



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Actividad antimicrobiana de *Caesalpinia melanadenia* (Rose)  
Standl.”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**BIÓLOGA**

PRESENTA

LUZ ADRIANA PICHARDO RAMÍREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO

Unidad de Biotecnología y Prototipos

ENERO 2013





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.

<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>Pág.</b>
1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	2
2.1 Antecedentes.....	5
2.2 Justificación.....	8
2.3 Objetivo general.....	9
2.4 Objetivos particulares.....	9
3. Materiales y métodos.....	10
3.1 Área de colecta.....	10
3.2 Microorganismos utilizados.....	10
3.3 Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana.....	11
3.4 Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana.....	12
3.5 Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.....	12
3.6 Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.....	12
3.7 Curva de sobrevivencia bacteriana.....	12
3.8 Caracterización fitoquímica de los extractos.....	13
4. Resultados.....	14
5. Discusión general.....	31
6. Conclusiones.....	35
7. Perspectivas.....	36
8. Apéndices.....	37
8.1 Apéndice 1 Genero <i>Caesalpinia</i> .....	37
8.2 Apéndice 2 Área de colecta.....	40
8.3 Apéndice 3 Método de maceración.....	41

<b>8.4</b> Apéndice 4 Método de difusión en agar de Kirby-Baüer .....	<b>41</b>
<b>8.5</b> Apéndice 5 Método de dilución en agar.....	<b>44</b>
<b>8.6</b> Apéndice 7 Método cuantitativo de inhibición de crecimiento radial.....	<b>45</b>
<b>8.7</b> Apéndice 8 Curva de sobrevivencia bacteriana.....	<b>45</b>
<b>8.8</b> Apéndice 9 Determinación cualitativa de metabolitos secundarios.....	<b>45</b>
<b>9.</b> Referencias.....	<b>51</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

		pág.
<b>Cuadro 1.</b>	Aportaciones sobre el género <i>Caesalpinia</i> .....	<b>5</b>
<b>Cuadro 2.</b>	Pruebas cualitativas para la identificación de algunos metabolitos secundarios de los extractos de <i>C. melanadenia</i> .....	<b>13</b>
<b>Cuadro 3.</b>	Datos etnobotánicos de <i>C. melanadenia</i> .....	<b>14</b>
<b>Cuadro 4.</b>	Rendimiento de los extractos de <i>C. melanadenia</i> .....	<b>15</b>
<b>Cuadro 5.</b>	Actividad antibacteriana de <i>C. melanadenia</i> .....	<b>16</b>
<b>Cuadro 6.</b>	Actividad antimicrobiana de <i>C. melanadenia</i> según el tipo bacteriano...	<b>19</b>
<b>Cuadro 7.</b>	MIC y CBM del extracto hexánico de <i>C. melanadenia</i> .....	<b>21</b>
<b>Cuadro 8.</b>	Actividad cualitativa antifúngica de <i>C. melanadenia</i> .....	<b>24</b>
<b>Cuadro 9.</b>	Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.....	<b>27</b>
<b>Cuadro 10.</b>	Identificación cualitativa de los metabolitos secundarios del extracto hexánico de <i>C. melanadenia</i> .....	<b>29</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Halos de inhibición extracto hexánico de <i>C. melanadenia</i> .....	17
<b>Figura 2.</b> Halos de inhibición extracto metanólico de <i>C. melanadenia</i> .....	18
<b>Figura 3</b> Actividad antibacteriana de <i>C. melanadenia</i> .....	20
<b>Figura 4.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Bactericida Mínima (CBM).....	22
<b>Figura 5.</b> Efecto del extracto de <i>C. melanadenia</i> sobre la curva de crecimiento de <i>S. epidermidis</i> .....	23
<b>Figura 6.</b> Efecto de <i>C. melanadenia</i> sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> aislada de un caso clínico.....	23
<b>Figura 7.</b> Actividad antifúngica de <i>C. melanadenia</i> .....	25
<b>Figura 8.</b> Actividad antifúngica de <i>C. melanadenia</i> .....	26
<b>Figura 9.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Bactericida Mínima (CBM)....	28
<b>Figura 10.</b> Efecto de <i>C. melanadenia</i> sobre la curva de crecimiento de <i>C. neoformans</i> .....	29
<b>Figura 11.</b> <i>Caesalpinia melanadenia</i> (Rose) Standl.....	38
<b>Figura 12.</b> Fruto <i>C. melanadenia</i> .....	39
<b>Figura 13.</b> Distribución del género <i>Caesalpinia</i> .....	39
<b>Figura 14.</b> Distribución de <i>C. melanadenia</i> .....	40
<b>Figura 15.</b> San Rafael Coxcatlán Puebla.....	41

## **AGRADECIMIENTOS**

**Este proyecto fue financiado por el proyecto PAPCA 2011-2012  
ROYAL BOTANIC GARDENS KEW (MGU-Useful Plants Project Mexico) UNAM  
(2011-2012).**

## *AGRADECIMIENTOS*

*En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis la Dra. C. Tzasna Hernández Delgado, por haberme dado esta enorme oportunidad, por todos sus valiosos conocimientos, pero sobre todo por brindarme su confianza y cariño. Llevare por siempre todo aquello que gracias a su enorme ayuda cambio en mi vida, gracias por hacer de este sueño una realidad.*

*A cada uno de mis sinodales por sus valiosas observaciones y al tiempo que dedicaron en la revisión de este trabajo.*

*Dr. José Guillermo Avila Acevedo*

*Dr. Rafael Lira Sadeé*

*Dra. Ana María García Bores*

*M. en C. José Samuel Meraz Martínez*

*Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado*

*A Héctor Cervantes Maya por su aportación en la realización de este trabajo.*

*A mis compañeras de laboratorio*

*Gracias por compartir conmigo sus conocimientos, por hacer de este trabajo algo que llevare siempre como la mejor etapa de la carrera al encontrar unas grandes amigas.*



## DEDICATORIAS

### *A mis papás*

*A mi mamá, solo puedo decirte gracias, por tu confianza paciencia y amor, pero sobre todo por creer en mí, por estar cada día a mi lado, te amo mamá. A mi papá que desde un lugar en el infinito me ha acompañado siempre, sigo recordándote con muchísimo amor y sé que hoy estas aquí a mi lado, gracias papás.*

### *A mis hermanos*

*A mi hermano Carlos por ser mi amigo, por escucharme y cuidarme sin ti esto no sería posible, a Rodolfo y Susana por compartir tantos momentos felices pero sobre todo por estar conmigo en los momentos más duros, a los tres los amo.*

### *A mi familia*

*A toda la familia Ramírez por ser un gran apoyo en mi vida, a mi abuelita por todo su cariño y cuidado por ser un ejemplo de fortaleza y amor, a mis tíos; Juan, José, Javier y María, siempre están en mis pensamientos los quiero mucho.*

### *A mis amigos*

*Por dejarme compartir con ustedes mis sueños, gracias por ser unos grandes amigos y estar en cada momento en mi vida Delia Montoya, Areli Orea, Mario Cornejo y Juan García en verdad los quiero.*

## RESUMEN

La especie *Caesalpinia melanadenia*, conocida comúnmente como Ixcanelillo pertenece a la familia Fabaceae, es utilizada por los habitantes del pueblo de San Rafael Coxcatlán para el tratamiento de diferentes enfermedades de origen infeccioso. De *C. melanadenia* no se han realizado estudios que verifiquen su actividad antimicrobiana, por lo que el objetivo general del trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de *C. melanadenia* a partir de dos extractos (metanólico y hexánico) de las partes aéreas de la planta utilizando la técnica de maceración. Mediante la técnica de difusión en agar Kirby-Baüer se evaluó la actividad antimicrobiana en 35 cepas (10 bacterias Gram-positivas, 16 Gram-negativas y 9 levaduras) realizando cada ensayo por triplicado. La evaluación cuantitativa se llevó a cabo mediante la técnica de dilución en agar para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM). Los resultados obtenidos de la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los extractos de *C. melanadenia*, mostraron que la mayoría de las cepas fueron sensibles al extracto hexánico, de las 28 cepas desafiadas 21 de ellas presentaron halos de inhibición, las que presentaron los mayores halos fueron las levaduras *Candida glabrata*, *Candida albicans* aislada de urocultivo y *Candida albicans* ATCC 14065, en cuanto a las cepas bacterianas los halos fueron menores y en algunos casos como *Escherichia coli* y *Yersinia enterocolitica* no se presentó actividad. El extracto metanólico, sólo presentó actividad en 14 de las 35 cepas siendo *Bacillus subtilis* la cepa que mostró los mayores halos. En la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Mínima Bactericida, se determinó que las cepas que tuvieron mayor sensibilidad al extracto de *C. melanadenia* fueron *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus faecalis* que a una concentración de 0.06 mg/mL se inhibe drásticamente su crecimiento (MIC) y a una concentración de 0.125 mg/mL su crecimiento es inhibido totalmente (CBM). La bacteria que presentó mayor resistencia al extracto de *C. melanadenia* fue *Candida tropicalis* ya que se requieren concentraciones de 2 mg/mL para inhibir su crecimiento. Con estos resultados se valida el uso de *C. melanadenia* en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades de origen infeccioso. Palabras clave: Actividad antimicrobiana *Caesalpinia melanadenia*, Medicina tradicional.

## INTRODUCCIÓN

La búsqueda de la capacidad curativa de las plantas es muy antigua y su uso medicinal se ha ejercido por milenios; sin embargo en las últimas décadas del pasado siglo, descendió mucho su utilización terapéutica, a expensas de los productos sintéticos. La tradición empírica de utilizar las plantas con fines medicinales se ha vuelto a incrementar en los últimos años en particular en países del tercer mundo, aun cuando esta práctica se extiende por todos los continentes (Sanabria, 2003).

Actualmente en México se conocen numerosas plantas que han sido y son empleadas como medicamentos, principalmente en el medio rural. Estos recursos se han mantenido por la tradición cultural de diversas comunidades, de la comunicación oral en la práctica de la comunidad. Las plantas medicinales son de amplia distribución gracias a la diversidad de las condiciones ambientales en el territorio que propicia diferentes tipos de vegetación y riqueza florística; asimismo, por la pluralidad cultural existente en el país (Cervantes y Valdés, 1990).

Las plantas medicinales forman parte importante de los recursos terapéuticos que se emplean en la medicina tradicional popular mexicana y que han representado una alternativa para la salud de los diferentes grupos étnicos del país (Aguilar y Camacho, 1985; Toledo, 1995).

La organización mundial de la salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Bermúdez et al., 2005).

Por la gran variedad botánica y cultural, que existe en nuestro país, el estudio sobre el conocimiento de las plantas medicinales y la realización de trabajos regionales son de gran importancia ya que permite, tanto la integración de estos conocimientos, así como el desarrollo de investigaciones a niveles más complejos que contemplen la introducción, domesticación y manejo de materiales botánicos de interés en el campo médico y farmacéutico (Cervantes y Valdés, 1990).

El uso de extractos de plantas para el manejo de enfermedades de cultivos se remonta al origen de la agricultura. Esta técnica a través de ensayo error, se fue perfeccionando hasta que se fueron olvidando y cambiando por productos de síntesis química, que fueron saturando los mercados al ofrecer aparentemente más efectividad, pero también dieron origen a la generación de patógenos más resistentes, a la contaminación del ambiente y al desequilibrio agroecológico (Viveros y Castaño, 2006).

Las plantas son una fuente de nuevas moléculas biológicamente activas, a través de un sistema complejo de diferentes rutas biosintéticas, cuya principal fuente de activación es la fotosíntesis y que por diversos procesos bioquímicos se obtienen los llamados metabolitos primarios, y a partir de rutas metabólicas alternas se generan los llamados metabolitos secundarios (alcaloides, esteroides, flavonoides, terpenoides, quinonas, etc.) (Viveros y Castaño, 2006). La importancia de estas son las aplicaciones en la medicina moderna, son fuentes directas de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Cruz et al., 2008).

Los diversos efectos biológicos producidos por los metabolitos secundarios han incitado la reevaluación de los posibles papeles que estos compuestos desempeñan en las

plantas. Recientemente se ha demostrado que tienen un significado adaptativo importante en la protección contra herbívoros e infecciones microbianas, como atractivos de polinizadores y animales dispersores de semillas, así como agentes alelopáticos (competencia vegetal). Las diversas funciones ecológicas de los metabolitos secundarios muestran el papel que estas sustancias desempeñan en la supervivencia de las plantas (Mendoza y Moreno, 2007). En los seres humanos se ha observado que cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades biológicas (antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerígenos y biocidas) (Kalemba y Kunicka, 2003).

En México existen una gran variedad de plantas que son utilizadas en la medicina tradicional y un ejemplo de estas es *Caesalpinia melandenia* perteneciente a la familia Fabaceae (Apéndice 1) y es utilizada por los habitantes del pueblo de San Rafael Coxcatlán para el tratamiento de diversas afecciones (antisépticas, antiinflamatorias, actividad antifúngica, antioxidantes, analgésicas y actividad contra el cáncer, etc).

Varios estudios confirman que diferentes extractos de hojas, frutos, raíces y corteza de especies vegetales pertenecientes al género *Caesalpinia* tienen una variedad de propiedades medicinales como la antiinflamatoria, antitumoral, antipirética, analgésica, inmunomoduladora, filaricida, antibacteriana, antimicótica, antiparasitaria y antiviral (Muñoz, 2011)

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido de productos naturales a través de solventes apropiados, constituidos por una mezcla de principios activos o sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Lizcano y Vergara, 2008).

