



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**Estudio Preliminar de la Actividad Antimicrobiana
de *Juliania adstringens* (Schldl.) Schldl
(Cuachalalate).**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

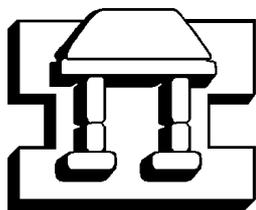
Bióloga

PRESENTA

ANGELICA JAURY CASTILLO

DIRECTOR Y ASESOR

DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, MÉXICO
2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fitoquímica en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM, bajo la dirección de la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez y con los apoyos y financiamientos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 101974), PAPCA UNAM 2009-2010; PAPIIT UNAM 207808 y Proyecto Plantas Útiles de San Rafael Coxcatlán (MGU/Useful Plants Project México).

Agradecimientos

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por abrirme las puertas de la mejor Universidad, formando parte de cada aula, laboratorio y pasillos de su institución. Gracias por permitirme conocer a las mejores personas de mi vida.

A la Dra. Margarita Canales Martínez por aceptar ser mi directora en el sueño más lindo de mi vida. Gracias por ser motivo de admiración y respeto, y por regalarme siempre su tiempo, su compañía, sus consejos pero sobre todo por la confianza y la oportunidad que me brindó para realizar este proyecto.

A la Dra. Tzasna Hernández Delgado por su grandeza como ser humano y como amiga. Gracias por ser mi ejemplo a seguir y por compartir siempre maravillosos momentos llenos de risas, que aún nos falta muchos por recorrer.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, Dr. Rafael Lira Saade y Biol. Luis Barbo Hernández Portilla por dedicar tiempo a este trabajo con cada comentario valioso y acertado que hicieron de este un mejor trabajo. Gracias.

Al Dr. José Guillermo Ávila Acevedo responsable del laboratorio de Fitoquímica por haberme dado la oportunidad de ser una chica más en su laboratorio.

A la Dra. Chio, a July y a Jimenita por regalarme lo mejor de ustedes su maravillosa amistad, las quiero mucho. Gracias por su linda compañía siempre..

A todos los que forman parte del laboratorio de Fitoquímica Chio, July, Jimenita, Kar, Rebe, Mayris, Gabrielito por ser los mejores compañeros pero sobre todo por hacer de este trabajo el más divertido.....

Dedicatorias

Dedicada a la memoria de mi abuelo Arturo Castillo Garduño, quien fue el viejito más lindo, el mejor papito, el mejor amigo y sobre todo mi motivo de lucha día a día. Gracias por hacer del camino una alegría sin igual y por entregarnos los mejores años de tu vida para cuidarnos y demostrarnos tu amor más puro y sincero. Nos veremos algún día, mi lindo y hermoso viejito.

A mi Madre:

Porque ser tu hija es el milagro más hermoso que me pudo haber pasado. Pues cuando miro tus ojos, descubro que los sueños que se anhelan con amor verdadero no son sólo eso, sino realidades hermosas que hoy comparto contigo. Gracias porque cada día lo disfruto a tu lado, con la convicción de que ese ha sido el mejor pero que mañana algo maravilloso nos estará esperando.

Como explicarte mamita todo lo que tú eres como explicarte que para mí solamente eres mi gran inspiración. Gracias mamá!!

TE AMO.

A mi Tío Javi:

Quien es mi tío consentido pero sobre todo el héroe que siempre está cada vez que caemos, porque eres nuestro guía, porque nos enseñas las cosas necesarias para poder saltar todos los obstáculos del camino, porque eres significado de respeto, amor y lucha y porque luchas con nosotros para lograr nuestros sueños que aún no acaban. Gracias, gracias, gracias por ser nuestro tío pero sobre todo nuestro papito quien siempre llevamos en nuestra mente, nuestro corazón y sobre todo agradecemos a Dios permitirnos tenerte con nosotros.

TE QUEREMOS MUCHO TIO JAVI.

A mis Bananitas:

Gracias por su apoyo y por todos los momentos que hemos compartido, momentos llenos de sentimientos y pensamientos, sueños y anhelos, secretos, risas y lágrimas y sobre todo por compartir lo más hermoso nuestra hermandad. Las adoro y las quiero como no se imaginan.

Gracias Guadalupe por ser mi ejemplo por haberme abierto el camino para no tropezar pero sobre todo por enseñarme que la vida es tan maravillosa como tú, te quiero mucho.

Gracias Dany por ser mi hermanita menor y la más linda (jijiji). Gracias por escucharme, ayudarme y darme siempre tu opinión en todo momento. Siempre recuerda luchar por tus sueños sin importar que tan lejos estén, te quiero mucho.. aaahh también a mi cuñadito jajaja.

Gracias Godie por los mejores momentos que compartimos y aún en tu lejanía te extrañamos y te queremos mucho hermanito, siempre estás en nuestra mente y corazón.

A mis Amigos:

Existen personas en mi vida que me hacen feliz por la simple casualidad de haberse cruzado en mi camino.

Algunas han recorrido el camino a mi lado viendo muchas lunas pasar, más otras apenas veo entre un paso y otro.

Gracias Nalle, Almuchis, Laura, Laura Ángeles, César y Pablo por ser el comienzo de esta historia, por haber compartido la alegría de un sueño y por demostrarme su cariño incondicional, los quiero y los extraño mucho.

Dedicatorias

Gracias Nalle, Nan, Karla, Vikys, Miguel y Alonso por llenar mi camino de personas como ustedes tan especiales, lindas, tiernas, buenas y hermosas, las cuales se han convertido en un gran apoyo y en mi mano derecha siempre. Gracias por ser simplemente mis grandes y mejores amigos.

Gracias Lula, Perlita, Denis, Monik, Nancy, Fer, Diego, Carlos, Abbid y Saulito por esas buenas noches de parranda, por cada risa y por cada locura, por compartir anécdotas, peleas, momentos bochornosos (verdad Lulú jajaja), reconciliaciones, ligues y tristezas. Gracias por hacer de mi camino la mejor experiencia y por creer en mí como yo creo en ustedes. Los admiro y los quiero mucho...

Mil gracias por encontrarse en mi vida, gracias a cada uno de ustedes por dejarme estar en sus historias y colocar siempre un montón de sonrisas en mi rostro.

Y gracias a todos aquellos que nunca creyeron en mí y en mi madre, porque ustedes fueron un motivo más de lucha.. hoy finaliza un sueño lleno de esfuerzos y logros..

GRACIAS MAMÁ TE AMO.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.	2
OBJETIVO GENERAL.	7
OBJETIVOS PARTICULARES.	7
MATERIAL Y MÉTODOS.	8
Colecta del material.....	8
Bioensayos preliminares.	8
Obtención de los extractos.	8
Evaluación de la actividad antimicrobiana.	8
Microorganismos utilizados.....	8
Bacterias Gram- Negativas:	8
Bacterias Gram- Positivas:	9
Hongos Filamentosos:	9
Hongos Levaduriformes:	9
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	9
Evaluación cualitativa.	9
Evaluación cuantitativa.	10
Efecto del extracto sobre la curva de crecimiento.....	10
Fraccionamiento Biodirigido.	10
Evaluación de la actividad antifúngica.	11
Evaluación cualitativa	11
Evaluación cuantitativa.	11
Prueba de Toxicidad general.	12
Evaluación de la actividad antioxidante.	12
RESULTADOS	13
Colecta de la planta.	13
Rendimiento del extracto.	13
Actividad antibacteriana	14
Evaluación Cualitativa	14
Evaluación cuantitativa	16
Efecto del extracto sobre la curva del crecimiento bacteriano.	17
Fraccionamiento biodirigido.....	18
Actividad antifúngica	24
Evaluación cualitativa	24
Evaluación cuantitativa	24
Toxicidad general	26
Actividad antioxidante	26
DISCUSIÓN.	27
CONCLUSIÓN.	31

