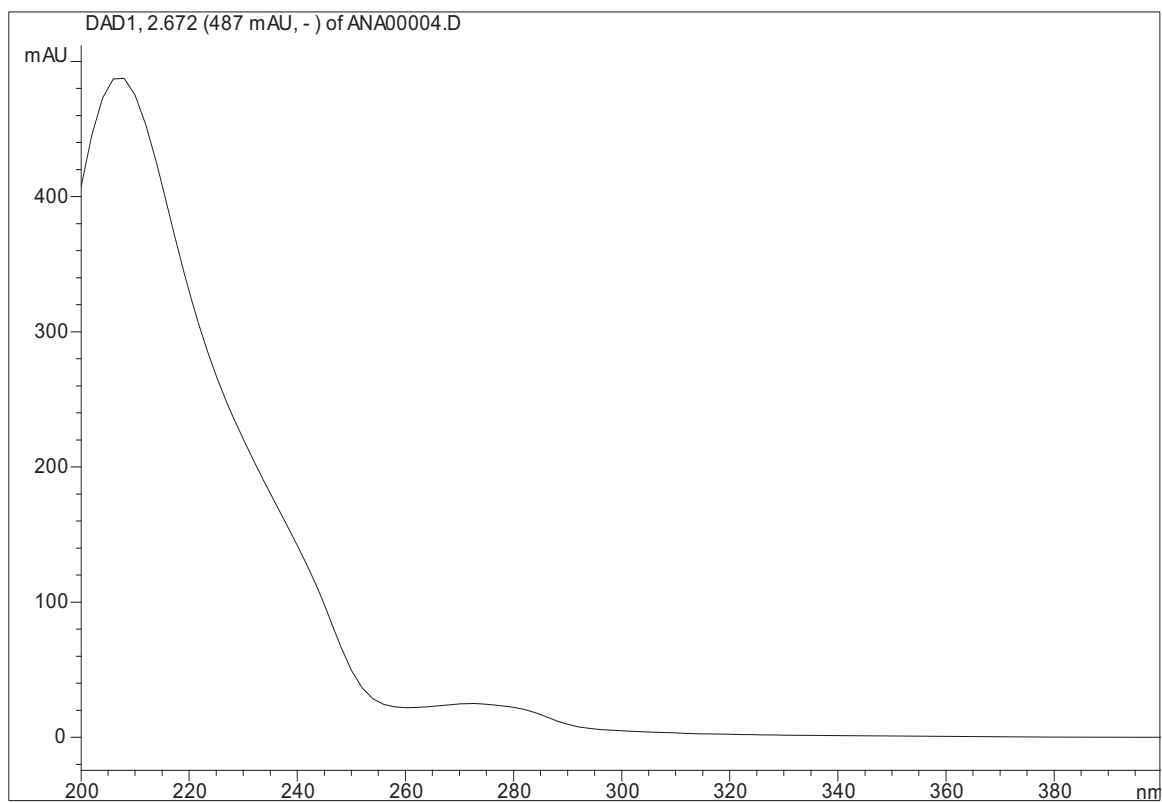


290 NM

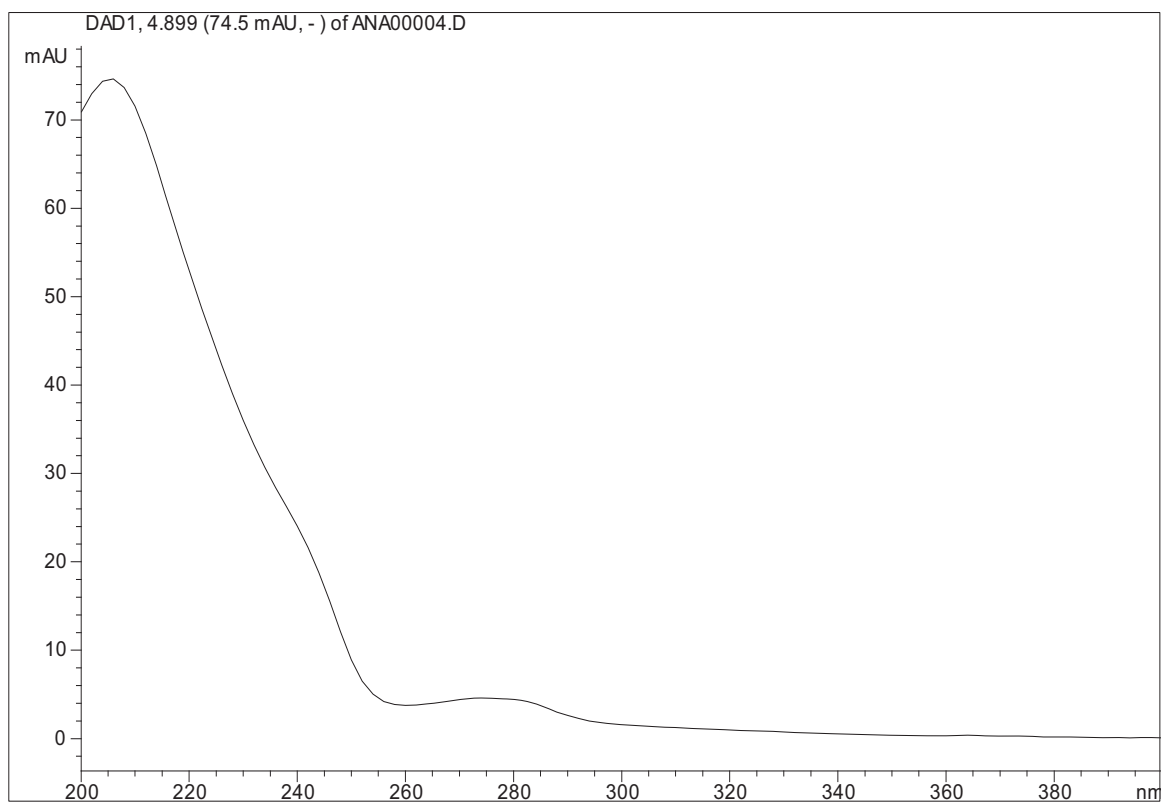
LATEX FRESCO (Lf).