## ANTECEDENTES

De *C. melanadenia* no se han realizado estudios, pero de otras especies del género *Caesalpinia* se han reportado diversos usos medicinales principalmente como antioxidantes, aunque también posee otras propiedades como se muestra en el siguiente cuadro.

**Cuadro 1. Aportaciones sobre el género *Caesalpinia***

<b>Especie</b>	<b>Autor y año</b>	<b>Estudio realizado</b>
<i>C. férrea</i>	Carvalho et al.,1996	Se evaluaron las propiedades anti inflamatorias y analgésicas del extracto acuoso de los frutos en edema inducido con carragenina en ratas. Los resultados obtenidos mostraron que se inhibió significativamente mediante la administración oral del extracto en concentraciones de 300 mg/Kg.
<i>C. pulcherrima</i>	Srinivas et al., 2003	Se reportó por primera vez dos flavonoides 5,7-dimetoxi-3', 4'- metileno dioxiflavona y isobonducellin, por medio de la interpretación de espectros RMN 1D Y 2D, que tuvieron actividad antimicrobiana.
<i>C. mimosoides</i>	Chanwitheesuk et al., 2005	Diferentes extractos fueron evaluados contra bacterias patógenas humanas y cepas de hongos. Entre estos, el extracto acuoso y los extractos etanólicos mostraron una potente actividad contra algunos microorganismos ensayados.
<i>C. sappan</i>	Pawar et al., 2008	Se describe que es una planta muy utilizada en la medicina tradicional de la india ya que se ha reportado actividad antibacteriana, antioxidante, antiinflamatoria, así como actividades contra el cáncer e inmunosupresores.

---

<i>C. pulcherrima</i>	Chakraborty et al., 2009	Se midió la actividad analgésica del extracto clorofórmico en ratones, en dosis de 50, 75 y 100 mg/Kg (P<0.05) mostrando efecto analgésico caracterizado por la reducción en el número de contracciones.
<i>C. boduc</i>	Ata et al., 2009	A partir de extractos etanólicos de obtuvieron dos compuestos que fueron evaluados por su actividad anti fúngica.
<i>C. crista</i> y <i>C. pulcherrima</i>	Das et al., 2010	Midieron en dos líneas diferentes de células cancerígenas la citotoxicidad de diferentes compuestos encontrados en dos especies de <i>Caesalpinia</i> a partir de una investigación química. Reportando para <i>C. crista</i> dos nuevos diterpenoides, 6-beta-cinamoiloxi-7-acetoxi vouacapen-5-ol y 6-beta- benzolio oxivouacapen-5-alfa-ol y para <i>C. pulcherrima</i> 12 F-desmetil neocalsalpina.
<i>C. sappan</i>	Gan et al., 2010	Se evaluó 40 plantas medicinales como nuevas fuentes antioxidantes naturales y encontraron que fue una de las especies que presentaron mayor capacidad antioxidante, equivalente a la de Trolox, así como mayor contenido de fenoles.
<i>C. digyna</i>	Srinivasan et al., 2010	Compararon las propiedades antioxidantes de los extractos de la raíz de se sometieron a pruebas estándar in vitro y en modelos in vivo. Se determinaron los compuestos fenólicos totales. El efecto del barrido del radical libre fue comparable con la de referencia antioxidante. Los resultados indicaron claramente la propiedad antioxidante de la raíz. La planta tiene un potencial terapéutico muy bueno.

---

---

<i>C. mimosoides</i>	Yodsaoue et al., 2011	Se obtuvieron de la raíz siete compuestos y probaron actividad inhibitoria contra un polisacárido (LSP) de ácido nítrico inducida (NO) en líneas celulares, También se probaron para el efecto inhibitorio sobre la liberación inducida LSP-factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) en RAW264.7. Los resultados indicaron que cuatro de los componentes poseen actividad inhibitoria potente para ambas pruebas.
<i>C. crista</i>	Santnami y Yadava 2011	Se evaluó la actividad antibacteriana de cuatro compuestos encontrados en las flores en diferentes cepas <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Klesiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Micrococcus luteus</i> , asi como actividad antifúngica contra <i>Fusarium oxisporum</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Penicillum digitatum</i> . Encontrando actividad para ambos.

---



## **JUSTIFICACIÓN**

La plantas medicinales en la actualidad en nuestro país tienen una gran importancia debido a que no se cuenta con la suficiente capacidad de cubrir las necesidades de atención de salud, por lo que es necesario realizar estudios que validen científicamente el uso de las plantas como un recurso medicinal. Desgraciadamente no existen muchos trabajos que comprueben la efectividad de muchas de estas plantas, como es el caso de *C. melandenia* que no cuenta con ningún estudio anterior y se sabe que es utilizada en la medicina tradicional mexicana. Debido a lo anterior es de suma importancia validar científicamente su uso y contribuir al conocimiento de la flora medicinal de San Rafael Coxcatlán.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la actividad antimicrobiana de *Caesalpinia melanadenia* (Rose)

Standl.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Cuantificar el rendimiento de los sólidos obtenidos a partir extractos herbales de las partes aéreas de *C. melanadenia*.
- Determinar la actividad antibacteriana y antifúngica de los diferentes extractos de *C. melanadenia*.
- Obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos activos de *C. melanadenia*.
- Determinar la concentración fungicida media (CF<sub>50</sub>) y concentración fungicida mínima (CFM) de los extractos que presentan actividad.
- Evaluar el efecto del extracto activo sobre las curvas de crecimiento de dos cepas bacterianas (positiva y negativa) y un hongo levaduriforme.
- Caracterizar fitoquímicamente el extracto activo.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Área de colecta**

La planta fue colectada en el municipio de San Rafael Coxcatlán, Puebla La determinación de la especie fue realizada por la M en C. Edith López Villafranco del Herbario IZTA de la FES Iztacala y un ejemplar se depositó con el número de colecta HCM15, Noviembre, 2011 (Apéndice 2).

### **Obtención de los extractos**

Los extractos fueron obtenidos de las partes aéreas de *C. melandenia* mediante el Método de maceración (Domínguez, 1973) utilizando solventes de diferente polaridad (hexano y metanol). Los extractos se filtraron y el exceso de solvente se destiló a presión reducida. Se determinó el rendimiento total de los sólidos obtenidos por diferencia de peso (Apéndice 3).

### **Microorganismos a utilizados**

**Bacterias Gram-positivas:** *Staphylococcus aureus* ATCC 12398, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis* donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán (UNAM). *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* aisladas de un caso clínico, *Micrococcus luteus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* aislada de un caso clínico donadas por el Hospital Ángeles (Metropolitano).

### **Bacterias Gram-negativas:**

*Vibrio cholerae* NO-01, *Vibrio cholerae* INDRE 206 aislado de agua contaminada, *Vibrio cholerae* aislado de un caso clínico (estas cepas corresponden al grupo 01, productor de enterotoxinas, serotipo Inaba, biotipo El Tor), *Vibrio cholerae* CDC V12, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, aisladas de un caso clínico

*Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, fueron donadas por el laboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán (UNAM), *Yersinia enterocolitica*, donada por el laboratorio de análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala (UNAM), y *Salmonella typhi* ATCC 19430. *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 53218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens* aisladas de casos clínicos, donadas por El Hospital Angeles (Metropolitano).

#### **Levaduras:**

*Candida albicans* aislada de urocultivo, *Candida albicans* y *Candida tropicalis* aisladas de un caso clínico, donada por el laboratorio de Análisis Clínicos FES Iztacala (UNAM). *Criptococcus neoformans*, *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 14065, donadas por la FES Cuautitlán (UNAM), *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* aisladas de casos clínicos, donadas por el Hospital Angeles (Metropolitano).

#### **Hongos filamentosos:**

*Fusarium sporotrichum* NRLL 3299, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Fusarium moniliforme*, donadas por el Laboratorio de Fisiología vegetal de la UBIPRO, FES-Iztacala y *Rhizoctonia solani* donada por el INIFAP, Celaya, México.

#### **Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana**

Para la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana se utilizó la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer (Koneman, 1991), realizando cada ensayo por triplicado. Los sensidiscos se impregnaron con 2 mg del extracto a probar, como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con 25 µg de cloramfenicol y como control negativo se emplearon sensidiscos impregnados con 10 µL de cada uno de los disolventes utilizados. (Apéndice 4)

### **Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana**

La Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima se determinó utilizando la microtécnica de dilución en agar (Koneman, 1991). Cada ensayo se realizó por triplicado. Las concentraciones para cada bioensayo fueron de 0.0312 a 2.0 mg/mL, en progresión aritmética, se utilizó cloramfenicol como control positivo a diferentes concentraciones (0.001-0.15 µg/mL). (Apéndice 5)

### **Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica.**

Para la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los extractos de *C. melandenia* sobre los hongos filamentosos se utilizó el método cualitativo de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Se utilizaron sensidiscos impregnados con 2 mg del extracto a probar, los controles negativos fueron los solventes utilizados en sensidiscos con 10 µL, como control positivo se usaron discos con 10 µg de ketoconazol. (Apéndice 6) Para la evaluación de la actividad antifúngica sobre hongos levaduriformes se empleó el método de difusión en agar de Kirby-Bauer, mediante el uso de agar papa dextrosa (PDA). Como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de nistatina.

### **Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica.**

Para la evaluación cuantitativa (CF<sub>50</sub> y CFM) del efecto del extracto activo sobre los hongos filamentosos se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002). Se empleó agar de papa dextrosa para su cultivo (PDA). Las concentraciones para cada bioensayo fueron de 0.5 a 3.0 mg/mL, todos los ensayos se realizaron por triplicado, como control positivo se usó ketoconazol a diferentes concentraciones (0.01 - 7.00 µg/mL) y para el control negativo se utilizó la mayor cantidad de solvente empleado en la dilución. (Apéndice 7)

La evaluación cuantitativa (CMI y CFM) del efecto de los extractos sobre hongos levaduriformes se determinó utilizando la técnica de dilución en agar (Koneman, 1991).

### **Curva de mortalidad bacteriana.**

Para la evaluación de curva de sobrevivencia bacteriana se utilizó el método propuesto por Kubo y col 1993, se evaluaron dos cepas bacterianas y un hongo levaduriforme, contabilizando un total de 24 hrs divididos en 9 tiempos. Se utilizaron las concentraciones siguientes: CMI, ½ CMI, CBM y un grupo testigo positivo y uno negativo. (Kubo et al., 1993 citado en Ávila, 1996). (Apéndice 8).

### **Caracterización Fitiquímica de el/los extractos activos**

Los extractos se analizaron mediante reacciones para determinar la presencia y/o ausencia de diferentes metabolitos secundarios (alcaloides, fenoles, glicósidos, monoterpenos) (Apéndice 9), utilizando los reactivos señalados en el cuadro 2.

**Cuadro 2. Pruebas cualitativas para la identificación de algunos metabolitos secundarios de los extractos (Domínguez, 1973; Dey y Harbone, 1989).**

Grupo	Reactivo	Coloración
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado café
Fenoles	Cloruro férrico	Azul o verde
Glicósidos	Molish	Anillo morado
Monoterpenos	Vainillina en ácido sulfúrico	Azul, morado, rojo

### **Análisis estadísticos**

A los resultados obtenidos de los bioensayos de la actividad antibacteriana se les realizó un análisis de varianza factorial, en donde los factores fueron: cepas bacterianas y tipo bacteriano, con el paquete de computo Minitab versión 15.

## RESULTADOS Y ANÁLISIS

Como se mencionó *C. melanadenia* es utilizada para el tratamiento de enfermedades de posible origen infeccioso así como combustible o forraje, en cuanto a su forma de vida es una planta arbustiva y es silvestre en el siguiente cuadro se muestran los datos etnobotánicos de la especie.

**Cuadro 3. Datos etnobotánicos de *Caesalpinia melanadenia***

<b>Nombre Científico</b>	<i>Caesalpinia melanadenia</i> (Rose) Standl.
<b>Nombre común</b>	Ixcanelillo, palo blanco
<b>Familia</b>	Leguminosae
<b>Género</b>	<i>Caesalpinia</i>
<b>Nombre científico</b>	<i>Caesalpinia melanadenia</i>
<b>Usos</b>	Como medicinal, forraje y leña
<b>Forma de uso</b>	Te / infusión
<b>Parte utilizada</b>	Vaina, semilla, hojas
<b>Numero de colecta</b>	HCM15
<b>Fecha</b>	Noviembre, 2007

## RENDIMIENTO DEL EXTRACTO

Los resultados obtenidos de la determinación de los rendimientos de los extractos de la parte aérea de *C. melanadenia* se observan en el cuadro 4.

**Cuadro 4. Rendimiento de los extractos de *C. melanadenia***

Extracto	Peso (g)	Porcentaje (%)
Metanólico	11.77	6.46
Hexánico	3.51	1.78

El porcentaje se calculó con respecto a 181.4 g de la parte aérea de la planta.

En cuanto al rendimiento de los extractos, podemos observar que el rendimiento del extracto metanólico fue mayor (6.46 %), esto probablemente es debido a que los componentes de la planta en su mayoría son de naturaleza polar, como por ejemplo taninos, flavonas, lignanos, glucósidos etc.