APÉNDICE 1	32
Descripción botánica de <i>Juliania adstringens</i>	32
APÉNDICE 2	35
Área de Colecta de <i>Juliania adstringens</i>	35
APÉNDICE 3	37
Técnica de Maceración	37
APÉNDICE 4	38
Método de difusión en agar de Kirby-Baüer	38
APÉNDICE 5	41
Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración bactericida mínima (CBM)	41
Método de macrodilución en agar	41
Determinación de la concentración bactericida mínima	42
Microtécnica de dilución en caldo.	42
APÉNDICE 6.	43
Efecto del extracto sobre la curva de crecimiento.....	43
APÉNDICE 7	44
Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial	44
Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial	45
APÉNDICE 8	46
Actividad Antioxidante	46
REFERENCIAS	47

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1: Antecedentes de <i>J. adstringens</i>	5
CUADRO 2: Datos etnobotánicos de la especie.....	13
CUADRO 3: Rendimiento del extracto de <i>J. adstringens</i>	13
CUADRO 4: Actividad antibacteriana del extracto MeOH1 de <i>J. adstringens</i>	15
CUADRO 5: Determinación de CMI y CBM del extracto de <i>J. adstringens</i>	16
CUADRO 6: Rendimientos y halos de inhibición de las fracciones obtenidas en la columna A del extracto MeOH2 de <i>J. adstringens</i>	18
CUADRO 7: Rendimiento y halo de inhibición de las fracciones obtenidas de la columna B.....	20
CUADRO 8: Concentraciones mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) de la fracción 3 de la columna B de <i>J. adstringens</i>	21
CUADRO 9: Tiempo de retención y máxima absorción bajo luz UV de las fracciones activas.	23
CUADRO 10: Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de <i>J. adstringens</i>	24
CUADRO 11: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos MeOH1 y MeOH2 de <i>J. adstringens</i> sobre <i>T. mentagrophytes</i>	25
CUADRO 12: Porcentaje de muerte de <i>Artemia salina</i> de extracto MeOH1 de <i>J. adstringens</i>	26

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>J. adstringens</i>	14
FIGURA 2: Actividad antibacteriana del extracto MeOH1 de <i>J. adstringens</i> sobre 13 cepas bacterianas.	15
FIGURA 3: Efecto del extracto MeOH2 sobre la curva de crecimiento de <i>V cholerae</i> No-01. Se emplearon las siguientes concentraciones: ½ CMI= 0.06 mg/mL, CMI=0.125 mg/mL y CMB=0.5 mg/mL.....	17
FIGURA 4: Efecto del extracto MeOH2 sobre la curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> . Se emplearon las siguientes concentraciones: ½ CMI=0.125 mg/mL, CMI=0.25 mg/mL y CMB=0.75 mg/mL.	17
FIGURA 5: Actividad antibacteriana sobre <i>S. aureus</i> de las fracciones obtenidas en la columna A de la cromatografía en columna abierta con fase estacionaria sílica gel del extracto MeOH2 de <i>J. adstringens</i>	19
FIGURA 6: Actividad antibacteriana sobre <i>V.cholerae</i> No- 01 de las fracciones obtenidas en la columna B de la cromatografía en columna abierta con fase estacionaria sílica gel del extracto MeOH2 de <i>J. adstringens</i>	21
FIGURA 7: Cromatograma de HPLC de la fracción 3 de la columna B del extracto MeOH2 de <i>J. adstringens</i>	22
FIGURA 8: Cromatograma de HPLC de la fracción 9 de la columna B del extracto MeOH2 de <i>J. adstringens</i>	22
FIGURA 9: Determinación de CL50 (concentración letal media) para los extractos MeOH1 y MeOH2 de <i>J. adstringens</i> sobre <i>T. mentagrophytes</i>	25
FIGURA 10: Comparación del porcentaje de reducción del extracto MeOH1 y el control positivo (Quercetina).....	26
FIGURA 11: Árbol de <i>Juliania adstringens</i>	33
FIGURA 12: Ubicación geográfica del poblado de San Rafael.	35

RESUMEN

La corteza de *Juliania adstringens* es usada para aliviar heridas infectadas, afecciones del tracto digestivo y vías urinarias. En esta investigación se determinó la actividad antimicrobiana, antioxidante y toxicidad general de la corteza de *J. adstringens*. La corteza fue colectada en San Rafael, Puebla. El extracto metanólico (MeOH1) se obtuvo por maceración; se realizó una partición de este extracto con hexanos (H) y así se obtuvo también el extracto metanólico libre de compuestos no polares (MeOH2). La actividad antibacteriana se evaluó, con el método de Kirby-Baüer. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Bactericida Mínima (CBM) utilizando la técnica de dilución en agar. Se determinó la actividad de MeOH1 sobre la curva de crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae* No-01. La actividad antifúngica se evaluó utilizando el método de inhibición del crecimiento radial, se determinó la Concentración Fungicida Media (CF₅₀) y la Fungicida Mínima (CFM). La actividad antioxidante se evaluó por el método de reducción del DPPH. La toxicidad general se evaluó sobre *Artemia salina*. Se realizó un fraccionamiento biodirigido de MeOH2 empleando una cromatografía en columna abierta (cc). Sólo MeOH2 presentó actividad antibacteriana y antifúngica. Se observó un efecto antibacteriano sobre las 13 cepas bacterianas ensayadas. Las bacterias más sensibles fueron *S. aureus* y *S. epidermidis* (CMI= 0.25, 0.5 mg/mL respectivamente; CBM= 0.75 mg/mL para ambas). MeOH2 tuvo un efecto bacteriostático sobre *S. aureus* y *V. cholerae* No-01. En cuanto a la actividad antifúngica, presentó actividad sólo sobre *T. mentagrophytes* (CF₅₀ = 1.3 mg/mL). MeOH1 fue moderadamente tóxico (LC₅₀ = 528.59 ppm). La actividad antioxidante de MeOH1 mostró el valor de CI₅₀= 5.7 µg/mL. Sólo las 18 primeras fracciones de la cc mostraron actividad antibacteriana; la fracción 3 mostró menor actividad que MeOH2 (CMI = 0.25 y CBM mayor a 4 mg/mL). Estos resultados validan el uso de la corteza de *J. adstringens* dentro de la medicina tradicional de San Rafael, Puebla.

Palabras Claves: Actividad antibacteriana, Actividad antifúngica, Actividad Antioxidante, Corteza medicinal, *Juliania adstringens*.

INTRODUCCIÓN.

México es considerado un país con gran diversidad biológica, debido a su gran extensión geográfica, su variedad de climas, el tipo de suelo que lo compone y principalmente su amplia riqueza florística. Se ubica entre las dos regiones biogeográficas más importantes Neártica y Neotropical, siendo México, gran poseedor de numerosas especies de plantas con flor que contienen sustancias de valor medicinal (Rzedowski y Equihua, 1987).

El conocimiento popular y uso de los recursos naturales en México sigue siendo parte importante de la medicina tradicional dentro de las comunidades rurales, quienes durante siglos han preservado sus conocimientos empíricos sobre las propiedades de las plantas medicinales, transmitiéndolos a lo largo de generaciones (Castro, 1988).

Las plantas medicinales han ocupado siempre un lugar predominante en el desarrollo e historia del hombre, pues forman parte de los recursos terapéuticos que emplea la medicina tradicional y han representado desde siempre una alternativa para la salud (Aguilar y Camacho, 1985).

Para la población mexicana, la aplicación de la medicina tradicional constituye uno de los recursos básicos, pues ocupa un lugar importante en la realidad médica del país. Mientras que la medicina alópata cubre el 40% de los servicios de salud, cerca del 20% de los habitantes recurren a las plantas medicinales o a otros recursos de la medicina tradicional para combatir las enfermedades (Argueta y Cano, 1994).