276 nm

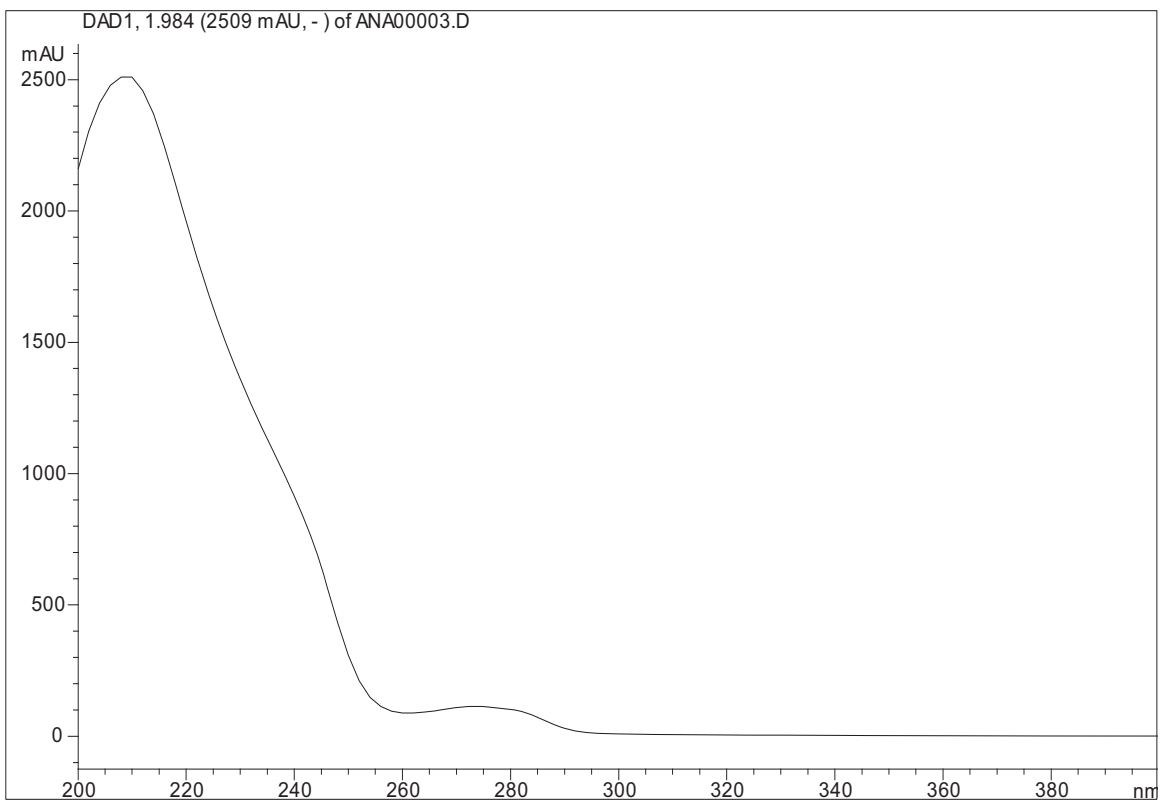
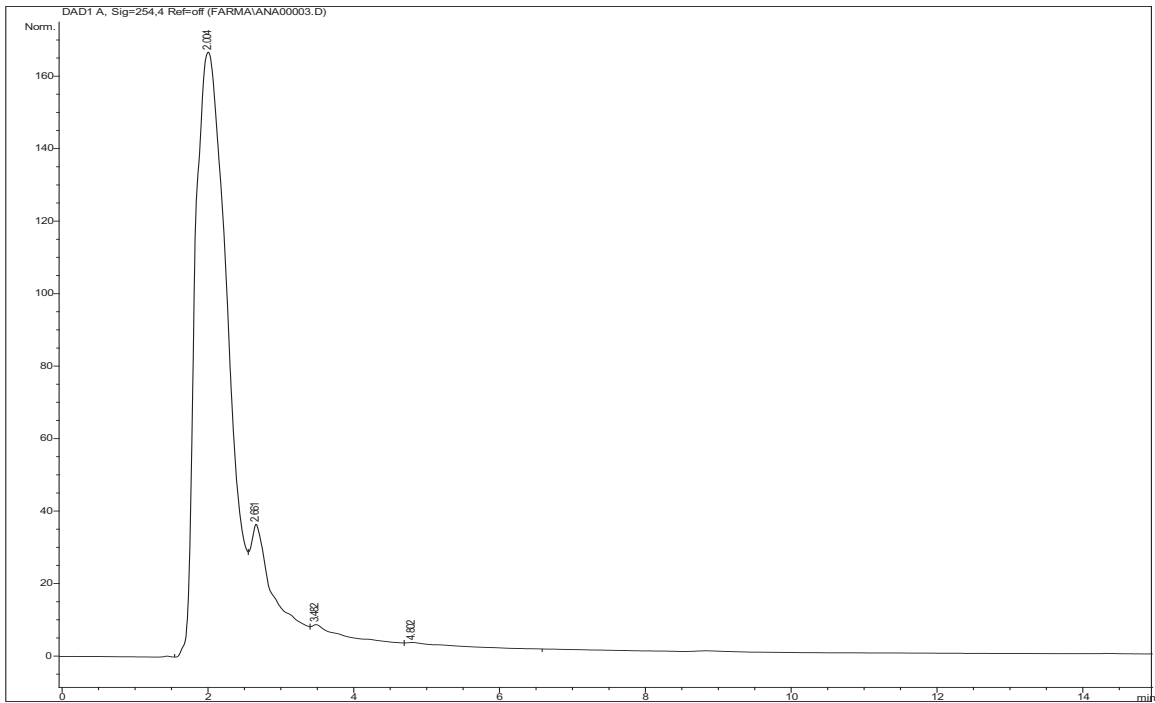