## EVALUACION CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Los resultados de la evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana de *C. melanadenia* (cuadro 5) muestran que el extracto hexánico provocó los mayores halos de inhibición. Las bacterias que presentaron los halos de mayor tamaño fueron las Gram positivas como es el caso de *S. epidermidis* con un promedio de  $17.0 \pm 1.0$  mm y *B. subtilis* aislada de un caso clínico con un promedio de  $14.0 \pm 1.0$  mm, para este grupo todas las cepas desafiadas presentaron halos de inhibición, a diferencia del grupo de las Gram negativas donde los halos que se formaron fueron de menor tamaño y sólo se presentó actividad en 11 de las 16 cepas que se probaron. Para el caso del extracto metanólico solo se presentaron halos de inhibición en 14 de las 26 cepas desafiadas encontrándose actividad en 7 cepas Gram positivas y 7 Gram negativas donde los halos de mayor tamaño los presentó *B. subtilis* donada por la FES Cuautitlán con un tamaño



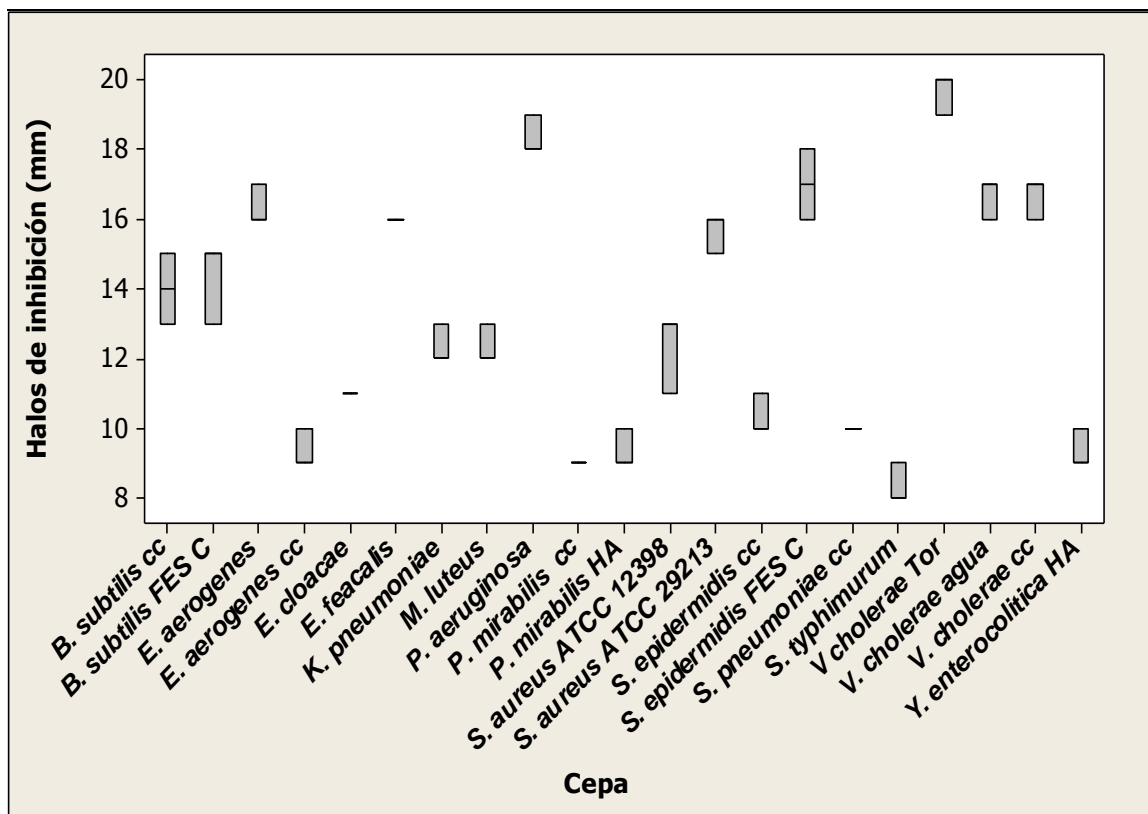
de  $19.3 \pm 0.47$  mm, al igual que en el caso del extracto hexánico las cepas que tuvieron los mayores halos de inhibición fueron las Gram positivas, aunque de acuerdo con el análisis de varianza se determinó que el comportamiento de los extractos no presentan diferencias significativas ANOVA ( $F=89.79$ ,  $P<0.05$ ), por lo que el tamaño de los halos de inhibición depende del tipo de extracto.

**Cuadro 5. Actividad antibacteriana de *Caesalpinia melanadenia***

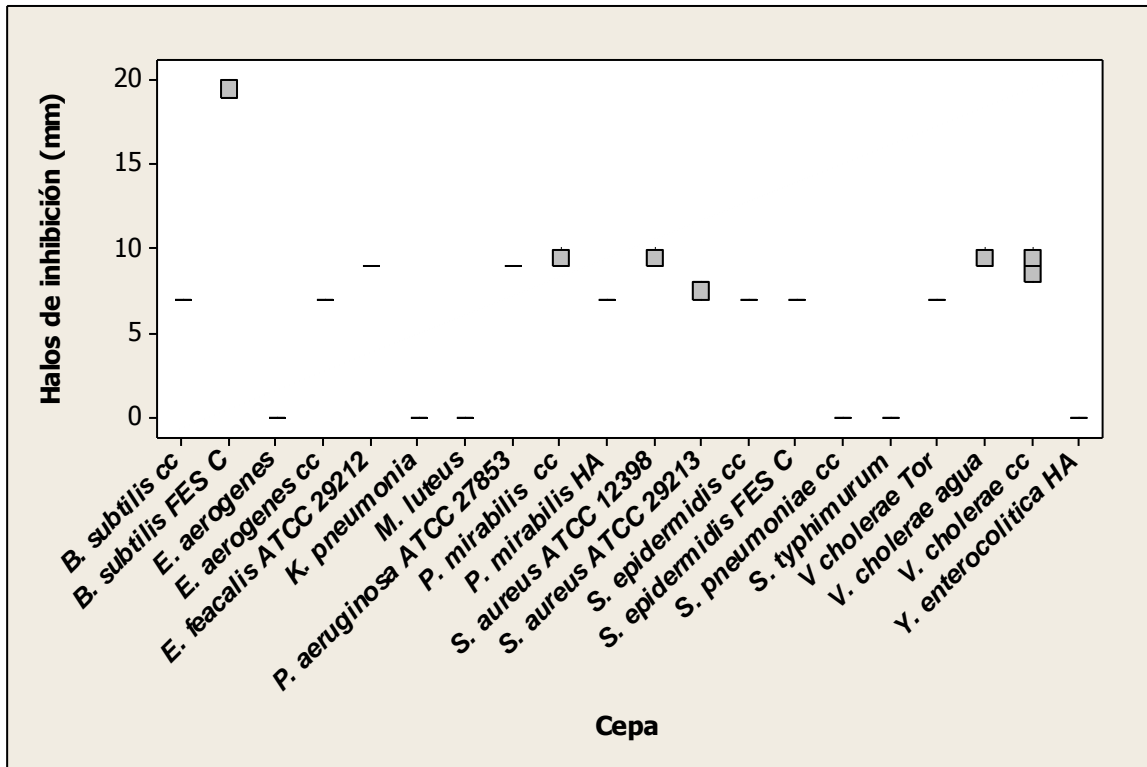
Cepa	Halos de inhibición (mm)		
	Cloranfenicol	Extracto hexánico	Extracto metanólico
<b>Gram positivas</b>			
<i>E. feacalis</i> ATCC 29212	21.67 ± 1.70	16.00 ± 0.00	9.00 ± 0.00
<i>K. pneumonia</i>	29.00 ± 0.47	12.30 ± 0.57	NA
<i>B. subtilis</i> FES C	16.00 ± 0.47	14.30 ± 1.15	19.30 ± 0.47
<i>B. subtilis</i> cc	29.33 ± 2.62	14.00 ± 1.00	7.00 ± 0.00
<i>S. epidermidis</i> cc	6.66 ± 1.15	10.30 ± 0.57	7.00 ± 0.00
<i>S. epidermidis</i> FES C	7.00 ± 1.00	17.00 ± 1.00	7.00 ± 0.00
<i>S. aureus</i> ATCC 12398	28.00 ± 1.63	12.30 ± 1.15	9.30 ± 0.57
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	27.60 ± 0.11	15.60 ± 0.57	7.60 ± 0.47
<i>S. pneumoniae</i> cc	8.33 ± 0.60	10.00 ± 0.00	NA
<i>M. luteus</i>	23.00 ± 0.47	12.33 ± 0.57	NA
<b>Gram negativas</b>			
<i>V cholerae</i> Tor	6.66 ± 0.60	19.60 ± 0.57	7.00 ± 0.00
<i>V. cholerae</i> agua	10.00 ± 1.00	16.60 ± 0.57	9.30 ± 0.57
<i>V. cholerae</i> cc	27.67 ± 0.47	16.60 ± 0.57	9.00 ± 1.00
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	7.33 ± 0.60	18.30 ± 0.57	9.00 ± 0.00
<i>E. aerogenes</i> cc	12.00 ± 0.47	9.30 ± 0.57	7.00 ± 0.00
<i>E. aerogenes</i>	19.33 ± 0.47	16.30 ± 0.57	NA
<i>S. typhimurum</i>	25.67 ± 0.47	8.30 ± 0.57	NA
<i>Y. enterocolitica</i> HA	25.67 ± 0.47	9.30 ± 0.57	NA
<i>P. mirabilis</i> HA	13.33 ± 4.16	9.30 ± 0.57	7.00 ± 0.00
<i>P. mirabilis</i> cc	12.00 ± 0.47	9.00 ± 0.00	9.30 ± 0.57
<i>E. cloacae</i>	23.00 ± 0.47	11.00 ± 0.00	NA

Simbología: NA = no presentó actividad, cc = caso clínico, FES-C = donada por la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, HA = donada por el Hospital Angeles metropolitano.

En la figura 1 y 2 se observa el diagrama de caja el cual representa la distribución de los halos de inhibición entre las cepas bacterianas que presentaron actividad en los extractos (hexánico y metanólico). En el caso de extracto hexánico las cepas que presentaron un comportamiento muy similar fueron *V. cholera* agua y *V. cholera* cc con una mediana de 17.0 mm, así como *B. subtilis* cc y *B. subtilis* FES-C con una mediana de 15.0 mm. La cepa que presentó los halos de menor tamaño fue *S. typhimurum* con una mediana de 8.0 mm. En el extracto metanólico las cepas que presentaron una distribución similar fueron *B. subtilis*, s. *epidermidis* aisladas de casos clínicos s. *epidermidis* donada por la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán con una mediana de 7 mm del grupo de las gran positivas *V. cholerae* agua *V. cholerae* cc *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *P. mirabilis* tuvieron una distribución muy parecida con una mediana de 9 mm del grupo de las gran negativas.



**Figura 1.-** Halos de inhibición extracto hexánico de *C. melanadenia*.  
Simbología: igual a la anterior.



**Figura 2.** Halos de inhibición extracto metanólico de *C. melanadenia*.

Simbología: igual a la anterior

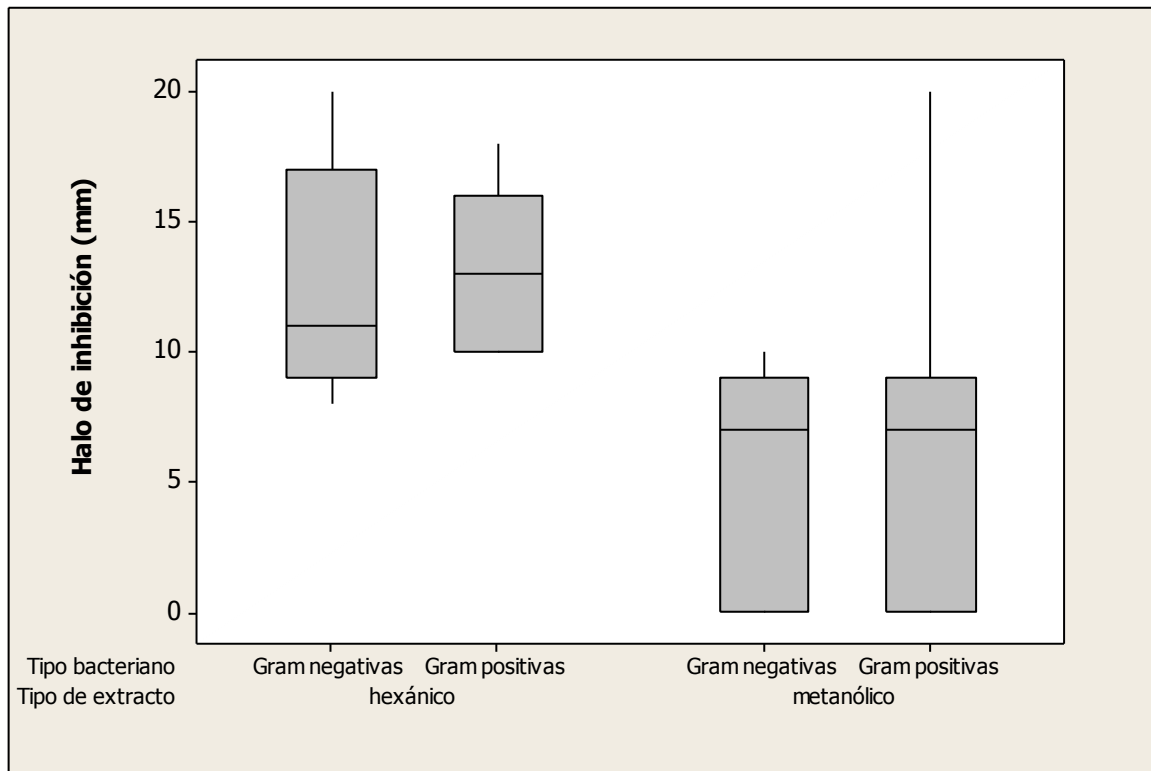
Los resultados obtenidos en las pruebas cualitativas Cuadro 6 considerando el tipo bacteriano (Gram-positivas y Gram negativas) se observa que presentaron los mayores halos de inhibición la bacterias Gram positivas con un promedio de  $13.4 \pm 2.32$  mm presentando halos en las 10 cepas que se probaron. Las bacterias Gram negativas presentaron un promedio de  $13.05 \pm 4.37$  mm donde *V. cholerae* Tor presentó los halos más grandes con un promedio de  $19.6 \pm 0.57$  mm. De acuerdo con el análisis de varianza se determinó que no existen diferencias significativas entre el tipo bacteriano y el extracto utilizado ANOVA ( $F=0.10$ ,  $P>0.05$ ). Es decir que el tamaño del halo de inhibición no depende del tipo bacteriano, si no del extracto utilizado.