Es indudable que en los últimos años ha resurgido en todo el mundo el interés por las plantas medicinales, en la actualidad, los estudios inician, en una primera etapa, con la recuperación del conocimiento popular sobre las hierbas, árboles y arbustos medicinales (Aguilar y Zorrilla, 1985), por lo que los primeros medicamentos se obtuvieron de extractos de plantas medicinales en forma de jarabes, tinturas, pomadas y emplastos (Olivas, 1999).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda a países en desarrollo, construyan programas dedicados a la investigación, la preparación de cultivos, la conservación de plantas medicinales utilizadas y también que mediante la transferencia de tecnología, se evalúe la calidad y eficacia de estas medicinas (Fleurentin y Plelt, 1981).

La importancia del estudio de las plantas medicinales, reside principalmente en la presencia de los metabolitos secundarios los cuales son biosintetizados a partir de los primarios. Estos son responsables de la coloración, aromas de flores y frutos e interacciones ecológicas, como es el caso de la atracción de polinizadores. Adicionalmente, las múltiples funciones que presentan en las plantas permite la búsqueda de nuevos compuestos químicos naturales, como medicamentos, insecticidas, herbicidas, reguladores de crecimiento, etc. por lo que los metabolitos secundarios forman parte de las investigaciones fitoquímicas que comprenden los siguientes aspectos: extracción de la planta; separación y aislamiento de los componentes de interés; caracterización de los compuestos aislados; investigación de las rutas biosintéticas referidas a compuestos determinados, y valoraciones cuantitativas (Vivanco et al., 2005; Traese y Evans, 1991; Gros et al., 1985).

Para su estudio la fitoquímica permite aislar e identificar los principios activos de numerosas plantas ya que es de interés la enorme variedad de sustancias orgánicas que son elaboradas y almacenadas como compuestos defensivos (antimicrobianos, inhibidores de la germinación, insecticidas, etc.) ante depredadores y patógenos; así como también la estructura química de estos compuestos, su biosíntesis, su metabolismo y su distribución natural; por este motivo los estudios fitoquímicos son una parte importante dentro de las investigaciones encaminadas a encontrar nuevos compuestos y formas de preparación de medicamentos (Harborne, 1973).

Dentro de la gran diversidad de plantas medicinales de México, el cuachalalate (*Juliania adstringens*) es una planta de uso muy antiguo de la cual se ha confirmado una actividad antitumoral y anticancerígena en cierto tipo de tumores (González et al., 1962), estos datos sugieren que la especie probablemente contenga en su composición química compuestos que tengan un cierto grado de toxicidad, así como la presencia de metabolitos secundarios, que son responsables de la actividad antibacteriana, antifúngica, cicatrizante, antiinflamatoria y antioxidante.

El cuachalalate (Apéndice 1) es un árbol con escamas grandes, su corteza es de color moreno grisáceo, habita en climas cálidos, semicalidos y templados, se encuentra ampliamente distribuida en el Estado de México, Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Distrito Federal, Guerrero, Oaxaca y Puebla (Argueta y Cano, 1994).

En *J. adstringens* se ha determinado la presencia de terpenos y ácidos orgánicos (Carrasco y Rivera, 2009; Navarrete, 1982; González y Delgado, 1962), de este tipo de metabolitos secundarios se ha demostrado su actividad antibacteriana (Cowan, 1999). Aunado a lo anterior, los estudios etnobotánicos (Canales et al., 2005) documentan el uso de esta especie para aliviar enfermedades de posible origen bacteriano y fúngico. Por lo que existen varias investigaciones que intentan descubrir las propiedades químicas de *J. adstringens*, los datos más sobresalientes se muestran en el cuadro 1, en donde se puede observar que se han realizado estudios fitoquímicos que demuestran la presencia de diferentes metabolitos secundarios aislados de la corteza de *J. adstringens*, aunado a esto se ha evaluado y comprobado la actividad antiinflamatoria, antitumoral y antiulcerogástricas.

Cuadro 1: Antecedentes de *J. adstringens*.

INVESTIGACIÓN REALIZADA	PARTE UTILIZADA	REFERENCIA
Reportaron la presencia de sarsapogenina en el extracto metanólico de <i>J. adstringens</i> .	Corteza	González y Delgado, 1962
Descubrieron propiedades antitumorales del extracto metanólico de <i>J. adstringens</i> en ratones con adenocarcinoma mamario.	Corteza	González et. al., 1962
Aislamiento y caracterización de varios triterpenoides como el ácido masticadienónico, 3 α -hidroximasticadienónico, ácido isomasticadienónico, ácido 3-epi hidroximasticadienónico.	Corteza	Navarrete, 1982.
La administración oral del extracto de <i>J. adstringens</i> en ratas Wistar a las que se les indujo úlcera duodenal redujo la mortalidad y perforación del duodeno.	Corteza	Navarrete et al., 1990
Aislamiento y caracterización de varios compuestos de <i>J. adstringens</i> como: sarsapogenina y β -sistosterol.	Corteza	González et. al., 1962; Navarrete, 1982. Citado en Morales, 2000.
Investigación farmacológica demostró un efecto hipocolesterolemia al administrar subcutáneamente el extracto hexánico de <i>J. adstringens</i> en ratas.	Corteza	Mata et al., 1991.

El extracto metanólico de <i>J. adstringens</i> provoca un efecto antiulcerogástrico.	Corteza	Navarrete et. al., 1998.
Identificaron y aislaron los compuestos ácidos de la resina y realizaron una prueba antiinflamatoria.	Corteza	Olivera et al., 1999.
Evaluaron los extractos acuosos de <i>J. adstringens</i> en dos modelos inflamatorios demostrando que solo en un modelo se observó actividad antiinflamatoria.	Corteza	Oviedo et. al. 2004.
Reportaron la actividad antibacteriana de las plantas medicinales usadas por la gente de San Rafael Coxcatlán, Puebla.	Corteza	Canales et. al., 2005.
Evaluaron el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de <i>J. adstringens</i> en bacterias Gram (+), Gram (-) y <i>Helicobacter pylori</i> .	Corteza	Miranda, 2006.
Evaluaron la actividad antibacteriana de los compuestos aislados, ácido masticadienónico, 3 α -hidroximasticadienónico, β -sitosterol, ácido <i>epi</i> -oleanólico y ácido 2-hidroxi-6-(<i>Z</i> -nonadec-16-enil)-benzoico de <i>J. adstringens</i> sobre las bacterias patógenas de la cavidad bucal.	Corteza	Carrasco y Rivera, 2009

En la medicina tradicional la corteza de *J. adstringens* (Apéndice 1) es utilizada para resolver trastornos como la diarrea, disentería y heridas infectadas (Canales et al., 2006 y 2005; Argueta y Cano, 1994). Sin embargo, hasta el momento son pocos los estudios que se han realizado sobre su actividad antimicrobiana, por tal motivo los objetivos de esta investigación son los siguientes:

OBJETIVO GENERAL.

Determinar la actividad antimicrobiana, antioxidante y toxicidad general de la corteza de *Juliania adstringens* (Schldl.) Schldl.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar el rendimiento de los extractos obtenidos de la corteza de *Juliania adstringens*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana, antioxidante y toxicidad general del extracto metanólico de *Juliania adstringens*.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Bactericida Mínima (CBM) y la Concentración Fungicida Media del extracto metanólico (CF₅₀) de *Juliania adstringens*.
- Determinar la actividad bactericida o bacteriostática del extracto MeOH₂ sobre las especies bacterianas más sensibles (una Gram positiva y una Gram negativa).
- Caracterizar cualitativamente la composición química de la fracción de mayor actividad.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Colecta del material.