272 nm

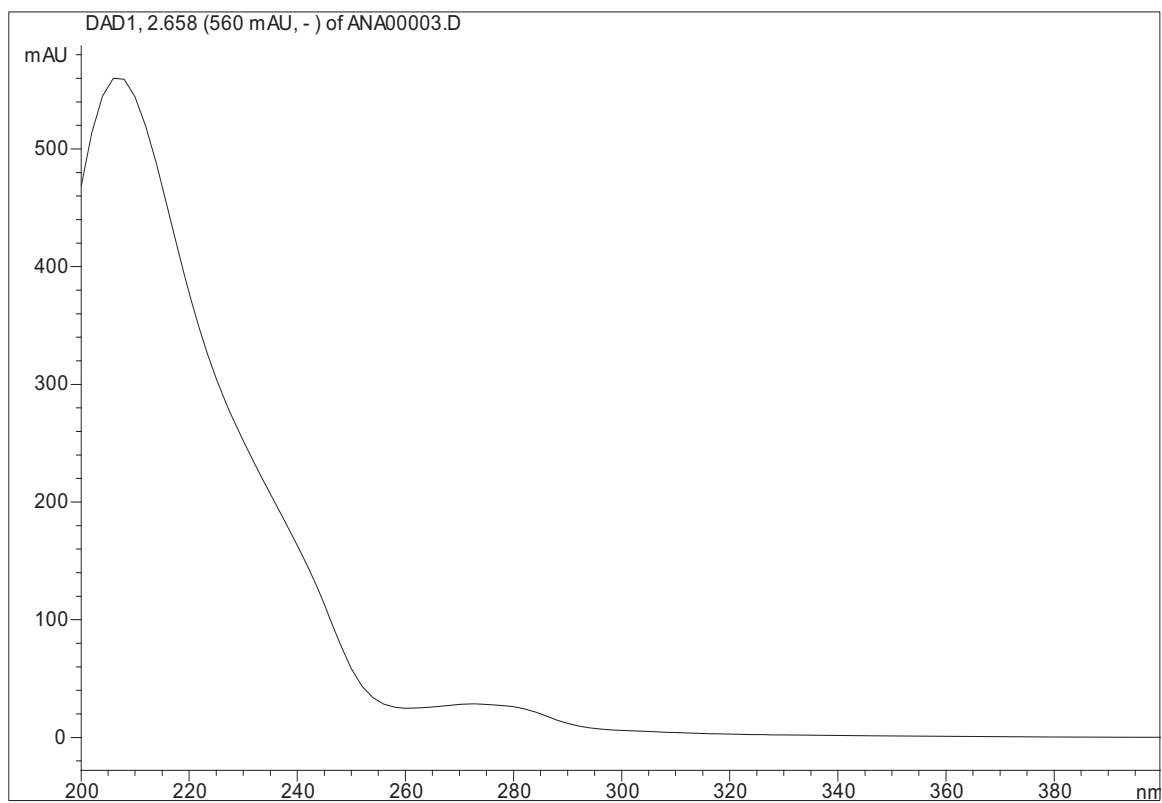


274 nm

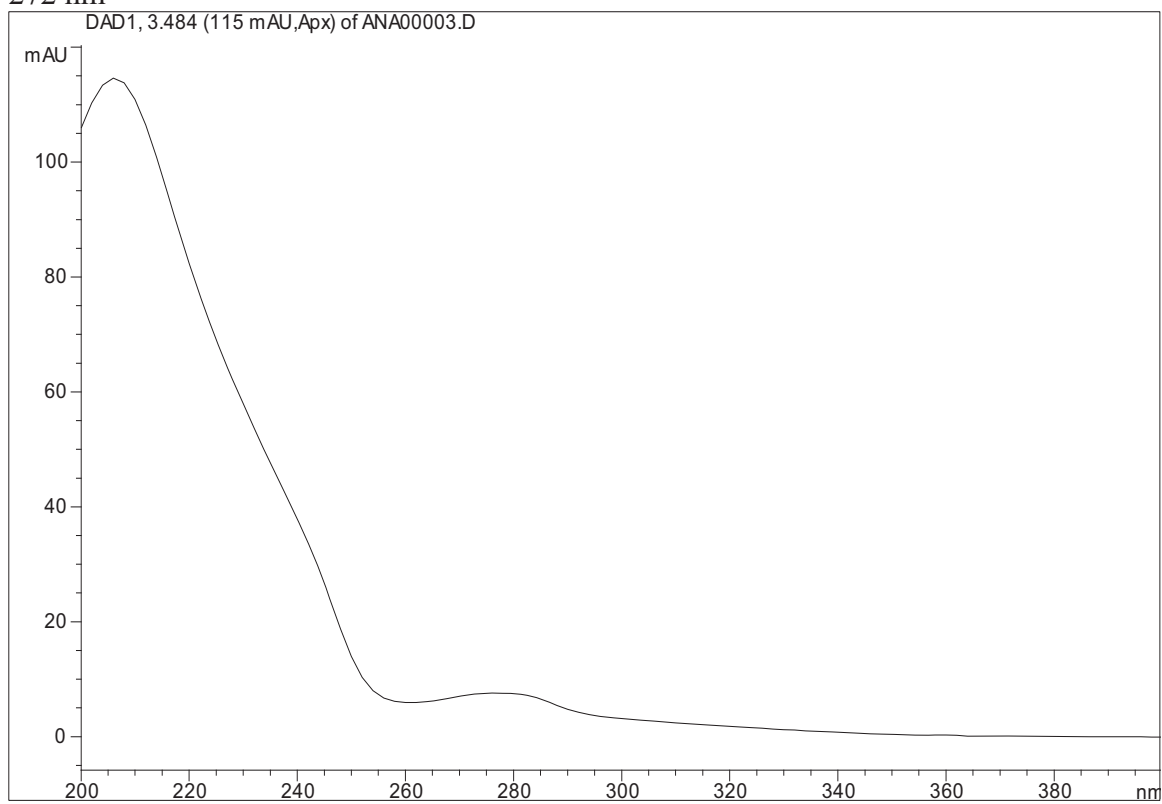
LATEX ESERILIZADO (Le).