**Cuadro 6. Actividad antibacteriana de *C. melanadenia* según el tipo bacteriano.**

Tipo bacteriano	Halos de inhibición (mm)	
	Extracto Hexánico	Extracto Metanólico
Gram Positivas	13.41 ± 2.32	6.62 ± 5.83
Gram Negativas	13.05 ± 4.37	5.72 ± 4.08

También podemos observar que el extracto hexánico provocó los halos de inhibición de mayor tamaño tanto para las bacterias gram positivas como para las gram negativas, sin embargo es importante resaltar que también se presentaron halos de inhibición en bacterias donde se utilizó el extracto metanólico. Los valores indican una diferencia en cuanto a que las bacterias gram positivas tuvieron halos más grandes tanto en el extracto hexánico como en el metanólico.

En la figura 3 se muestra en el diagrama de caja las diferencias entre los halos de inhibición de acuerdo con el tipo bacteriano, así como también el tipo de extracto utilizado; como se mencionó se encontraron diferencias significativas, podemos observar que en el caso del extracto hexánico la distribución del tamaño de los halos de inhibición hubo más variación ya que en el caso de las gram positivas se obtuvo un valor de 11 mm y las gram negativas un valor de 13 mm. El extracto metanólico provocó halos de inhibición de menor tamaño, los cuales fueron muy similares en cuanto al tipo bacteriano (gram positivas y gram negativas), teniendo en ambos casos una mediana de 7 mm, con una variación más grande en las gram positivas.



**Figura 3.** Actividad antibacteriana de *C. melanadenia*.

### EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

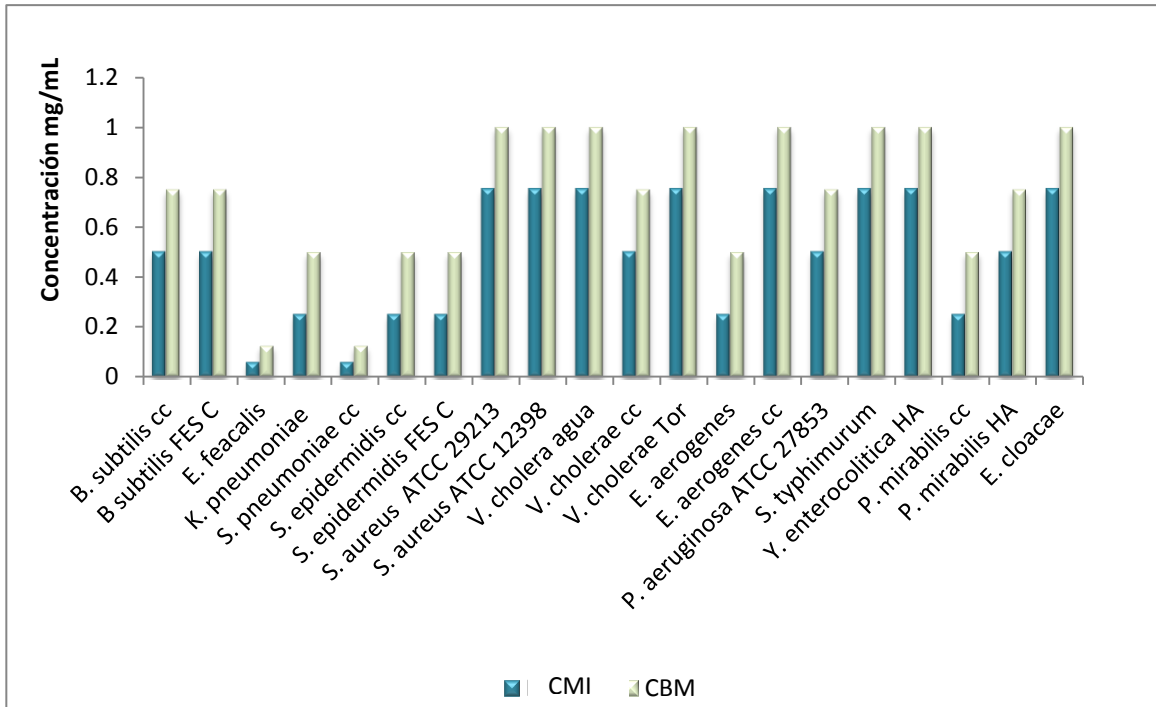
En la determinación de la CMI y CBM (Cuadro 7), los resultados obtenidos muestran que las cepas que tuvieron la mayor sensibilidad al extracto de *C. melanadenia* fueron *S. pneumoniae* y *E. feacalis*, ya que a la concentración de 0.06 mg/mL se inhibe drásticamente el crecimiento (CMI) y a la concentración de 0.125 mg/mL se inhibe totalmente (CBM).

**Cuadro 7.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Y Concentración bactericida Mínima (CBM) del extracto hexánico de *C. melanadenia*.

Cepa	<i>C. melanadenia</i> (mg/mL)	
	CMI	CBM
<b>Gram positivas</b>		
<i>B. subtilis</i> cc	0.500	0.750
<i>B. subtilis</i> FES C	0.500	0.750
<i>E. feacalis</i>	0.060	0.125
<i>K. pneumoniae</i>	0.250	0.500
<i>S. pneumoniae</i> cc	0.060	0.125
<i>S. epidermidis</i> cc	0.250	0.500
<i>S. epidermidis</i> FES C	0.250	0.500
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0.750	1.000
<i>S. aureus</i> ATCC 12398	0.750	1.000
<i>M. luteus</i>	ND	ND
<b>Gram negativas</b>		
<i>V. cholera</i> agua	0.750	1.000
<i>V. cholerae</i> cc	0.500	0.750
<i>V. cholerae</i> Tor	0.750	1.000
<i>E. aerogenes</i>	0.250	0.500
<i>E. aerogenes</i> cc	0.750	1.000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.500	0.750
<i>S. typhimurum</i>	0.750	1.000
<i>Y. enterocolitica</i> HA	0.750	1.000
<i>P. mirabilis</i> cc	0.250	0.500
<i>P. mirabilis</i> HA	0.500	0.750
<i>E. cloacae</i>	0.750	1.000

Simbología: igual a la anterior. ND: no se determino

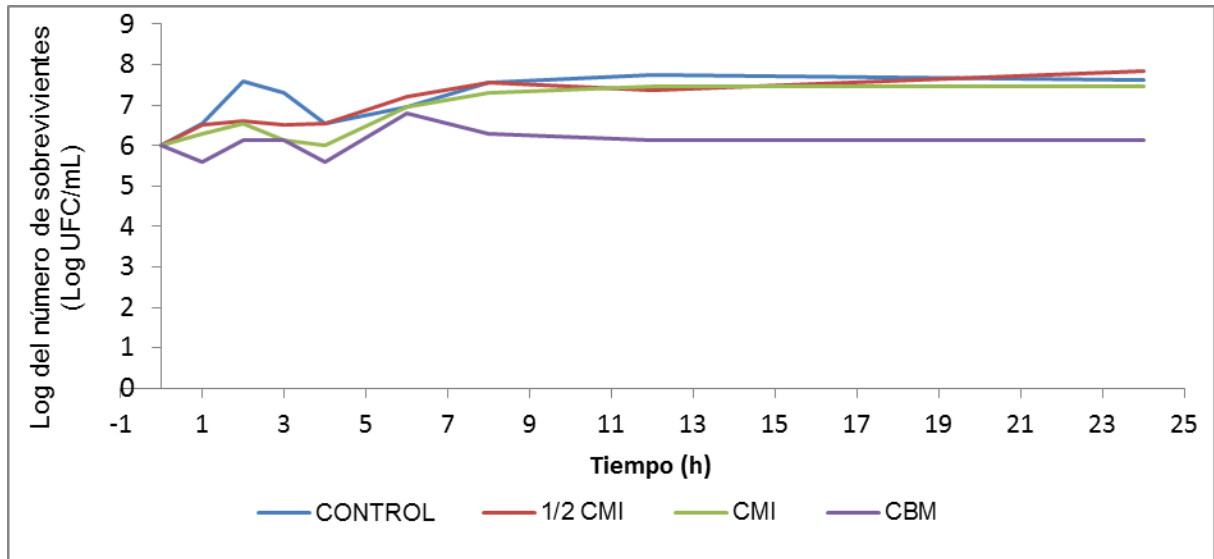
Los resultados obtenidos en la evaluación cuantitativa se muestran en la figura 4 en las 20 cepas donde se determinó MIC y CBM. Como se observó en la tabla anterior las cepas que necesitaron las concentraciones más bajas del extracto fueron *E. feacalis*, *S. pneumoniae*.



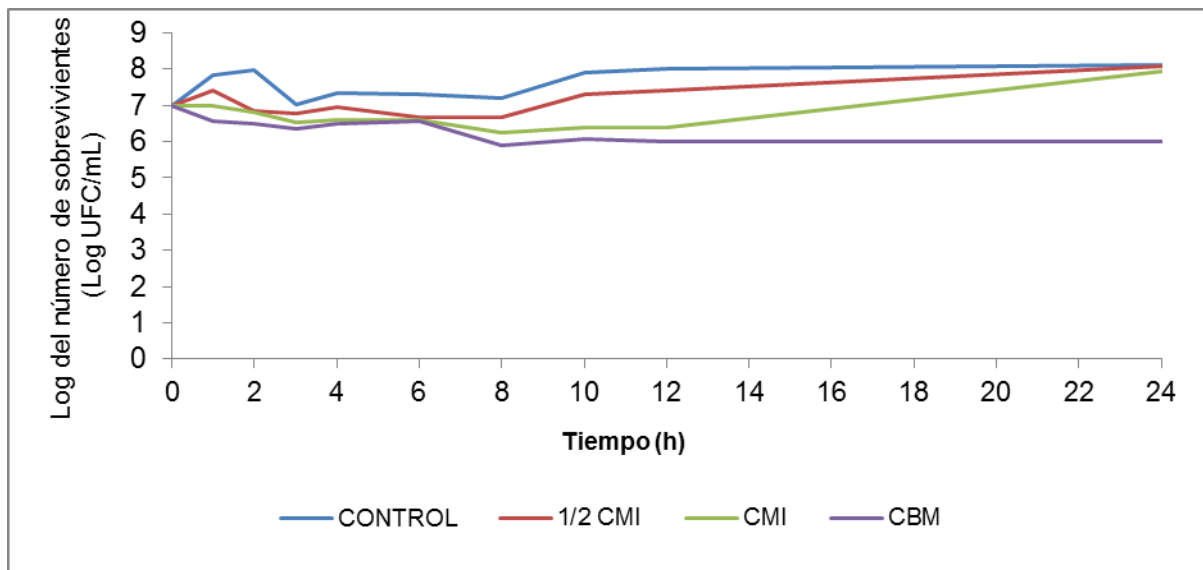
**Figura 4.** Concentración mínima inhibitoria CMI y bactericida mínima CBM.  
 Simbología: igual a la anterior

### CURVAS DE SOBREVIVENCIA BACTERIANA

En la figuras 5 y 6 se observa el efecto del extracto hexánico de *C. melanadenia* sobre la curvas de crecimiento de *S. epidermidis* donada por la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán y *V. cholera* aislada de un caso clínico, se puede observar claramente un efecto bacteriostático, ya que en ninguna de las dos cepas se registró que el extracto inhibiera totalmente el crecimiento celular a las 24 horas; sin embargo podemos distinguir que si hay una reducción en cuanto al número de unidades formadoras de colonias, ya que en concentraciones de CBM = 0.500 mg/mL el crecimiento disminuye, además en las concentraciones menores  $\frac{1}{2}$  CMI= 0.130 mg/mL y CMI= 0.250 mg/mL se observa como la viabilidad celular mantiene un crecimiento constante, pero menor en comparación al grupo testigo.