La corteza de *J. adstringens* se colectó en Agosto del 2007 en la localidad de San Rafael, Coxcatlán, Puebla (Apéndice 2). El espécimen fue depositado en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (IZTA) con el número de colecta MCM 14.

Bioensayos preliminares.

Obtención de los extractos.

Para la obtención del extracto herbal, se tomaron 502.5 gr de la corteza de la planta seca de *J. adstringens*; una vez molida se obtuvo el extracto crudo metanólico (MeOH1) mediante la técnica de maceración descrita por Domínguez (1973) (Apéndice 3). El extracto se filtró y se destiló el exceso de solvente bajo presión reducida. Posteriormente el extracto MeOH1 fue sometido a una partición con hexanos, obteniendo de esta forma el extracto metanólico libre de compuestos no polares (MeOH2) y el extracto hexánico. El rendimiento de cada extracto se determinó con relación al peso seco de la planta.

Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Microorganismos utilizados.

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

Bacterias Gram- Negativas:

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

Bacterias Gram- Positivas:

Staphylococcus aureus ATCC 12398, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus subtilis* y *Sarcina lutea*, fueron donadas por el Laboratorio de Microbiología de la FES-Cuautitlán.

Hongos Filamentosos:

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

Hongos Levaduriformes:

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

Evaluación de la actividad antibacteriana.

Evaluación cualitativa.

La actividad antibacteriana se evaluó con el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 4). Como control positivo se usaron sensidiscos impregnados con Cloramfenicol (25 µg por disco). Los discos fueron impregnados con 2 mg del extracto a probar. Como controles negativos se utilizaron sensidiscos con el solvente empleado. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado. Esta técnica fue aplicada también en las levaduras *Candida albicans* y *Criptococcus neoformans*.

Evaluación cuantitativa.

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se utilizó la técnica de dilución en agar (Koneman, 1996) (Apéndice 5). Las concentraciones empleadas para los bioensayos cuantitativos fueron las siguientes: 2.0 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 0.75 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL. Las cajas se inocularon con 100µL de un cultivo bacteriano a una concentración de 1×10^5 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias) se dejaron crecer durante 24 hrs a 36°C. Esta técnica fue aplicada también en las levaduras *Candida albicans* y *Criptococcus neoformans*.

La mínima concentración del agente antibacteriano que permite sobrevivir a menos de 0.1% del inóculo original, se denomina Concentración Bactericida Mínima (CBM).

Efecto del extracto sobre la curva de crecimiento..

Para determinar el efecto del extracto sobre la curva de crecimiento bacteriano se emplearon las cepas bacterianas: *Vibrio cholerae* No-01 y *Staphylococcus aureus* (Apéndice 6). Se muestrearon 9 tiempos para obtener la población de bacterias sobrevivientes y se utilizaron las concentraciones de $\frac{1}{2}$ MIC, MIC y CBM, así como también un grupo testigo (Ávila, 1996).

Fraccionamiento Biodirigido.

Para separar los compuestos activos se utilizaron técnicas cromatográficas de columna abierta y de placa fina biodirigidas permitiendo obtener un mayor rendimiento de las fracciones activas. Se realizaron dos columnas cromatográficas con sílica gel de malla 70-230 (Sigma 5-2509), en la columna A se empleó 1gr. del extracto MeOH₂ debido a que se utilizó como ensayo y estandarización de la fase móvil; sin embargo para la columna B se emplearon 50 gr. del extracto MeOH₂ la fase móvil consistió en mezclas de acetato de etilo y metanol en orden creciente de polaridad. Se obtuvieron de la columna A 216 alícuotas de 4mL y de la columna B se obtuvieron 151 alícuotas de 300 mL cada una.

Para agrupar las alícuotas similares se realizaron cromatografías en placa fina, para lo cual se utilizaron cromatofolios de sílica gel Merck (Kieselgel 60). Se observaron con luz U.V (366-254 nm) y posteriormente se revelaron con sulfato cérico. En la columna A, 216 alícuotas fueron agrupadas en 15 fracciones y en la columna B, 151 alícuotas se agruparon en 42 fracciones a las cuales se les evaluó la actividad antibacteriana sobre las cepas bacterianas *Vibrio cholerae* No-01 y *Staphylococcus aureus*.

Asimismo se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), para verificar la composición química de las fracciones más activas. empleando una columna Discovery C-18, con un tamaño 250-4.6 mm y una partícula de 5.0 μm y se corrió de forma isocrática con una mezcla de metanol:acetonitrilo:agua (25:25:50) con un flujo de 1 mL/min. y con un detector de arreglo de diodos a una λ de 260 nm, y realizando un barrido completo de 200 a 400 nm. Esta cromatografía se realizó a las fracciones 3 y 9 de la cromatografía en columna abierta.

Evaluación de la actividad antifúngica.

Evaluación cualitativa

Para el análisis cualitativo se utilizó la técnica de inhibición del crecimiento radial (Apéndice 7) usando una concentración de 2 mg por disco del extracto a probar; como control positivo Ketoconazol (0.007 mg) y como control negativo se utilizaron sensidiscos con 10 μL de metanol (Wang y Bun, 2002).

Evaluación cuantitativa.

El ensayo con hongos filamentosos se llevó a cabo mediante el método de inhibición del crecimiento radial reportado por Wang y Bun, 2002 (Apéndice 7). Las concentraciones empleadas para los bioensayos cuantitativos fueron las siguientes: 2.0, 1.5, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL. cada bioensayo se realizó por triplicado.

Prueba de Toxicidad general.

La toxicidad general se evaluó con el extracto MeOH1 debido a que presentó mayor actividad y es el extracto que más se acerca a la infusión que consume la gente. Esta prueba se llevó a cabo usando larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach). El extracto fue probado a las siguientes concentraciones: 1.0, 0.10 y 0.01 mg/mL y se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO). Se adicionaron 10 mL de agua de mar artificial a cada frasco.

Para todos los casos se utilizó como control negativo el solvente en el que fue disuelto el extracto (DMSO) y como control positivo, ácido gálico a las mismas concentraciones que el problema.

Después de 24 hrs. bajo una temperatura de 23 °C y una luz blanca continua, se procedió al conteo de sobrevivientes, para lo cual se utilizó un microscopio estereoscópico.

El porcentaje de mortalidad por cada concentración fue calculado, aplicando la fórmula de Abad. La concentración letal media (CL₅₀, mg/mL) se determinó realizando una regresión lineal para el extracto probado (Padmaja et al., 2002; citado y modificado por Niño et al., 2006).

Evaluación de la actividad antioxidante.

La evaluación de la actividad antioxidante se llevó a cabo mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) método modificado de Murillo, 2006 (Apéndice 8). Se evaluó la actividad a diferentes concentraciones del extracto MeOH2 (2-30 ppm).

Pruebas estadísticas.

Para analizar los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana se utilizó el análisis estadístico de varianza (ANOVA de dos factores), para determinar si existe diferencias significativas sobre la sensibilidad entre las cepas bacterianas.

RESULTADOS

Colecta de la planta.

La corteza de *J. adstringens* (Cuachalalate) fue recolectada durante el mes de Agosto del 2007 en la localidad de San Rafael Coxcatlán, Puebla en esta localidad su nombre común es “Cuachalalate” y utilizan la corteza como medicina en infusión (Cuadro 2).

Cuadro 1: Datos etnobotánicos de la especie.

Nombre científico	<i>Juliania adstringens</i>
Nombre común	Cuachalalate
Familia	<i>Julianiaceae</i>
Parte utilizada	Corteza
Forma de uso	Infusión

Rendimiento del extracto.

El rendimiento de los extractos de la corteza de *J. adstringens* (Cuachalalate) se muestran en el cuadro 3 y figura 1. El extracto MeOH1 presentó un rendimiento de 218.71 gr.