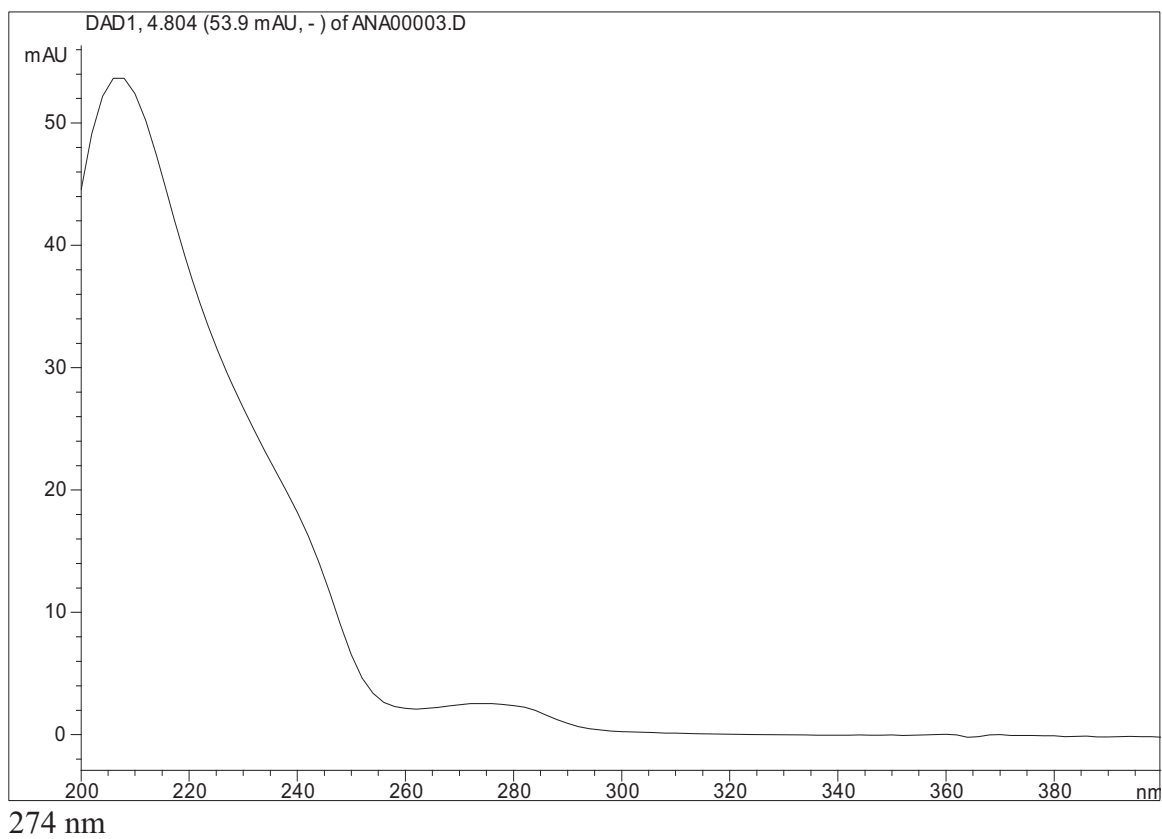
274 nm



272 nm



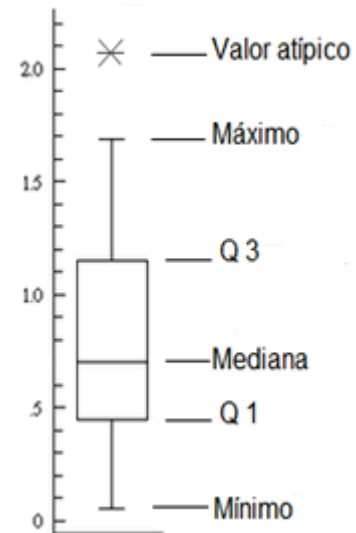
276 nm



APÉNDICE 11. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.

Diagrama de caja: gráfico, basado en cuartiles, mediante el cual se visualiza un conjunto de datos.

Mediana: medida de tendencia central. Es un dato de la distribución que la divide en dos partes iguales de forma tal que por debajo y por encima de ella se encuentra como máximo el 50% de los datos de estudio.