**Figura 5.** Efecto del extracto de *C. melanadenia* sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis* FES - C. Simbología: UFC: unidades formadoras de colonias; h: horas, concentraciones de ½ CMI = 0.125 mg/mL CMI = 0.250 mg/mL, CBM= 0.500 mg/mL



**Figura 6.** Efecto de *C. melanadenia* sobre la curva de crecimiento de *V. cholera* aislada de un caso clínico. Simbología: UFC: unidades formadoras de colonias; h: horas. Concentraciones de ½ CMI= 0.250 mg/mL CMI = 0.500 mg/mL, CBM= 1.0 mg/mL



## EVALUACIÓN CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA

Los resultados obtenidos de la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica del extracto hexánico de *C. melanadenia* (cuadro 8) muestran que las cepas que presentaron los mayores halos fueron *C. glabrata*, y *C. albicans* aislada de un urocultivo y *C. albicans* ATCC 14065. En cuanto a los hongos filamentosos no hubo actividad en ninguno de los dos extractos que se probaron.

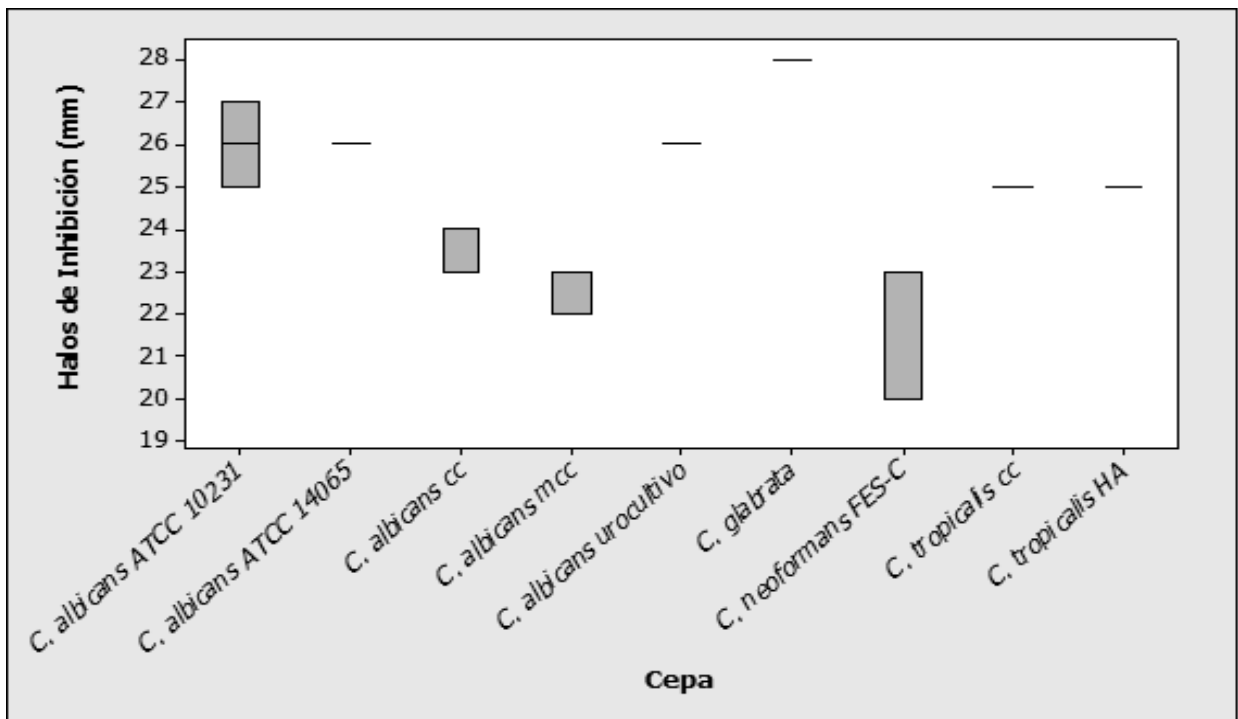
**Cuadro 8.- Actividad cualitativa antifúngica de *C. melanadenia*.**

Tipo	Halos de inhibición (mm)		
	Nistatina	Extracto Hexánico	Extracto Metanólico
<i>C. tropicalis</i> HA	9.00 ± 1.00	25.0 ± 0.00	NA
<i>C. albicans</i> mcc	9.00 ± 1.00	22.3 ± 0.47	NA
<i>C. neoformans</i> FES-C	8.67 ± 0.58	22.0 ± 1.73	NA
<i>C. tropicalis</i> cc	9.00 ± 1.00	25.0 ± 0.00	NA
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	9.67 ± 0.58	26.0 ± 1.00	NA
<i>C. glabrata</i>	7.67 ± 0.58	28.0 ± 0.00	NA
<i>C. albicans</i> urocultivo	9.33 ± 0.58	26.0 ± 0.00	NA
<i>C. albicans</i> ATCC 14065	11.83 ± 2.02	26.0 ± 0.00	NA
<i>C. albicans</i> cc	9.33 ± 0.58	23.3 ± 0.57	NA

Simbología: NA = no registro actividad, cc = caso clínico, FES-C = donada por la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Cusi = donada por el laboratorio de análisis clínicos de la FES Iztacala.

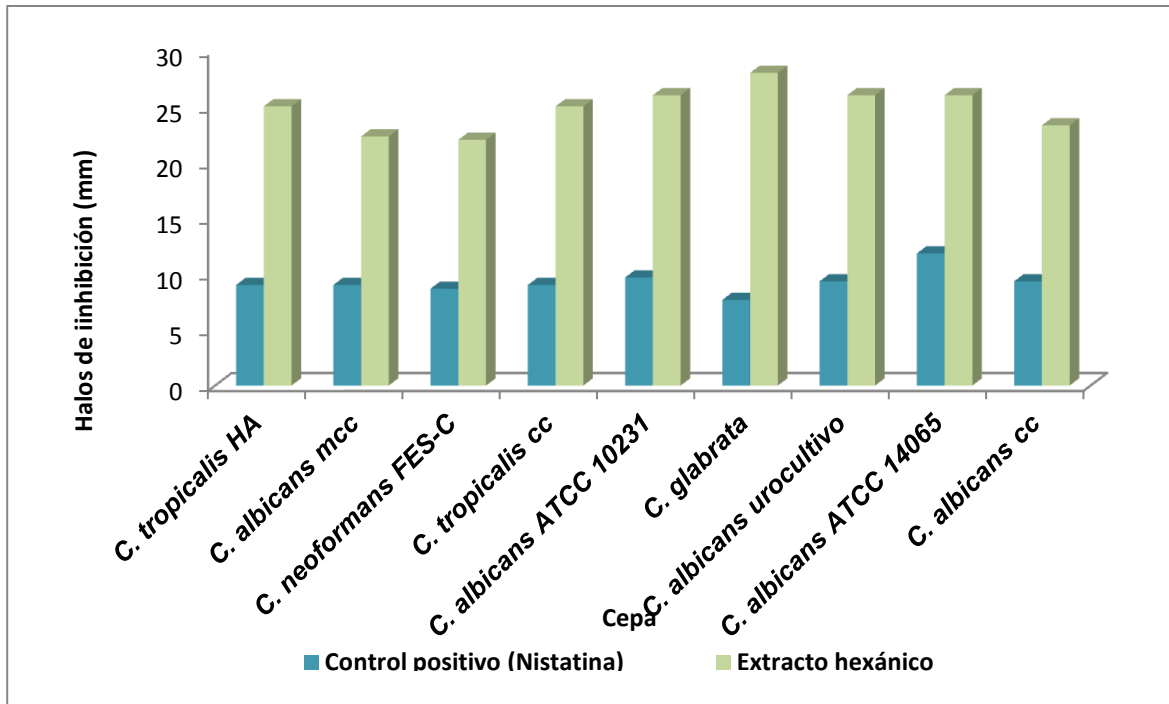
En la figura 7 se observa el diagrama de caja donde se representa el comportamiento de los halos de inhibición de las cepas levaduriformes, donde claramente se distingue que las cepas que tuvieron un comportamiento muy similar fueron *C. tropicalis* cepa donada por el Hospital Ángeles y *C. tropicalis* aislado de un caso clínico, ambas con una mediana de 25 mm, la cepa que presento los halos de mayor tamaño fue *C. glabrata* con un valor de 28 mm, así como la que tuvo los valores más bajos fue *C. albicans* con una mediana de 22 mm. De acuerdo con el análisis de varianza podemos decir que existen diferencias significativas en cuanto al del tamaño de los halos de inhibición ANOVA

( $F=22.20$ ,  $P<0.05$ ). También debemos mencionar que en las cepas levaduriformes no se presentó actividad en el extracto metanólico por lo que se realizó el análisis de varianza de un solo factor para observar las diferencias entre las cepas que tuvieron halo de inhibición en el extracto hexánico.



**Figura 7.-** Actividad antifúngica de *C. melanadenia*.

En la figura 8 se muestra el tamaño de los halos de inhibición en comparación al grupo testigo (nistatina), como se puede observar que en todos los casos los halos de inhibición provocados por el extracto hexánico fueron de mayor tamaño que el grupo testigo, resultando que la cepa que tuvo los mayores halos de inhibición fue *C. glabrata* con un promedio de 28 mm.



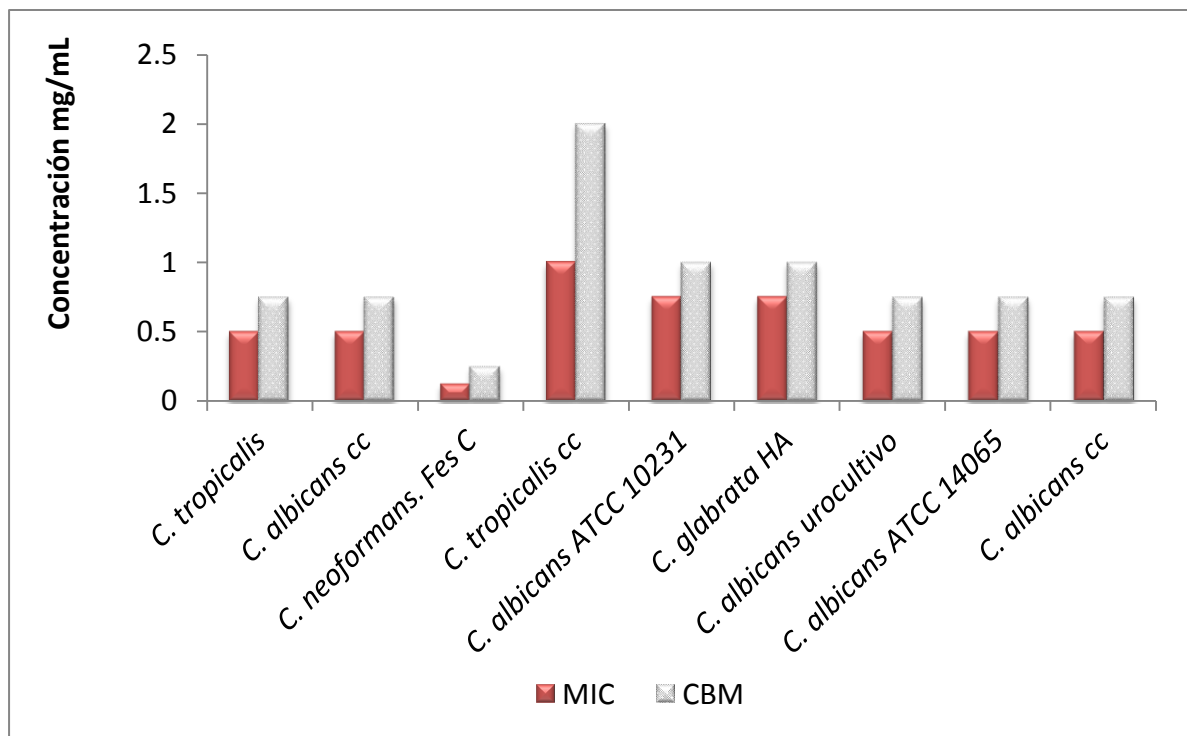
**Figura 8.** Actividad antifúngica de *C. melanadenia*

En la evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica como se puede observar en el cuadro 9, la mayoría de los hongos levaduriformes necesitaron concentraciones relativamente bajas para inhibir su crecimiento, la cepa que presentó la mayor sensibilidad al extracto de *C. melanadenia* fue *C. neoformans* donado por la FES - Cuatitlán, ya que a concentraciones de 0.125 mg/mL inhibe drásticamente su crecimiento (CMI) y a concentraciones de 0.250 mg/mL inhibe completamente su crecimiento (CFM), mientras que *C. tropicalis* aislado de un caso clínico fue la cepa que presentó la mayor resistencia al extracto ya que se requirieron concentraciones de 1.0 mg/mL para MIC y 2.0 mg/mL para CFM (figura 7).

**Cuadro 9.** Determinación de la Concentración Mínima inhibitoria (MIC) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) *C. melanadenia*

Cepa	<i>C. melanadenia</i> (mg/mL)	
	MIC	CFM
<i>C. tropicalis</i>	0.500	0.750
<i>C. albicans</i> mcc	0.500	0.750
<i>C. neoformans</i> . Fes C	0.125	0.250
<i>C. tropicalis</i> cc	1.000	2.000
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0.750	1.000
<i>C. glabrata</i> HA	0.750	1.000
<i>C. albicans</i> urocultivo	0.500	0.750
<i>C. albicans</i> ATCC 14065	0.500	0.750
<i>C. albicans</i> cc	0.500	0.750

Simbología: igual a la anterior.