Cuadro 2: Rendimiento del extracto de *J. adstringens*.

Extracto	Rendimiento g.	%
MeOH 1	218.71g	39.41%
MeOH 2	132.43g	23.86%
Extracto Hexánico	84.29g	15.19%

El rendimiento en (%) de *J. adstringens* se calculó con respecto a 554.9 gr. de corteza.

En la partición se observó que el extracto MeOH2 tuvo un mayor rendimiento en comparación al extracto hexánico lo cual indica que la especie presenta una mayor cantidad de compuestos con polaridad alta.

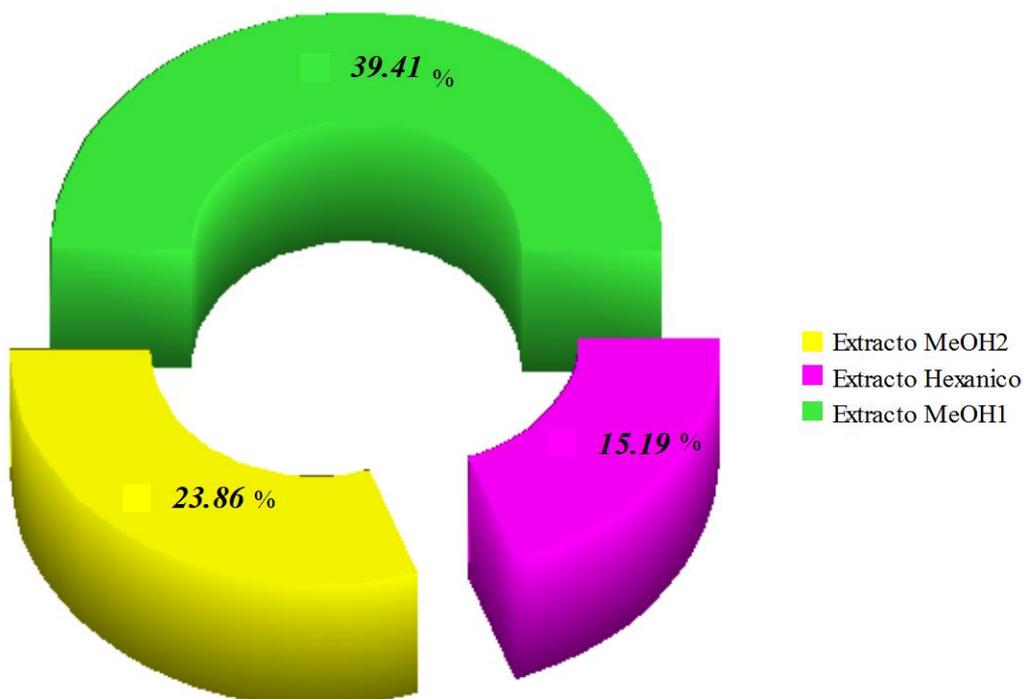


Figura 1: Rendimiento de los extractos obtenidos de *J. adstringens*.

Actividad antibacteriana

Evaluación Cualitativa

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antibacteriana de *J. adstringens* se muestran en el cuadro 4, en donde se observa que el extracto MeOH1 presentó un efecto antibacteriano al tener actividad en las 13 cepas. En la figura 2 se puede observar que la cepa bacteriana que presentó los halos de inhibición más grandes fue *S. lutea* (Gram positiva). El extracto hexánico no mostró actividad sobre ninguna de las cepas ensayadas.

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza de dos factores (ANOVA), se obtuvo una $F= 1.86$ y una $P= 0.05$, demostrando que no existen diferencias significativas entre la sensibilidad de las cepas bacterianas y el extracto MeOH1.

Cuadro 3: Actividad antibacteriana del extracto MeOH1 de *J. adstringens*

Halos de inhibición (mm) Extracto MeOH1			
Bacteria	<i>J. adstringens</i>		
<i>S. aureus</i>	8.67	±	0.57
<i>S. epidermidis</i>	10.00	±	0.57
<i>B. subtilis</i>	7.00	±	0.00
<i>S. lutea</i>	12.00	±	0.57
<i>V. cholerae No-01</i>	11.00	±	1.00
<i>V. cholerae agua</i>	9.00	±	0.57
<i>V. cholerae caso clínico</i>	8.00	±	0.00
<i>V. cholerae CDC V12</i>	10.00	±	0.00
<i>E. coli</i>	10.00	±	0.00
<i>E. agglomerans</i>	9.00	±	0.00
<i>E. aerogenes</i>	9.00	±	0.00
<i>S. typhi</i>	9.00	±	0.57
<i>Y. enterocolitica</i>	10.00	±	0.00

Todas las cepas bacterianas fueron sensibles al cloramfenicol (25 µg/disco).

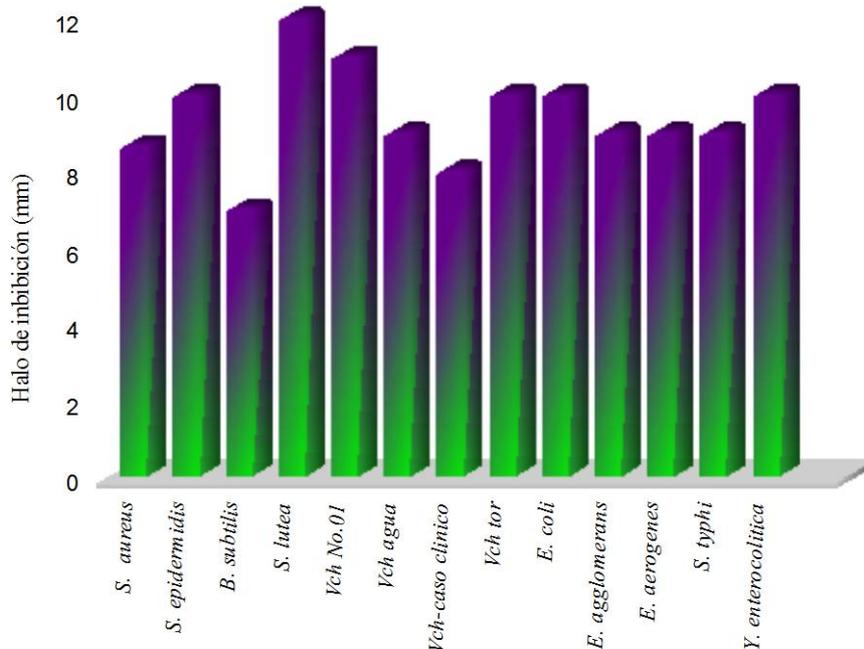


Figura 2: Actividad antibacteriana del extracto MeOH1 de *J. adstringens* sobre 13 cepas bacterianas.

Halos de inhibición en mm; valor promedio de 3 repeticiones; el extracto probado a una concentración de 2mg/10µL por sensibilizadores.

Evaluación cuantitativa

Los resultados obtenidos de la determinación de CMI y CBM (extractos MeOH1 y MeOH2) se muestran en el cuadro 5, en el cual se observa que para el extracto MeOH1 de *J. adstringens* las bacterias más sensibles fueron *S. aureus*, *S. epidermidis* y *V. cholerae caso clínico*, pues requieren bajas concentraciones para inhibir su crecimiento (CMI= 0.25; CBM= 0.50 mg/mL), teniendo así que las bacterias Gram positivas son más sensibles al requerir concentraciones menores para inhibir su crecimiento (CMI de 0.25 a 0.50 mg/mL; CBM de 0.50 a 0.75 mg/mL), mientras que las Gram negativas, requieren de concentraciones mayores (CMI de 0.25 a 1.50 mg/mL; CBM de 0.50 a 2.0 mg/mL).