Q3: 3 cuartil, es aquel por debajo del cual ocurre el 75% de las observaciones

Q1: 1 cuartil es el valor por debajo del cual ocurre el 25% de las observaciones

Valor mínimo o máximo: es el dato más pequeño o más grande de la distribución, respectivamente

Valor atípico: dato que se aleja del cuerpo principal de datos

HALOS DE TRATAMIENTOS

Variable	Extracto	Prom	DevSt	Min	Q1	Media	Q3	Max	
Halo	H	3.635	3.264	0.0	0.000	5.000	6.000	9.000	
	Lf	8.429	3.472	0.0	7.000	9.000	10.001	4.000	
	Le	7.175	4.241	0.000	7.000	9.000	10.000	13.000	
	M1	4.222	4.780	0.00	0.0	0.00	8.0	15.0	
	M2		6.159	4.742	0.0	0.0	6.000	8.00	15.0

HALOS DE EXTRACTOS CONTRA TIPO DE CEPA BACTERIANA.**EXTRACTO H**

Variable	Tipo	Prom	DevSt	Min	Q1	Media	Q3	Max
Halo	Gram negativas	2.556	3.166	0.0	0.0	0.0	6.0	9.0
	Gram positivas	5.074	2.854	0.0	6.0	6.0	7.0	9.0

LÁTEX FRESCO.

Variable	Tipo	Prom	DevSt	Min	Q1	Media	Q3	Max
Halo	Gram negativas	7.750	4.272	0.0	6.0	8.0	10.75	14.0
	Gram positivas	9.333	1.641	7.0	8.0	9.0	10.00	13.0

LÁTEX ESTERILIZADO

Variable	Tipo	Prom	DevSt	Min	Q1	Media	Q3	Max
Halo	Gram negativas	5.389	4.729	0.0	0.0	8.0	9.0	13.0
	Gram positivas	9.556	1.577	7.0	8.0	10.0	11.0	12.0

EXTRACTO M1

Variable	Tipo	Prom	DevSt	Min	Q1	Media	Q3	Max
Halo	Gram negativas	3.028	4.742	0.0	0.0	0.0	7.0	15.0
	Gram positivas	5.815	4.429	0.0	0.0	8.0	8.0	12.0

EXTRACTO M2

Variable	Tipo	Prom	DevSt	Min	Q1	Media	Q3	Max
Halo	Gram negativas	5.083	4.971	0.0	0.0	6.0	9.5	14.0
	Gram positivas	7.593	4.079	0.0	6.0	7.0	8.0	15.0

HALOS DE EXTRACTOS CONTRA TIPO DE CEPA BACTERIANA

Variable	Cepa	Prom	DevSt	Min	Q1	Media	Q3	Max
Halo	Sa 12398	7.733	1.223	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0
	S. epidermidis A	3.20	4.09	0.0	0.0	0.0	8.0	9.0
	S. epidermidis FES-C	8.067	1.486	6.0	7.0	8.0	9.0	11.0
	B. subtilis FES-C	9.27	5.22	0.0	8.0	11.0	12.0	15.0
	B. subtilis A	7.467	0.743	6.0	7.0	7.0	8.0	9.0
	Sa 29213	7.600	1.765	6.0	7.0	7.0	8.0	11.0
	E. faecalis	8.27	4.95	0.0	6.0	7.0	9.0	14.0
	M. luteus	8.533	2.167	6.0	6.0	10.0	12.0	12.0
	S. pneumonie	7.13	4.19	0.0	6.0	7.0	10.0	12.0
	P. miriabilis A	4.00	5.32	0.0	0.0	0.0	8.0	13.0
	P. miriabilis C	7.67	5.15	0.0	5.0	8.0	13.0	14.0
	E. aerogenes A	1.267	2.631	0.0	0.0	0.0	0.0	7.0
	E. aerogenes	6.20	3.448	0.0	6.0	7.0	9.0	10.0
	Vch. Tor	7.467	1.407	6.0	6.0	7.0	8.0	10.0
	Vch. CC	4.60	4.45	0.0	0.0	6.0	6.0	13.0
	Vch. agua	7.00	4.60	0.0	5.0	7.0	10.0	14.0
	E. coli ATCC 53218	10.667	2.498	8.0	9.0	10.0	13.0	15.0
	Y. enterocolitica	3.80	5.05	0.0	0.0	0.0	8.0	13.0
	Y. enterocolitica cc	1.20	2.484	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0
	P. aeruginosa	3.27	4.22	0.0	0.0	0.0	7.0	10.0

REFERENCIAS

1. Abad M., Ansuategui M. y Bermejo P. 2007. *Active antifungal substances from natural sources*. Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University Complutense. 116-145 pp.
2. Abreu G. O. A. y Cuéllar C. A. 2008. *Strategies for the selection of medicinal plants to be studied*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 13:3.
3. Ahmed A., Mahmoud H., Williams H., Scott A., Reibenspies J. y Mabry T. 1993. *New sesquiterpene α -methylene lactones Egyptian plant Jansonia candidans*. Journal of Natural Products, 56: 1276-12.
4. Arias A., Valverde M. y Reyes J. 2001. *Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla*. Instituto Nacional de Ecología. SEMARNAT. UNAM. 70 pp.
5. Ávila A. J. G. 1996. *Actividad anti-Vibrio cholerae de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional Purepecha*. Tesis de Maestría. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Estado de México. 104 pp.
6. Ávalos G. A. y Pérez U. C. E. 2009. *Metabolismo secundario de las plantas*. Recursos Educativos, 2:119-145.
7. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D. e Idaomar M. 2008. *Biological effects of essential oils. A review*. Food and Chemical Toxicology, 46: 446-475.