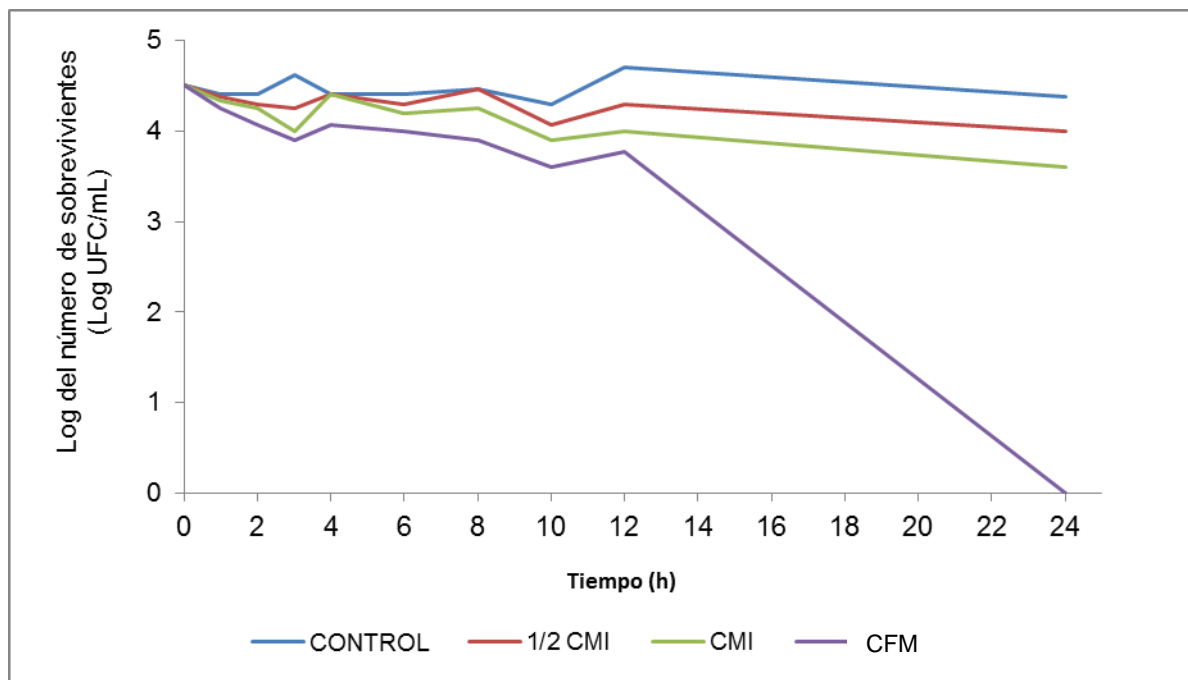


**Figura 9.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Fungicida Mínima (CFM) del extracto hexánico de *C. melanadenia*. Simbología: igual a la anterior.

## Curva de sobrevivencia

La figura 10 muestra el efecto del extracto hexánico sobre la curva de crecimiento de *C. neoformans* en donde se observa que concentraciones iguales o menores de CMI (0.125 mg/mL) se observa un efecto fungistático y en concentraciones mayores o iguales a CFM (0.250 mg/mL) el efecto obtenido es fungicida a las 24 horas de experimentación, inhibiendo completamente el crecimiento de *C. neoformans*.

El efecto de CFM sobre la curva de crecimiento del hongo levaduriforme se refleja en una curva de sobrevivencia de tipo de impacto múltiple en donde en las primeras horas se observa que no hay cambios significativos en cuanto al número de sobrevivientes y posteriormente se observa una curva lineal con pendiente negativa. Lo anterior se puede explicar por el hecho que el extracto hexánico en la célula está provocando alteraciones en varias vías metabólicas antes de perder totalmente viabilidad.



**Figura 10.** Efecto del extracto hexánico *C. melanadenia* sobre la curva de crecimiento de *C. neoformans*. Simbología: UFC: unidades formadoras de colonias. Concentraciones de  $\frac{1}{2}$  CMI = 0.0625 mg/mL CMI = 0.125 mg/mL CFM = 0.250 mg/mL

## DETERMINACIÓN DE LA EVALUACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS

En el cuadro 10 se muestran los resultados obtenidos en la identificación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hexánico de *C. melanadenia*.

**Cuadro 10.** Identificación cualitativa de metabolitos secundarios del extracto hexánico de *C. melanadenia*.

Grupo	Resultado
Alcaloides	Negativo
Fenoles	Positivo
Glicósidos	Positivo
Terpenos	Positivo

Como se puede observar en el cuadro 10 el extracto hexánico presentó, fenoles, glicósidos y terpenos.

## DISCUSIÓN GENERAL

La población utiliza diferentes plantas medicinales que carecen de validación experimental y que necesitan ser estudiadas desde el punto de vista científico (Pérez et al., 2011), como es el caso de la especie *C. melanadenia* que además de ser endémica para la reserva del Valle de Tehuacán – Cuicatlán no se encontraron registros que validen su uso, pero gracias a estudios etnobotánicos se sabe que los habitantes de San Rafael Coxcatlán la utilizan con diferentes fines medicinales, es aquí donde radica la gran importancia de conocer a fondo su efectividad, mediante métodos tanto cualitativos como cuantitativos, con el estudio de diferentes extractos así como de sus componentes podemos validar científicamente su efectividad ante diferentes microorganismos patógenos y demostrar efectos antibacterianos y antifúngicos.

En la obtención de los extractos, el rendimiento fue mayor para la parte metanólica (6.46%), sin embargo fue en el extracto hexánico (1.78%) donde se encontró la mayor capacidad como antimicrobiano. López y Rodríguez, 2008, reportan para *C. bonduc* la presencia de metabolitos secundarios tanto en extractos polares como de polaridad baja, así como también coinciden que en el caso del extracto hexánico se obtuvo el menor rendimiento, en el caso de *C. melanadenia* los componentes presentes también fueron en mayor cantidad polares.

En la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana se pudo comprobar la actividad antimicrobiana de *C. melanadenia* demostrando que ambos extractos fueron (metanólico y hexánico) activos tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Lo anterior lo coincide con lo reportado por López et al., 2008, donde en un estudio realizado en vainas y semilla de *C. tintoria* reportan acción antimicrobiana frente a *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.

En cuanto al tipo bacteriano, no se encontraron diferencias significativas, la bacterias Gram positivas presentaron en promedio  $13.4 \pm 1.32$  mm, mientras que las Gram negativas presentaron en promedio  $13.05 \pm 4.37$  mm, frente a extracto hexánico Aunque se sabe que una bacteria Gram negativa, además de presentar una membrana externa, presenta otra membrana interna, separadas por una capa delgada de peptidoglucano.

En cambio las Gram positivas solo tienen una membrana interna seguida de una gruesa capa de peptidoglucano. Prescott y colaboradores en 1999 mencionan que las bacterias Gram positivas son más sensibles a los metabolitos de naturaleza polar, dejando difundir con mayor facilidad sustancias hidrofílicas, mientras que las Gram negativas son más sensibles a los metabolitos de naturaleza no polar. Al no encontrar diferencias significativas entre el tipo bacteriano se podría pensar que el extracto hexánico de *C. melanadenia* no está actuando a nivel de pared celular, si no que estaría alterando otra vía metabólica.

En la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Bactericida Mínima (CBM) los resultados mostraron que las concentraciones fueron  $\leq 1\text{mg/mL}$ . En un estudio realizado por Corzo et al., 2010, reportan una potente actividad de las hojas de *C. paraguariensis* particularmente en cepas como *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, con valores de MIC  $> 0.854\text{ mg/mL}$  esto puede ser comparado con nuestros resultados ya en el caso de *C. melanadenia* también se presentó actividad en las mismas cepas aunque con valores de MIC  $> 0.750\text{ mg/mL}$ . Al igual Vattuone et al., 2008, reporta actividad en los extractos de las hojas de *C. paraguariensis*, en bacterias como *P. mirabilis* y *S. aureus* en concentraciones muy bajas.

En cuanto a las curvas de sobrevivencia podemos decir que para las cepas bacterianas tanto Gram positivas como negativas solo se observó un efecto bacteriostático, esto puede deberse a que la actividad sobre las cepas bacterianas no se deba a la acción de un único principio activo, si no al efecto sinérgico de varios de ellos. Davidson y Branen, 1993 mencionan que la actividad antimicrobiana se debe a que los compuestos atacan la pared celular, membrana celular, enzimas metabólicas, la síntesis de proteínas y el sistema génico. Cada uno de estos puntos, son esenciales para el desarrollo celular, por lo tanto si uno es atacado o inactivado la velocidad de crecimiento del microorganismo se ve minimizada.

En la evaluación cualitativa de la actividad antifúngica, se pudo determinar que el extracto hexánico presentó actividad en todas las cepas levaduriformes desafiadas, a diferencia del extracto metanólico donde en ninguna de las cepas se presentó actividad.



Teniendo halos de inhibición mayores al control positivo (nistatina). De acuerdo con lo reportado por Parekh y Chanda, 2008, en un estudio realizado de los extractos de *C. pulcherrima* determinaron que esta especie presenta actividad antifúngica contra cepas como *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata*, mostrando halos de inhibición >10 mm. Comparado con los resultados obtenidos para el caso de *C. melanadenia* está obtuvo halos de mayor tamaño con un promedio de 24.84 mm. En cuanto a los hongos filamentosos en ninguno de los extractos que se probaron se presentó actividad. De acuerdo con lo reportado por Sgariglia et al., 2007, la actividad antifúngica sobre cepas levaduriformes puede deberse a la gran cantidad de glicósidos presentes como lo reportan para el caso de *C. paraguariensis*.

En cuanto a la curva de sobrevivencia a diferencia de las cepas bacterianas en las cepas levaduriformes si se presentó un efecto fungicida, esto puede deberse a que se esté atacando a una de las vías metabólicas específicas de estas como podría ser la del ergosterol donde el mecanismo de acción este unido a la membrana celular fúngica, donde se forman los poros y se permita la permeabilidad de esta así como la pérdida de proteínas, glúcidos y cationes hasta la muerte celular.

La importancia de evaluar cepas patógenas como *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* que son levaduras de importancia médica y originan enfermedades respiratorias y meningoencefalitis, potencialmente fatales tanto en humanos como en animales en el caso de *C. neoformas*, y *C. albicans* que es el agente causante de más del 80% de las infecciones clínicas por hongos, la patogenicidad de las especies derivan su importancia no solo por la severidad de sus infecciones, sino también por su habilidad para desarrollar resistencia contra diferentes drogas antifúngicas. Según Barchiesi los estudios para conocer la sensibilidad de *C. neoformans* han sido escasos sin embargo debemos resaltar que las infecciones fúngicas oportunistas han llegado a ser una importante causa de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados. La mayor parte del aumento de estas infecciones se puede atribuir al incremento del uso de nuevos y más efectivos agentes antibacterianos, trasplantes de órganos, terapias inmunosupresoras y citostáticas, y fundamentalmente a la emergencia de la gran pandemia del siglo, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Por otro lado, la

aparición de cepas resistentes a los diferentes antifúngicos usados en la terapia se reporta como un problema en aumento. (Fernández, 1998).

En cuanto a la identificación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en el extracto hexánico de *C. melanadenia* podemos comparar nuestros resultados con lo dicho por Oliver y Bever (1963) que determinan en otras especies del género *Caesalpinia* grupos de fenoles, quinonas, alcaloides, flavonoides, terpenoides tienen acción antimicrobiana y antifúngica, también se han reportado el conjunto de los metabolitos: taninos, alcaloides, flavonoides y péptidos que tienen dicha acción. En el presente trabajo se identificaron para el extracto hexánico la presencia de metabolitos secundarios: fenoles y terpenos así como la presencia de glicósidos.

## CONCLUSIÓN

- *C. melanadenia* presentó actividad antimicrobiana tanto en bacterias Gram positivas, Gram negativas y en hongos levaduriformes.
- El extracto que presentó mayor actividad fue el extracto hexánico.
- El extracto hexánico está constituido por fenoles, terpenos y glicósidos.
- Se validó el uso de *C. melanadenia* en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades de origen infeccioso.

## **PERSPECTIVAS**

- ❖ Aislar e identificar el compuesto responsable de la actividad observada.
- ❖ Realizar diferentes estudios en donde se pruebe la eficacia (microbiológica) del extracto de diferentes partes de la planta.
- ❖ Determinar si existen variaciones espaciales y temporales en la concentración del metabolito responsable de la actividad.
- ❖ Realizar ensayos de toxicidad en líneas celulares.
- ❖ Determinar la actividad antioxidante por diferentes métodos.