Con respecto al extracto MeOH2 se puede apreciar que *V.cholerae* No-01 fue la cepa más sensible al requerir bajas concentraciones para inhibir su crecimiento (CMI= 0.125; CBM= 0.50 mg/mL). Al igual que el extracto MeOH1, el MeOH2 presentó en general mayor actividad sobre las cepas bacterianas Gram positivas (CMI de 0.25 a 0.75 mg/mL). Es notable que para ambos extractos (MeOH1 y MeOH2), *E. coli* fue la cepa menos sensible, pues se requieren concentraciones mayores a 2.0 mg/mL para alcanzar la CBM.

Cuadro 4: Determinación de CMI y CBM del extracto de *J. adstringens*.

Bacteria	Extracto MeOH1		Extracto MeOH2	
	CMI mg/mL	CBM mg/mL	CMI mg/mL	CBM mg/mL
	<i>J. adstringens</i>		<i>J. adstringens</i>	
<i>S.aureus</i>	0.25	0.50	0.25	0.75
<i>S.epidermidis</i>	0.25	0.50	0.50	0.75
<i>B. subtilis</i>	0.50	0.75	0.50	0.75
<i>V.cholerae No-01</i>	0.25	0.75	0.125	0.50
<i>V. cholerae agua</i>	0.50	0.75	0.50	0.75
<i>V. cholerae caso clínico</i>	0.25	0.50	0.50	0.75
<i>V. cholerae CDC V12</i>	1.50	2.00	0.25	0.75
<i>E. coli</i>	1.50	>2.00	2.00	>2.00
<i>E.agglomerans</i>	1.50	2.00	1.50	2.00
<i>E. aerogenes</i>	1.00	1.50	1.50	2.00
<i>S. typhi</i>	1.50	2.00	1.50	2.00
<i>Y. enterocolitica</i>	0.25	0.75	0.50	0.75

Efecto del extracto sobre la curva del crecimiento bacteriano.

El efecto del extracto MeOH2 sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* No-01 y *S. aureus* se muestran en las figuras 3 y 4. En las figuras se puede observar que a partir del segundo tiempo la población baja drásticamente para las tres concentraciones probadas ($\frac{1}{2}$ CMI, CMI y CBM) de la misma forma y se mantiene la actividad bacteriostática del extracto.

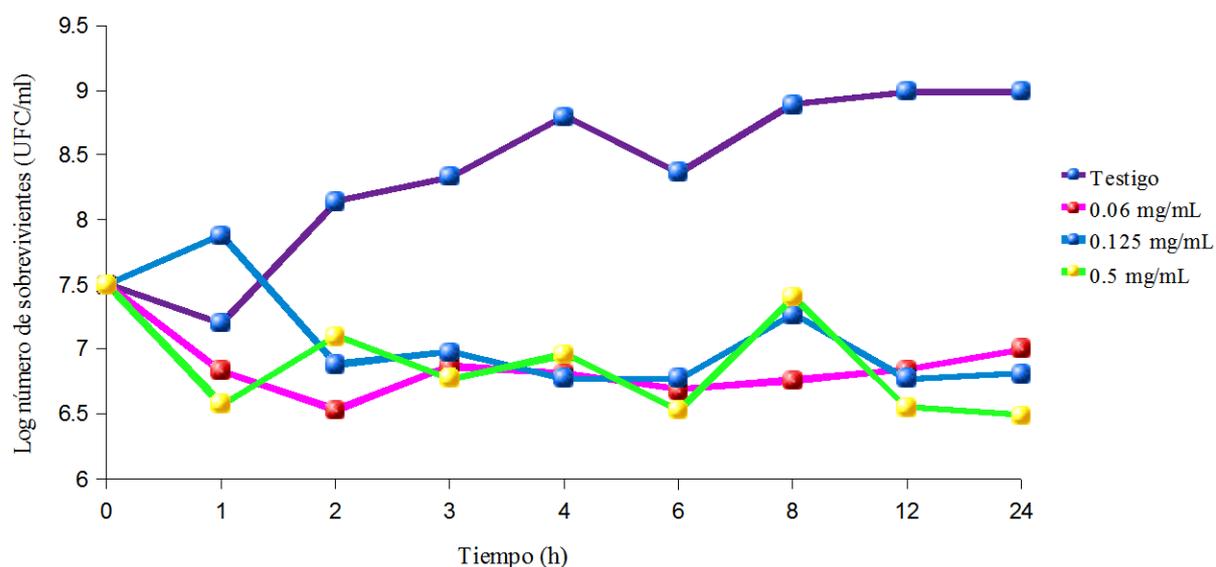


Figura 4: Efecto del extracto MeOH2 sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* No-01.

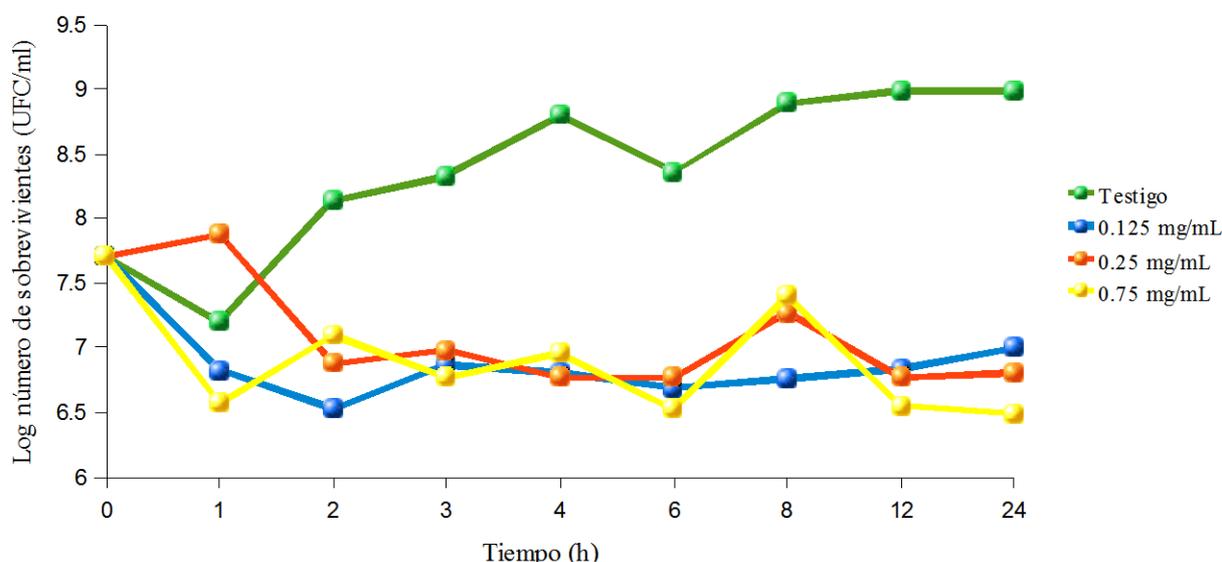


Figura 3: Efecto del extracto MeOH2 sobre la curva de crecimiento de *S. aureus*.

Fraccionamiento biodirigido.

En la cromatografía de columna abierta (fase estacionaria sílica gel), se obtuvieron en la columna A, 15 fracciones de las cuales solo 11 mostraron actividad antibacteriana sobre *S. aureus*, siendo la fracción 47 la que obtuvo el mayor halo de inhibición como se observa en la cuadro 6 y figura 5.

Cuadro 5: Rendimientos y halos de inhibición de las fracciones obtenidas en la columna A del extracto MeOH2 de *J. adstringens*.