8. Baquero F., Blázquez J. y Martínez J. L. 2002. *Mutación y Resistencia a los antibióticos*. Investigación y Ciencia, 315:72-78.
9. Baraguey C., Blond A., Correia I., Pousset J., Bodo B. y Auvin-Guette C. 2000. *Mahafacyclin A, a cyclic hepatopeptide from Jatropha mahafalensis exhibitin β -bulge conformation*. Tetrahedron Letters, 41: 325-329.
10. Barre J., Bowden B., Coll J., Jesus J., Fuente V., Janairo G. y Ragasa C. 1997. *A bioactive triterpene from Lantana camara*. Phytochemistry, 45: 321324.
11. Bittner M., Alarcón J., Aqueveque P., Becerra J., Hernández V., Hoeneisen M. y Silva M. 2001. *Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae en Chile*. Boletín de la Sociedad Chilena de Química, 46:1-17.
12. Burrows W. 1974. *Tratado de microbiología*. 20a ed. Interamericana. México, D.F. 901 pp.
13. Burt S. 2004. *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods, a review*. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
14. Can-Aké R., Erosa-Rejón G., May-Pat F., Peña-Rodríguez L. y Peraza-Sánchez S. 2004. *Bioactive Terpenoids from roots and leaves of Jatropha gaumeri*. Revista de la Sociedad Química Mexicana, 48: 11-14.

15. Canales M. 2005. Base fotoquímica del uso tradicional de plantas para el tratamiento de enfermedades de posible origen bacteriano en San Rafael Coxcatlan, Puebla. Tesis de Doctorado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México. 145p.
16. Canales M., Hernández T., Caballero J., Romo de Vivar A. A., Durán A. y Lira R. 2005. *Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México*. Journal of Ethnopharmacology, 97:429-439.
17. Canales M. 2006. *Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México*. Acta Botánica Mexicana, 75: 21-43.
18. Canales M., Hernández T., Rodríguez-Monroy M. A., Flores C. M., Jiménez-Estrada M., Hernández L. B., Durán A., Hernández-Moreno M., Trejo N. A., Hernández A. B., Ramírez J. J., Orozco J., Eleno M. G. y Martínez K. E. 2011. *Evaluation of the antimicrobial activity of Acalypha monostachya Cav. (Euphorbiales: Euphorbiaceae)*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5(5):640-647pp.
19. Céspedes T. y Sánchez D. 2000. *Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación*. Revista Cubana de Cardiología, 14:55-60.
20. 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*. 16a ed. Churchill Livingstone Elsevier. 265-267 pp.
21. Cimanga K., Kambu K., Tona L., Apers S., De Bruney T., Hermans N., Totté J., Pieters L. y Vlietinck A. J. 2002. *Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo*. *Journal of Ethnopharmacology*, 79: 213-220.
22. Cordell G. A. 2000. *Biodiversity and drug discovery—a symbiotic relationship*. *Phytochemistry*, 55:463-468.
23. Cox P. A. y Balick M. J. 1994. *The ethnobotanical approach to drug discovery*. *Scientific American*, 270:60-65.
24. Cowan M. M. 1999. *Plants products as antimicrobial agents*. *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology, 12 (4): 564-582.
25. Davis B. D., Dulbeco R., Eisen H. N. y Ginsberg H. S. 1996. *Tratado de Microbiología*. 4^a ed. Editorial Masson, S. A. Barcelona. 1559 pp.
26. Dehgan B. 1976. *Experimental and evolutionary studies of relationships in the genus Jatropha L. (Euphorbiaceae)*. PhD. Dissertation, Department of Botany, University of California, UC Davis. 436pp.
27. Dey P. M. y Harbone J. B. 1989. *Methods in plant biochemistry. Volume 1. Plant phenolics*. Academic Press Limited, Londres. 1:552 pp.

-
28. Dominguez A. X. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa. México. 3-17 pp.
29. Escobar C. y Zuluaga A. 2004. *Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología*. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 32: 231-240.
30. Fabricant D. S. y Farnsworth N. R. 2001. *The value of plants used in traditional medicine for drug discovery*. *Environmental Health Perspectives*, 109: 69-75.
31. Foster T. J. 2000. *Staphylococcus*. En Samuel Baron. *Medical microbiology. Section I bacteriology. Capítulo 12*. 4a ed. Graduate school of biomedical sciences. University of Texas Medical Branch. USA.
32. García E. 1981. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*. Instituto de Geografía. UNAM. México, D.F. 252 pp.
33. 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.
34. Gros G. E., Pomilio A. y Burton G. 1985. *Introducción al estudio de los productos naturales*. Secretaria General de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington. 147pp.
35. Gübitz G. M., Mittelbach M. y Trabi M. 1999. *Exploitation of the tropical plant *Jatropha curcas* L.* *Bioresource Technology*, 67:73-78.