## Apéndice I.

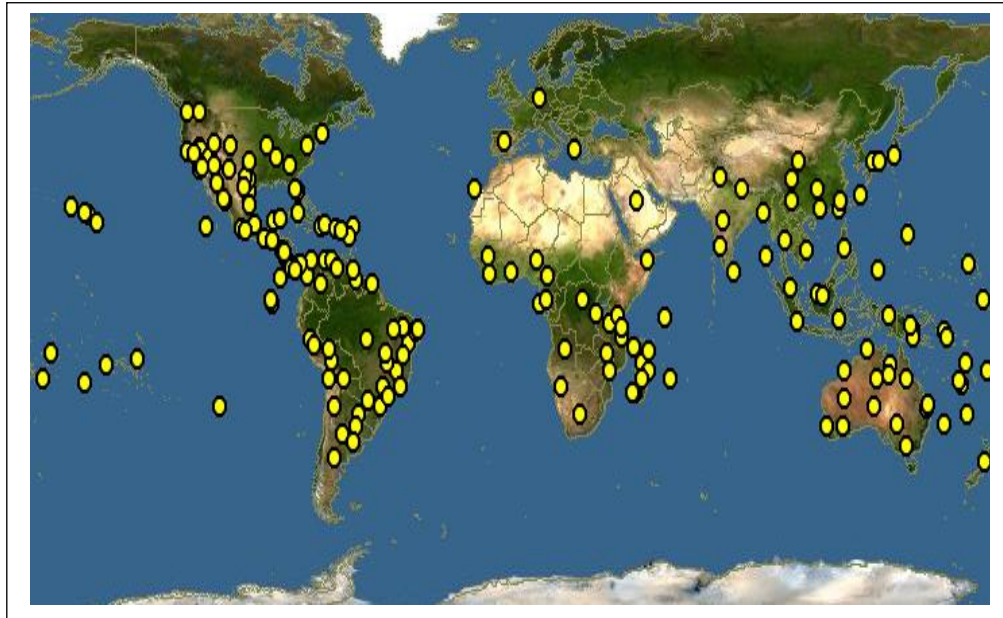
### **Género *Caesalpinia*:**

El género *Caesalpinia* pertenece a la familia de las leguminosas (Fabaceae). Consisten en plantas tropicales y subtropicales en bosques, sabanas y semidesiertos. El número de especies pertenecientes a este género oscila entre 70 a 165. De las que 40 están presentes en Sudamérica (Ulibarri, 1996). Algunas especies se cultivan como plantas ornamentales.

La Subfamilia Caesalpinoidea integrada por aproximadamente 160 géneros y 2. 500 especies que habitan principalmente en los trópicos y subtropicos de ambos hemisferios, formando parte importante de la vegetación primaria, principalmente en América, África y Asia.

Las especies del género *Caesalpinia* son árboles, arbustos o hierbas perennes, algunos de ellos trepadoras, tienen hojas alternas, folíolos 1-3 pinnados; pueden ser espinosas. Presentan flores amarillas; simetría ligeramente actinomorfa, hermafroditas con sépalos imbricados caedizos 5; pétalos 5, libres, desiguales; estambres 10, libres. El ovario súpero se compone de un carpelo y se desarrolla después de la polinización, produciendo una legumbre papirosa leñosa, la que puede ser lisa, espinosa, glandulosa o estar cubierta de pelos ramificados. Fruto, una legumbre típica o un lomento. (Sánchez de Lorenzo, 2008).

Hábitat. *Caesalpinia* crece naturalmente en territorios semiáridos, con una precipitación media anual de 230—500 mm y temperaturas medias anuales de 14.7—27.5°C (Figura 9). (Sánchez y Cáceres, 2008).



**Figura 11.** Distribución del género *Caesalpinia*

## **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

### ***Caesalpinia melanadenia* (Rose) Standl.**

*Caesalpinia melanadenia* es conocida comúnmente como Ixcanelillo es un arbusto pequeño de 1-3 metros (Figura 12 y 13), su corteza es amarillenta, hojas con escasos folíolos; flores rojo vino con abundante glándulas del mismo color; frutos son legumbres castaño-amarillentas cubiertas con glándulas rojo-vino. (Figura 11) Utilizada como forraje, y como leña (Téllez et al., 2008).



**Figura 12.** *Caesalpinia melanadenia* (Rose) Standl.



**Figura 13.** Fruto de *C. melanadenia*

## Distribución y hábitat

*Caesalpinia melanadenia* sólo se encuentra en el valle de Tehuacán – Cuicatlan, Puebla México, como es en el municipio de San Rafael Coxcatlan. (Figura 14).



**Figura 14.** Distribución de *Caesalpinia melanadenia*.

## Apéndice II.

### Área de colecta

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán forma parte de la región xerofítica mexicana (Rzedowski, 1978) y se localiza en la parte sureste del estado de Puebla y noroeste de Oaxaca, entre los 17°39´ y 18°53´ de latitud norte y los 96°55´ y 97°44´ de longitud oeste; cuenta con una extensión aproximada de 10,000 Km<sup>2</sup>, presentando diversas comunidades vegetales como son: bosque tropical caducifolio, bosque espinoso, bosque de encino, bosque de pino-encino, pastizal y matorral xerófilo.



### **San Rafael Coxcatlán.**

La localidad de San Rafael se encuentra situada en el municipio de Coxcatlán Puebla. Sus coordenadas geográficas son los paralelos 18° 12' y 18° 14' latitud norte y los meridianos 97° 07' y 97° 09' longitud oeste. (Canales et al, 2006).

El clima de San Rafael corresponde a un tipo seco, árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22°C (Médina, 2000). Los tipos de suelo predominantes son regosoles calcáreos, regosoles éutricos y xerosoles. (Canales et al, 2006)



**Figura 15.**Localización de San Rafael Coxcatlán Puebla.

### **Apéndice III.**

#### **Método de maceración** (Domínguez, 1973).

El material vegetal seco y pulverizado se colocó en un matraz y se agregó el hexano y metanol. Se dejó reposar durante 24 horas para obtener el máximo rendimiento. Se filtró el extracto y el exceso de solvente se destiló a presión reducida. La extracción se realizó, hasta que el solvente se observó transparente. Con los sólidos totales se determinó el rendimiento total del extracto de *C. melanadenia*.

## **Apéndice IV.**

### **Método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Método modificado de Koneman et al., 1991).**

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos. El método es el siguiente:

Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Mueller Hinton (Bioxon), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de las cepas bacterianas clínicamente significativas. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm, si es más fino las sustancias a evaluar tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; por el contrario, un agar de más de 4 mm de espesor producen una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición. El inóculo se prepara tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante al de los microorganismos a ensayar, se sumerge el asa en 10 mL de caldo Mueller Hinton (Bioxon), se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Incubar el tubo de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias por 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. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo con los organismos en estudio se pueden efectuar observándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales o en su defecto con un espectrofotómetro a 660 nm.

Si la suspensión de organismos es menos turbia que el estándar, se vuelve a incubar el tubo; si por el contrario, 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 segundo hisopo estéril y seco en la suspensión bacteriana y antes de retirarlos 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 de Mueller Hinton. Previamente se deja que la placa alcance la temperatura ambiente. Es aconsejable mantener la tapa entre abierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie del agar. Finalmente se siembra mediante estrías en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

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

Para la aplicación de sustancias se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro, hechos de papel Whatman del No. 5. Cada sensidisco se impregna con 2 mg de las sustancias a evaluar. Para llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias se colocan en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril.

Como control negativo para los bioensayos, se utilizan sensidiscos impregnados con 10  $\mu$ L de los solventes utilizados para la extracción (metanol y hexano), dejándolos evaporar durante 24 horas, al igual que los experimentales. Como control positivo se evalúa la sensibilidad de las cepas bacterianas a sensidiscos impregnados con 25  $\mu$ g de cloramfenicol.

Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora (aparato de laboratorio E-51 con termostato) a 37 °C, sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>. Es preciso evitar presión de CO<sub>2</sub>, debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso del pH. El desarrollo de algunos microorganismos es inhibido a pH ácido, lo cual tiende a

estrechar falsamente las zonas de inhibición. Así mismo, 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.

Para la interpretación de resultados, las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en mm. En todos los casos, la prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio en mm.

## **Apéndice V.**

### **Método de dilución en agar (Método modificado de Koneman et al., 1991).**

Para estos bioensayos se evalúan diferentes concentraciones de los extractos que resultan con actividad antibacteriana (0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/mL), para ello se prepara una solución patrón y con base en esta se toman las alícuotas correspondientes, las cuales se agregan a 20 mL de agar Mueller Hinton, a una temperatura de 45 °C, con la finalidad de obtener las concentraciones señaladas. Una vez agregada cada concentración del extracto, la mezcla se agita rápidamente para obtener una dispersión homogénea y se colocan en cajas petri.

El inóculo consiste en una suspensión bacteriana con una concentración de  $1.5 \times 10^8$  bacterias por mL. Se toma el inóculo con la ayuda de un hisopo estéril, el cual se sumerge en la suspensión bacteriana y se elimina el exceso de líquido antes de retirarlo, haciéndolo rotar contra la pared interna del tubo que contiene el inóculo, este se coloca sobre las placas con los extractos con diferentes concentraciones, tocando la superficie del agar por punteo. Este procedimiento se realiza tres veces, que corresponden a tres repeticiones.

Como control positivo se utilizan placas sin extracto y como control negativo se usan cajas con los diferentes solventes de acuerdo con el volumen de las alícuotas utilizadas.

Las placas se incuban a 37 °C durante 24 horas. La interpretación de resultados se realiza considerando como CBM aquella concentración en la que ya no se observa crecimiento bacteriano y como CMI la concentración que antecede a la CBM y que aún presenta crecimiento bacteriano, aunque en menor proporción, comparado con el grupo control.

## **Apéndice VI.**

**Metido cualitativo de inhibición de crecimiento radial** (Wang y Bun, 2002).

En el ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas petri, que contengan 20 mL de agar Czapek, posteriormente se inoculan 5 mm de diámetro de micelio del hongo a ensayar. Los discos serán impregnados con 2 mg/mL del extracto a probar. Las placas se van a incubar a 23°C durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

## **Apéndice VII.**

**Metodo cuantitativo de inhibición de crecimiento radial** (Wang y Bun, 2002).

En el ensayo contra hongos filamentosos se llevará a cabo en cajas petri, que contendrán 20 mL de agar Czapek, con las siguientes concentraciones del extracto activo 0.065, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL, posteriormente se inocularán 5 mm de diámetro de micelio del hongo a ensayar. Las placas se van a incubar a 23°C durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado. Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de Ketoconazol a las siguientes concentraciones 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.70, 14.00, 28.00 µg/mL. Con

una regla se medirá el crecimiento del hongo para calcular el porcentaje de inhibición. En todos los casos esta prueba se realizará por triplicado.

## **Apéndice VIII**

### **Curva de sobrevivencia bacteriana (Avila, 1996).**

Estas curvas se realizan para estudiar el efecto de los extractos vegetales, la metodología es la siguiente.

En primer lugar se prepara el inóculo bacteriano, tocando las superficies convexas de 4 o 5 colonias de apariencia semejante al de los microorganismos a ensayar, se sumerge el asa en 10 mL de caldo Mueller Hinton (Bioxon), se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Incubar el tubo de cultivo a 37 °C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar No. 0.5 de McFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  bacterias por mL.

Se inocula, con la ayuda de una micropipeta, 0.1 mL de la suspensión de bacterias en los tubos que contienen el antimicrobiano (extracto). Este estará a una concentración igual a la CBM y sus múltiplos medios, esto es la CMI y la mitad de la CMI. La concentración final debe ser de aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFC/mL de caldo en cada tubo. Los tubos se incuban en una estufa sin presión de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Se muestrea cada hora, durante los primeros cuatro tiempos (T<sub>0</sub>-0, T<sub>1</sub>-1, T<sub>2</sub>-2, T<sub>3</sub>-3, T<sub>4</sub>-4) (tiempo-horas transcurridas); en los tiempos cinco y seis, se muestrea cada dos horas (T<sub>5</sub>-6, T<sub>6</sub>-8). Para el tiempo siete se muestrea después de cuatro horas (T<sub>7</sub>-12) y el tiempo ocho se muestrea después de doce horas (T<sub>8</sub>-24).

Para determinar las UFC en cada tiempo, se realizan dos diluciones de cada concentración en solución salina estéril y se siembran en placas con agar para permitir su crecimiento. Estas se incuban durante 24 horas a 37 °C.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación de las diluciones de los tratamientos, se cuenta el número de UFC y se grafica el Logaritmo base diez del número de sobrevivientes contra el tiempo, para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación o muerte bacteriana, prolongando la zona lineal de la curva de supervivencia, hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

## **Apendice IX.**

### **Determinación cualitativa de metabolitos secundarios.**

#### **Terpenos**

La relación entre el isopreno y los terpenoides es empírica ya que en la ruta biogénica de los terpenoides no se ha identificado al isopreno, el conocimiento de la unión de dos o más unidades isoprenoides y del isopreno como un componente de la estructura de los terpenoides, ha sido de gran ayuda en la elucidación de las estructuras de muchos de los productos naturales, entre ellos aceites esenciales y carotenoides (Bruneton, 1991).

La vainillina es el componente más importante de la vainilla. En estado natural se encuentra bajo la forma de un glicosído que es hidrolizado por un proceso fermentativo que elimina la molécula de azúcar. Muchos terpenos son componentes de los aromas florales, como el mirceno (mirto), geranial (geranio) y las iononas (violetas) (Domínguez, 1973)

#### **Determinación**

Se utilizará reactivo de Vainillina el cual se preparó con 2 volúmenes de vainillina al 10 % en Etanol con Ácido Clorhídrico concentrado. Se emplearán placas de Sílica Gel 60 F<sub>254</sub> de 1.5 cm de ancho por 8.5 cm de largo, colocando una pequeña muestra del extracto hexánico a un cm del borde y se dejará saturar la cámara cromatográfica con la fase móvil y se colocará el cromatófilo dentro de la cámara y se mantendrá ahí hasta

que avance unos 6 cm. La vainillina es el reactivo que se utilizará ya que se sabe que reacciona con calor con los terpenos. (Domínguez, 1973).