Fase Móvil	Alícuota	Fracción	Rendimiento (gr)	Halo de Inhibición (mm)
100% Acetato de Etilo	1-2	1	0.01	10
	3-18	3	0.07	12
90% Acetato de Etilo 10% Metanol	19-24	19	0.02	12
80% Acetato de Etilo 20% Metanol	25-46	25	0.04	12
	47-65	47	0.09	16
	66-80	66	0.07	14
70% Acetato de Etilo 30% Metanol	81-104	81	0.03	10
	105-120	105	0.05	8
60% Acetato de Etilo 40% Metanol	121-153	121	0.06	8
50% Acetato de Etilo 50% Metanol	154-185	154	0.03	8
100% Metanol	186-216	186	0.03	12

S. aureus fue la cepa bacteriana que se empleó. El error estándar fue de 0 para todas las cepas bacterianas.

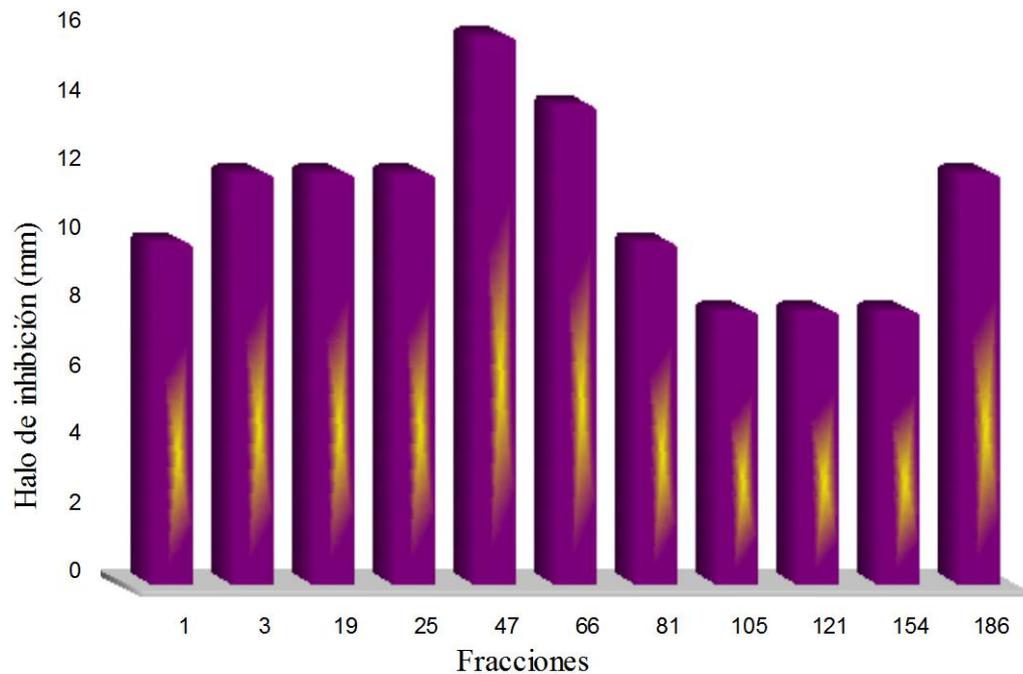


Figura 5: Actividad antibacteriana sobre *S. aureus* de las fracciones obtenidas en la columna A de la cromatografía en columna abierta con fase estacionaria sílica gel del extracto MeOH₂ de *J. adstringens*.

Sin embargo, en la columna B de la cromatografía del extracto MeOH₂ se obtuvieron 42, fracciones y de las cuales solo 17 fracciones presentaron actividad sobre la cepa bacteriana *V. cholerae* No-01, siendo la fracción 3 donde se observó el halo de inhibición de mayor diámetro (Cuadro 7 y Figura 6).

Cuadro 6: Rendimiento y halo de inhibición de las fracciones obtenidas de la columna B.

Fase Móvil	Alícuota	Fracción	Rendimiento (gr)	Halo de Inhibición (mm)
100% Acetato de Etilo	1	1	0.40	10
	2-3	2	0.35	12
	4-5	3	0.18	14
	6-7	4	0.16	13
90% Acetato de Etilo 10% Metanol	8	5	0.06	9
	9-10	6	0.07	8
	11	7	0.01	8
80% Acetato de Etilo 20% Metanol	12-13	8	0.77	8
	14	9	0.92	6
	15	10	0.45	6
	16-17	11	0.54	7
	18	12	0.89	11
	19	13	0.47	7
70% Acetato de Etilo 30% Metanol	20-21	14	0.60	9
	22-25	15	0.87	11
	26-27	16	0.63	6
	28-31	17	0.01	7

V. cholerae No-01 fue la cepa bacteriana empleada.

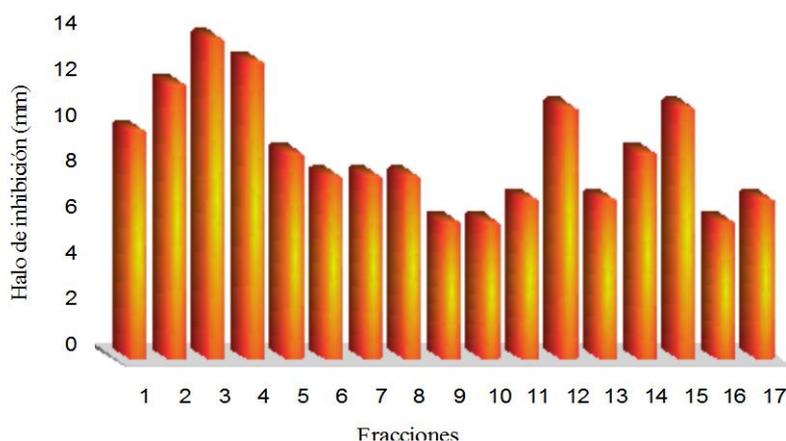


Figura 6: Actividad antibacteriana sobre *V. cholerae No- 01* de las fracciones obtenidas en la columna B de la cromatografía en columna abierta con fase estacionaria sílica gel del extracto MeOH2 de *J. adstringens*.

Con respecto a la determinación de CMI y CBM de la fracción de mayor halo (fracción 3) de la columna B, se puede observar en el cuadro 8 que las bacterias Gram-positivas fueron mas sensibles, pues requieren de bajas concentraciones para inhibir su crecimiento (CMI= 0.25 mg/mL; CBM= 0.5 mg/mL).Sin embargo, para las bacterias Gram-negativas se requieren concentraciones mayores (CMI de 0.25 a 2.0 mg/mL; CBM de 0.5 a □ 4.0 mg/mL).

Cuadro 7: Concentraciones mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) de la fracción 3 de la columna B de *J. adstringens*.

Bacteria	CMI mg/mL	CBM mg/mL
<i>S.aureus</i>	0.25	0.50
<i>S.epidermidis</i>	0.25	0.50
<i>B.subtilis</i>	0.25	0.50
<i>V. cholerae No-01</i>	0.25	0.50
<i>V. cholerae agua</i>	0.25	0.75
<i>V. cholerae caso clínico</i>	0.25	0.50
<i>V. cholerae CDCV12</i>	1.50	> 4.00
<i>E. coli</i>	2.00	> 4.00
<i>E. agglomerans</i>	2.00	> 4.00
<i>E. aerogenes</i>	2.00	> 4.00
<i>S. typhi</i>	1.00	2.00

En la figura 7 se presenta el cromatograma de la fracción 3 de la columna B, donde se observaron dos picos mayoritarios (*b* y *c*), los cuales tienen un tiempo de retención de 3.9 min. y 4.5 min. respectivamente, mostrando absorciones máximas en el compuesto *b* de 374 y 356 nm y para el compuesto *c* de 256 y 356 nm (Cuadro 9). Sin embargo, también se puede observar que la fracción no es totalmente pura debido a la presencia de otros compuestos.