36. Gurgel L., Sidrim J., Martins D., Cechinel V. y Rao V. 2005. *In vitro antifungal activity of dragon's blood from Croton urucurana against T. dermatophytes*. Journal of Ethnopharmacology, 97:409-412.
37. Halliwell B. y Gutteridge J. M. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3a ed. Oxford University Press, Oxford. 936 pp.
38. Hamza O., Carolien J., Mecky I., Maien J., Frans H. y Haji O. 2006. *Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections*. Journal of Ethnopharmacology, 108(1):124-132.
39. Harborne J. B. 1989. *Introduction to ecological biochemistry*. 3a ed. Academic Press. Great Britain at the University Press. Cambridge. 356 pp.
40. Helander I. M., Alakomi H. L., Latava-Kala K., Mattila-Sandholm T., Poi I., Smid E. J., Gorris L. G. M. y Von Wright A. 1998. *Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 46: 3590-3505.
41. Hernández A. 2010. *Actividad Antifúngica de Jatropha neopauciflora Pax*. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Estado de México. 95 p.
42. Jawetz E., Melnick J. y Adelberg E. 1995. *Microbiología médica*. Ed. El Manual Moderno, S. A. de C. V. México, D.F. 807 pp.
43. Jiménez R. J. 1985. *Dos especies nuevas del género Jatropha en México*. Cactáceas y Suculentas Mexicanas, 30(4):80-84.

-
44. Jiménez R. J. 1990. *Una nueva sección y una especie nueva de Manihot (Euphorbiaceae) de México*. Anales del Instituto de Biología. UNAM. Serie Botánica, 60(1):49-53.
45. Karmegan N., Sakthivadivel M., Anuradha V. y Daniel T. 1997. *Indigenous-plant extracts as larvicidal agents against Culex quinquefasciatus Say*. Bioresource Technology, 59: 37-140.
46. Knobloch K., Pauli A., Iberl B., Weigand H. y Weis N. 1989. *Antibacterial and antifungal properties of essential oil components*. Journal of Essential Oil Research, 1: 119-128.
47. Koneman W. E. 1996. *Diagnóstico microbiológico*. Ed. Médica Panamericana. México. 439 pp.
48. Kong Ling-Yi M. Z-D., Shi J-X. y Feng R. 1996. *Chemical constituents from roots of Jatropha curcas*. Acta Botanica Sinica, 38: 161-6.
49. Konigsberg F. M. 2008. *Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas*. El Manual Moderno. México. 636 pp.
50. Lambers H., Chapin F. S. y Pons T. L. 1998. *Plant physiological ecology*. Springer. USA. 427 pp.
51. Levinson W. 2004. *Microbiología e Inmunología Médicas*. 8a ed. Mc Graw Hill. España. 662 pp.
52. Loeffler J. y Stevens D. 2003. *Antifungal drug resistance*. Supplement article. 36:31-41.

-
53. Lough W. J. y Wainer I. W. 1995. *Introduction*. En *High Performance Liquid Chromatography. Fundamental Principles and Practice*. Blackie Academic & Profesional. Glasgow. 1-14 pp.
54. Mandingan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V. y Clark D. P. 2009. *Biología de los microorganismos*. 12ª ed. Pearson Addison Wesley. Madrid. 873-906 p.
55. Marquez B., Neuville L., Moreau M. J., Genet J. P., dos Santos A. F., Caño de Andrade A. M. y Goulart Sant'Ana A. E. 2005. *Multidrug resistance reversal agent from *Jatropha elliptica**. *Phytochemistry*, 66:1804-1811.
56. Martínez G. M., Jiménez R. J., Cruz D. R., Juárez A. E., García R., Cervantes A. y Mejía H. R. 2002. *Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México*. *Anales del Instituto de Biología. UNAM. Serie Botánica*, 73(2):155-281.
57. Marwah R. G., Fatope M. O., Mahrooqi R. A., Varma G. B., Abadi H. A. y Al- Burtamani S. K. S. 2007. *Antioxidant capacity of some edible and wound healing plants in Oman*. *Food Chemistry*, 101(2): 465-470.
58. Maureen R. 1997. *Seeking for new drugs*. *Chemical & Engineering News*, 7:14-29.
59. Miller A. y Solomon P. H. 2001. *Writing Reaction Mechanisms in Organic Chemistry*. 2a ed. Harcourt Academic Press. San Diego, California. 250 pp.

60. Mims C., Plyfair J., Roitt I., Wakelin D. y Williams R. 1999. *Microbiología Médica*. Harcourt. Barcelona, España. 430-540 pp.
61. Mitscher L. A., Drake S., Gollapudi S. R. y Okwute S. K. 1987. *A modern look at folklore use of antiinfective agents*. Journal of Natural Products, 50:1025-1040.
62. Mongkolvisut W., Somyote S., Leutbecher H., Mika S., Klaiber I., Möller W., Rösner H., Beifuss U. y Conrad J. 2006. *Integerrimides A and B, cyclic heptapeptides from the latex of Jatropha integerrima*. Journal of Natural Products, 69:1435-1441.
63. Mothana R. y Urike L. 2005. *Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra*. Journal of Ethnopharmacology, 96:177-181.
64. Murillo F. 2006. *Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas*. Revista Tecnología. Alfa Editores Técnicos. 27 pp.
65. Muroi M., Shiragami N., Nagao K., Yamasaki M. y Takatsuki A. 1993. *Folimycin (concanamycin A), a specific inhibitor of VATPase, blocks intracellular translocation of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus before arrival to the Golgi apparatus*. Cell Structure and Function, 18:139-149.
66. Nikaido H. y Nakae T. 1979. *The outer membrane of gram-negative bacteria*. Advances in Microbial Physiology, 20:163-250.
67. Olsen D. E. 2003. *Métodos ópticos de análisis*. Reverté. México, DF. 535 p.