### **Fenoles:**

Los pigmentos vegetales que poseen un esqueleto carbonado C6-C3-C6 como se encuentra en la flavonona, aurona, chalcona, flavona, flavanonol, flavonol, flavandiol-3,4, antocianidina, catequina, isoflavona y neoflavona. Se conocen unos 900 flavonoides naturales; se encuentran extensamente distribuidos entre las plantas, tanto libres o como glicósidos; estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas. Los flavonoides presentan todos los matices de solubilidad, desde totalmente solubles en agua hasta insoluble en ella pero soluble en éter etílico. (Domínguez, 1973).

Los flavonoides son sintetizados por numerosos grupos de plantas y con excepción de algunas flaonas localizadas en las alas de mariposa, probablemente por digestión, se puede decir que no se les encuentra en animales. (Domínguez, 1973)

Los poliglicósidos son muy solubles en agua y escasamente solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos. La posición ocupada por la porción de azúcar influye en la solubilidad de la molécula y su capacidad para formar lacas insolubles con los metales (Domínguez, 1973).

### **Determinación**

Una pequeña muestra del extracto hexánico un poco diluido se disuelve y se le agrega cloruro férrico. En caso de que sea positivo para fenoles se obtiene un precipitado verde o bien azul intenso (Domínguez, 1973).

### **Alcaloides (Bruneton, 1991).**



Dichos compuestos se pueden identificar por reacciones coloridas y de precipitación con reactivos que contienen sales de metales pesados como el reactivo de Dragendorff y el de Mayer. Los alcaloides constituyen un grupo muy heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas con acción fisiológica más o menos intensa sobre los animales.

Aunque se han encontrado unos 50 alcaloides en órganos animales sólo 12 de estos no se han encontrado en vegetales y por definición se acostumbra a excluirlos del grupo. Los alcaloides aparecen en muy diversas familias de plantas, unos 256 en los hongos, algas y otros vegetales inferiores. De las gimnospermas se han aislado unos ciento quince alcaloides, dentro de las angiospermas se encuentran las monocotiledóneas. Estas han aportado 488 alcaloides. En tanto que de las dicotiledóneas se han obtenido unas 3600. La mayoría de los alcaloides se localizan en los vegetales como sales de ácidos orgánicos. En ciertas plantas hay un ácido especial asociado a los alcaloides. Así el ácido quínico está unido a los alcaloides de la quina, el ácido mecónico con los del opio y el ácido aconítico con las aconitinas. Algunos alcaloides se encuentran en forma de glucósidos, otros se hallan en forma de ésteres de ácidos orgánicos de complejidad variable. Aunque con frecuencia se agrupan los alcaloides de acuerdo a su procedencia botánica por otra parte es más racional clasificarlos de acuerdo con alguno de los 254 tipos estructurales en que hasta el momento se les ha dividido. (Domínguez, 1973).

Desde hace algunos años se ha tratado de identificar la función de los alcaloides en las plantas, y se les ha considerado como productos terminales del metabolismo del nitrógeno. Algunos alcaloides contienen grupos funcionales específicos que pueden determinarse por reactivos así los alcaloides con hidroxilos fenólicos pueden dar coloraciones con el cloruro férrico o las sales de arildiazonio. Los alcaloides indólicos darán coloración azul con el reactivo de urk (B dimetilamino densalheido en ácido sulfúrico al 65%) los del tropano darán coloración con el reactivo de vitalli (evaporar material con  $\text{HNO}_3$  fumante, luego KOH etanólica). Se han desarrollado marchas para averiguar a qué grupo de estructuras pertenece un alcaloide, mediante la aplicación sistemática y ordenada de reactivos especiales.

Debido a que los alcaloides son muy heterogéneos existen diferentes pruebas de coloración para demostrar su presencia. Para esta investigación, se usará el reactivo de Dragendorff al igual que el reactivo de Mayer.

En el caso del Reactivo de Dragendorff si hay presencia de alcaloides, se obtendrá un precipitado anaranjado (Domínguez, 1973). Por otro lado, con el reactivo de Mayer se observará un halo blanco en el extracto de ser positivo para alcaloides (Domínguez, 1973).

### **Glicósidos:**

#### Reacción de Molisch (Identificación de Carbohidratos)

La presencia de carbohidratos en una muestra se pone de manifiesto por la reacción de Molisch, que a cierto punto es la reacción universal para cualquier carbohidrato. Se basa en la acción hidrolizante y deshidratante del ácido sulfúrico sobre los hidratos de Carbono. En dicha reacción el ácido sulfúrico cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos de la muestra y la deshidratación a furfural (en las pentosas) o hidroximetilfurfural (en las hexosas). Estos furfurales se condensarán con el alfa naftol del reactivo de Molisch (reacción de Molisch) produciendo una fase de color púrpura, en caso positivo de presencia de carbohidratos (Miller, 1959).

### **Procedimiento.**

Para el caso de los glicósidos se disolverá el extracto en metanol y se le agregará un poco de alfa-naftol y después se vertirá ácido sulfúrico resbalándolo por las paredes, obteniéndose así un precipitado rojo-violeta (Miller, 1959).

## REFERENCIAS

- Aguilar, A. y Camacho J. R. 1985. Uso popular de las plantas medicinales y su distribución por aparatos y sistemas. Archivos de investigación médica. México, D. F. Suplemento 6:13–14.
- Ata, Gale, E., Samarasekera, R. 2009. Bioactive chemical constituents of *Caesalpinia bonduc* (Fabaceae). Phytochemistry Letters. 2:106–109.
- Avila, J. G. 1996. Actividad anti- *Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis Maestría en Microbiología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 111.
- Bermúdez, A., Oliveira, M., Velázquez, D. 2005. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Interciencia. 30(8): 453-459.
- Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Ed. Acribia. España. 594 pp.
- Canales, M., M. Hernández, D., C., T., Caballero N., J., Romo de Vivar., R., Alonso., Duran D., A., y Lira. S., R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. Acta Botanica Mexicana 75: 21-43.
- Carvalho, J., Teixeira, J., Pergentino, J.C. Souza C, Jairo, K., Bastos, D., Dos Santos, D., Sarti, S. 1996. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. Journal of Ethnopharmacology. 53:175-178.
- Cervantes, L., Valdés, J. 1990. Plantas medicinales del distrito de Ocotlán Oaxaca. Anales Instituto de Biología Universidad Nacional Autónoma México. 60 (1): 85-103.
- Chakraborty, G., Rohan, S., Chaitanya, R., 2009. Analgesic activity of chloroform extract of *Caesalpinia pulcherrima*. Journal of Pharmacy Research. 2 (7): 1199-1200.

Chanwitheesuk A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J., Rakariyatham, N. 2007. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides Lamk.* Food Chemistry. 100: 1044–1048.

Corzo, A. G., Sgariglia M. A., Vattuone, M. A., Chifarelli, A., Zurita C. A., Coronel F. P. 2010. Extracto alcohólico de hojas de *Caesalpinia paraguariensis* (D. Parodi) Burk. como fuente de principios antimicrobianos contra bacterias patógenas humanas y fitopatógenas. Ciencias forestales.18 (1,2):79-89.

Cruz, M., Espinal, C., Castillo, G. 2008 Sensibilidad y resistencia del *Staphilococcus aureus*, *Haemphillus influenzae* y *Streptococcus pyogenes* frente a cuatro plantas utilizadas en atención primaria de salud por los pobladores del Batey. Ciencia y Sociedad. 2: 153-165.

Das, B., Srinivas, Y., Sudhakar, S., Mahender, I., Laxminarayana, K.,Raghavendar, P., Raju, T., Jakka, N., Rao, J. 2010. New diterpenoids from *Caesalpinia* species and their cytotoxic activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 20: 2847–2850.

Davidson, P.M. y Branen, A.L. (Eds.). 1993. Antimicrobials in foods. Marcel Dekker. 29: 593-627.

Davicino R., Mattar M., Casali Y., Correa S., Pettenati E., Micalizzi B. 2007. Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. Rev. Peru. Biol. 14(2): 247-251.

Dey, P., Harborne, J. 1989. Methods in Plant Biochemistry. Plant Phenolics. Academic Press. I: 540.

Dominguez, S., Xorge, A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México. 281.

Fernández A., C., M, González M., M, Teresa I., Z., M.1998. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. Cubana Med Trop 1998. 50(1):48-53.

Gan, R., Xu X., Song, L., Li, L. 2010. Antioxidant activity and total phenolic content of medicinal plants associated with prevention and treatment of cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Academic Journals*. 4(22): 2438-2444.

Kalemba, D. Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10:813–829

Koneman, W. E. 1991. Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana, México. 461 pp.

López G. M., Rodríguez P. M. 2008. Determinación de los componentes fitoquímicos en hoja y semilla de la planta *Caesalpinia bonduc*. *Spectro Q*. 10 (3): 1.

López F. C., Garró, V., Yrei V. 1998. Acción antimicrobiana de *Caesalpinia tintoria* (Molina) Kuntze o Tara, de diferentes regiones del Perú. *Ciencia e Investigación*. 5 (1) : 28-37.

Medina, S. J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (cactaceae) a lo largo de una cronosecuencia edáfica en un avanico aluvial en Coxcatlán, Valle de Tehuacán. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 90 pp.

Mendoza, C., Moreno, M. 2007. Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento de *Phytophthora palmivora* Butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* Penz y Sacc. *Tierra Tropical*. 3 (1):81-89.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem*. 31: 426-428.

Muñoz, O. V., Mollinedo P., Garcia, P. 2011. Trypanocidal and antioxidant *in vitro* activities of ethanolic extracts from *Caesalpinia pluviosa* DC. and *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. *Biofarbo*.19 (2).

Oliver Bever B. 1983. Medicinal Plants in Tropical West Africa III Antiinfection therapy with Higher Plants. Universidad de Cambridge. 9: 1-33.

Pawar, Ch. R., Landge, A. D., Surana, S. J. 2008. Phytochemical and Pharmacological Aspects of *Caesalpinia sappan*. *Journal of Pharmacy Research*. 1(2): 131-138.

Parekh, J., Chanda, S. 2008. In vitro antifungal activity of methanol extracts of some Indian medicinal plants against pathogenic yeast and moulds. *African Journal of Biotechnology*. 7 (23): 4349-4353.

Pérez M. M, Morón R. F., Sueiro O, M., Boffill C. M. Lorenzo M. G., Méndez O. R., Blanco M. F. 2011. Validación etnofarmacológica de *Nectandra coriacea* (Sw.) Griseb. y *Caesalpinia bahamensis* Lam. Reportadas como diuréticas en el municipio Santa Clara. *Revista cubana de santa clara*.16: 2.

Prescot, M., Harley, P., Klein, A. (1999). *Microbiología*. Cuarta edición. Mc Graw-Hill interamericana. España 1005p.

Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa, México. 432 pp.

Sanabria A. 2003 Biodiversidad, Tradiciones e investigación al servicio de la salud. Memorias del Seminario Internacional de Plantas Medicinales y sus Derivados: OPS, Ministerio del Medio Ambiente y de la Protección Social, Embajada Real de los Países Bajos. Bogotá. 22-31.

Sánchez de Lorenzo, Cáceres, J., M. 2008. Las leguminosas plantas ideales para la xerojardinería. Comunicación XXXV congreso parjap.

Santnami, D., Yadava, R. 2011. Potential Phytochemical from *Caesalpinia crista* Linn. *Research Journal of Phytochemistry* 5(1):22-31.

Sgariglia, M. A., Soberon, J, R., Sampietro, D. A. 2007. Actividad antifungica de *C. paraguariensis*. *Allelopathy journal*. Mol. Med. Chem. 11: 21-23.

Srinivasan, Y., Sudhakar, S., Das, B., Mahender, I., Laxminarayana, K., Raghavendar, P., Raju, T., Jakka N., Rao, J. 2010. New diterpenoids from *Caesalpinia species* and

their cytotoxic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 20: 2847–285.

Srinivas, K., Koteswara, Y., Mahender, I., Das, B., Rama, K., Kishore, H., Murty, U. 2003. Flavanoids from *Caesalpinia pulcherrima*. *Phytochemistry*. 63: 789–793.

Toledo, V. 1995. New paradigms for a new ethnobotany. Reflections on the case of México. In *Evolution of a discipline*, R. S. Evans y R. S. Von (eds.). Dioscorides, Portland. 79–92.

Téllez, V. O., Reyes, C. M., Dávila, A. P., Gutiérrez, G. K., Téllez, P. O., Álvarez, E. R., González, R. A., Rosas, Ruiz. I., Ayala, R. M., Hernández, M. M., Murguía, R. M., Guzmán, C. U., 2008. Guía ecoturística de las plantas del valle de Tehuacán Cuicatlán. 24-36.

Ulibarri, E. A. 1996. Sinopsis de *Caesalpinia* y *Hoffmannseggia* (Leguminosae - Caesalpinioideae) de Sudamérica. *Darwiniana* 34:329.

Vattuone, M. A., R. H. Martínez A., Corzo G. 2008. Actividad antibacteriana de extractos de hojas de *Caesalpinia paraguariensis*, Par. Burk, “Guayacán”. *Mol. Med. Chem*. 15: 37-41.

Viveros, J., Castaño, J., 2006. Evaluación in vitro de los extractos de vegetales de *Mycosphaerella fijiensis*. *Agronomy*. 14(1): 37-50.

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

Yodsaoue, O., Chatchanok K., Ponglimanont, Ch., Tewtrakul S., Chantrapromma, S. 2011. Potential anti-inflammatory diterpenoids from the roots of *Caesalpinia mimosoides* Lamk. *Phytochemistry*. 71:1756–1764.