68. Organización de las Naciones Unidas para la Educación la Ciencia y la Cultura. 2012. "Se añaden 20 nuevas reservas de biosfera a la red del Programa sobre el Hombre y la Biosfera (MAB) de la UNESCO": <http://www.unesco.org/new/es/media-services/multimedia/photos/mab-2012/mexico/>
69. Organización Mundial de la Salud. 2010. <http://www.who.int/es/>, consultada en Febrero de 2011.
70. Osoniyi F. y Onajobi J. 2003. *Coagulant and anticoagulant activities in Jatropha curcas latex*. Journal of Ethnopharmacology, 89: 101-105.
71. 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.
72. Pérez T. G. 2003b. *Los flavonoides: antioxidantes o proantioxidantes*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 22:48-57.
73. Prada G. 2008. *Impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo de la medicina contemporánea*. Revista Médica. U.A. Bogotá, Colombia, 16 (1):9-11.
74. Pretsch E., Clero T., Seibl J. y Simon W. 1980. *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*. Ed. Alhambra. Madrid.

75. Ramos E., Castañeda B. e Ibáñez L. 2008. *Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas*. Revista de la Académica Peruana de Salud, 15(1):42-46.
76. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. y Rice-Evans C. 1999. *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. Free Radical Biology & Medicine, 26:1231-1237 pp.
77. Reyes J. C., Brachet C., Pérez J. y Gutiérrez A. 2004. *Cactáceas y otras plantas nativas de La Cañada de Cuicatlán, Oaxaca*. CFE., SMC., IBUNAM., CNANP., CUICATLAN A.C. México. 196p.
78. Rodríguez-Acosta M., Vega-Flores K., Gante-Cabrera V. y Jiménez-Ramírez J. 2009. *Distribución del género Jatropha L. (Euphorbiaceae) en el estado de Puebla, México*. Polibotánica, 28:37-48 pp.
79. Rodríguez-Gamboa T., Fernandes J., Rodríguez E., Vieira P., Barrios M., Castro-Castillo O., Victor S., Pagnocca F., Bueno O. y Hebling M. 2001. *Triterpene benzoates from the bark of Picramnia teapensis (Simaroubaceae)*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 12:386-390.
80. Rosas L. R. 2003. *Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán*. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Estado de México. 94 pp.

-
81. Ruvinsky O. R. 2001. *Epidemiology and resistance of Streptococcus pneumoniae invasive disease in Latin America*. Revista Chilena de Infectología, 18: 10-14.
82. Saavedra S. 2000. *Ácidos grasos. Importancia*. Ed. Facultad de Agronomía. España. 11 pp.
83. Salcedo-Sánchez B. 1997. *Insectos precortesianos de la cuenca de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla*. Tesis de licenciatura (Biología) UNAM. Facultad de Ciencias. 6-10 pp.
84. Sikkema J., De Bont J. A. M. y Poolman B. 1994. *Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes*. Journal of Biological Chemistry, 269: 8022-8028.
85. Singh M., Govindarajan R., Nath V., Rawat A. K. y Mehrotra S. 2006. *Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of Plagiochasma appendiculatum Lehm. et Lind.* Journal of Ethnopharmacology, 107:67-72.
86. Tenorio L. F. A., Del Valle M. L. y Pastelín H. G. 2006. *Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿Pueden ser una alternativa terapéutica?* Archivo de Cardiología de México, 76:35-45.
87. Toledo-Castro S. M., González-Lavaut J. A., Echmendia O. y García-González N. 2008. *Evaluación fitoquímica y farmacológica de frutos de Erythroxylum minutifolium Griseb. (Erythroxylaceae)*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 13(2): .

-
88. Trease G. E. y Evans W. C. 1991. *Farmacognosia*. 13 ed. Interamericana. México. 901 pp.
89. Ultee A., Bennik M. H., Moezelaar R. 2002. *The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1561-1568.
90. Valenzuela A. 2006. *Los fitoesteroles: Aliados naturales para la protección de La salud cardiovascular*. Ed. Universidad de Chile. Chile. 9 pp.
91. Valiente B. L. 1991. *Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México*. Tesis. UNAM. México. 65 pp.
92. Valiente-Banuet A., Alcántara A., Dávila P., Flores-Hernández N., Arizmendi M. C., Ortega-Ramírez J., y Soriano J. A. 2000. *La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 67: 25-75.
93. Vanden Berghe, D. A. y Vlietinck, A. J. 1991. *Screening methods for antibacterial agents from higher plants*. En: *Methods in plant biochemistry. Vol. 6 "Assays for Bioactivity"*. Hostettmann K. (ed). Dey P. M. (Ed. De serie) Acade CMI Press. New York. 47-71 pp.
94. Vuorela P., Leinonen M., Saikku P., Tammelam P., Rauha J. P. y Wennberg T. 2004. *Natural Products in the Process of Finding New Drug Candidates*. *Current Medicinal Chemistry*, 11:1375-89.

95. Wang H. y Bun T. N. 2002. *Isolation of an antifungal thaumatin -like protein from kiwi fruits*. *Phytochemistry*, 61(1):1-6.
96. Yen G. C. y Duh P. D. 1994. *Scavenging Effect of Methanolic Extracts of Peanut Hulls on Free-Radical and Active-Oxygen Species*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42:629-632.
97. Zampini C. I., Cudmani N. e Islas M. I. 2007. *Actividad Antimicrobiana de las Plantas Medicinales Argentinas sobre Bacterias Antibiótico-resistentes*. *Acta Bioquímica Clínica de Latinoamérica*, 41: 385-393.
98. Zhang X. P., Zhang M. L., Su X. H., Huo C. H., Gu Y. C. y Shi Q. W. 2009. *Chemical Constituents of the Plants from Genus Jatropha*. *Chemistry & Biodiversity*, 6: 2166-2183.