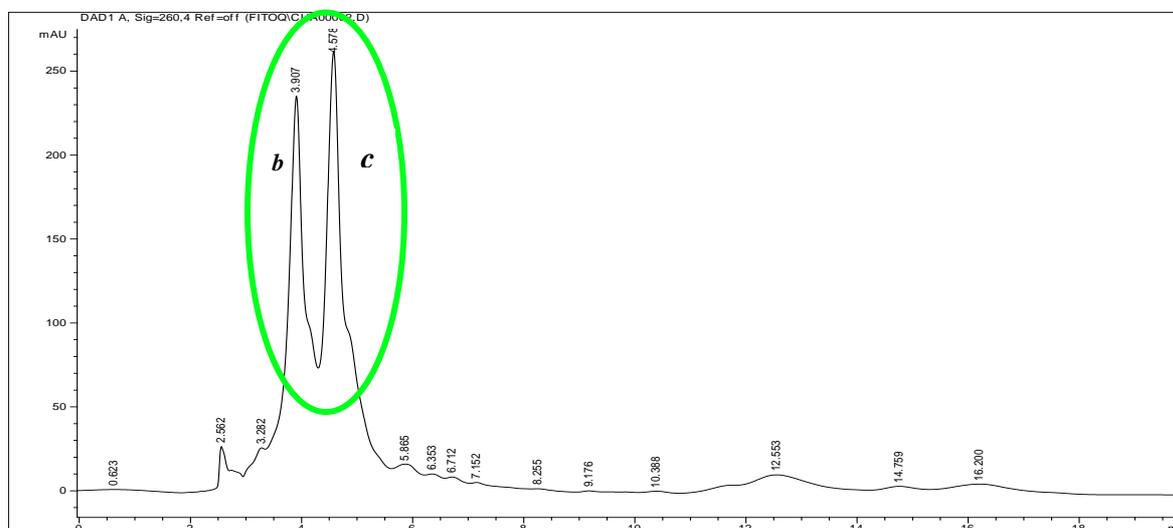


Figura 7: Cromatograma HPLC de la fracción 3 de la columna B del extracto MeOH2 de *J. adstringens*.

En el caso de la fracción 9 de la columna B (figura 8), el pico de mayor abundancia fue el *f* el cual presentó una absorción máxima de 237 y 292 nm, con un tiempo de retención de 6.0 min. permitiendo observar que la fracción 9 tiene una menor pureza en comparación a la fracción 3.

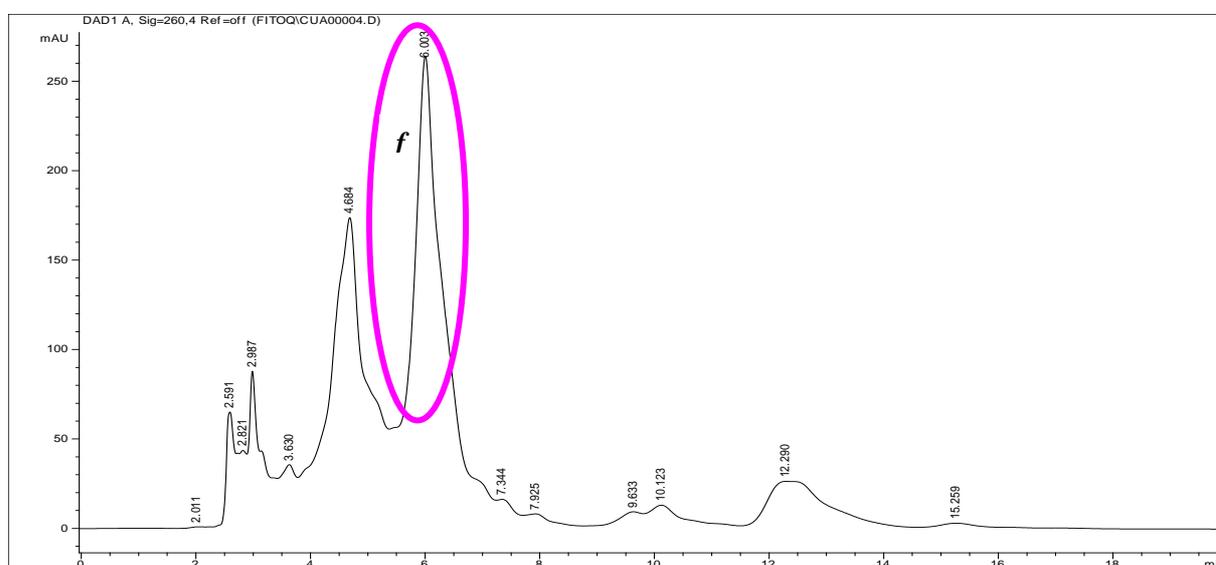


Figura 8: Cromatograma HPLC de la fracción 9 de la columna B del extracto MeOH2 de *J. adstringens*.

Cuadro 8: Tiempo de retención y máxima absorción bajo luz UV de las fracciones activas.

No. Fracción	No. Compuestos	Tiempo de retención (min)	UV λ_{\max} (nm)
3	<i>a</i>	2.56	236-280
	<i>b</i>	3.90	374-356
	<i>c</i>	4.58	256-356
	<i>d</i>	5.87	236-286
	<i>e</i>	6.38	236-346
	<i>f</i>	6.74	236-286-312
	<i>g</i>	7.18	236-272
	<i>h</i>	10.35	236-286
	<i>i</i>	12.56	240-286-312
	<i>j</i>	14.72	238-288-312
	<i>k</i>	16.18	236-270-288-364
9	<i>a</i>	2.60	236-272
	<i>b</i>	2.98	270
	<i>c</i>	3.62	284
	<i>d</i>	4.68	237-292
	<i>f</i>	6.00	237-294
	<i>g</i>	7.37	236-288
	<i>h</i>	7.92	236-286
	<i>i</i>	7.93	258-266-358
	<i>j</i>	10.10	264-364
	<i>k</i>	12.14	253-364
	<i>l</i>	15.23	250-366

Actividad antifúngica

Evaluación cualitativa

Los datos obtenidos en el bioensayo cualitativo demostraron que tanto el extracto MeOH1 como el MeOH2 de la corteza de *J. adstringens* presentaron actividad antifúngica únicamente sobre *T. mentagrophytes* (Cuadro 10). El extracto hexánico no mostró actividad sobre ninguna cepa fúngica ensayada.

Cuadro 9: Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de *J. adstringens*.

Corteza	Extracto	Cepas Fúngicas				
		An	Fm	Fs	Rs	Tm
<i>J. adstringens</i>	MeOH1	x	x	x	x	✓
	MeOH2	x	x	x	x	✓
	Hexánico	x	x	x	x	x

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

Evaluación cuantitativa

Los resultados obtenidos sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos MeOH1 y MeOH2 de *J. adstringens* sobre *T. mentagrophytes* se observan en el cuadro 11. La cepa presenta un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial en la concentración de 2.0 mg/mL, sin embargo para alcanzar el 100% de inhibición es necesaria una concentración superior a 2.0 mg/mL.

Cuadro 10: Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los extractos MeOH1 y MeOH2 de *J. adstringens* sobre *T. mentagrophytes*.

Extractos <i>J. adstringens</i>		
Concentración	MeOH 1	MeOH 2
(mg/ mL)	% Inhibición	
0.125	6.66 ± 0.00	6.66 ± 0.00
0.25	42.22 ± 0.57	6.66 ± 0.00
0.50	11.11 ± 0.57	6.66 ± 0.00
0.75	15.55 ± 1.52	22.22 ± 0.57
1.00	15.55 ± 0.57	44.44 ± 0.57
1.50	44.44 ± 0.57	73.33 ± 0.00
2.00	73.33 ± 0.00	73.33 ± 0.00

Respecto al porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *Trichophyton mentagrophytes*, en la figura 9 se puede observar el cálculo a partir de la interpolación en la ecuación de la concentración letal media (CL₅₀) para el extracto MeOH1 es de 2.00 mg/mL y para MeOH2 es de 1.50 mg/mL, alcanzando a inhibir su crecimiento en un 73.33% en ambos casos.

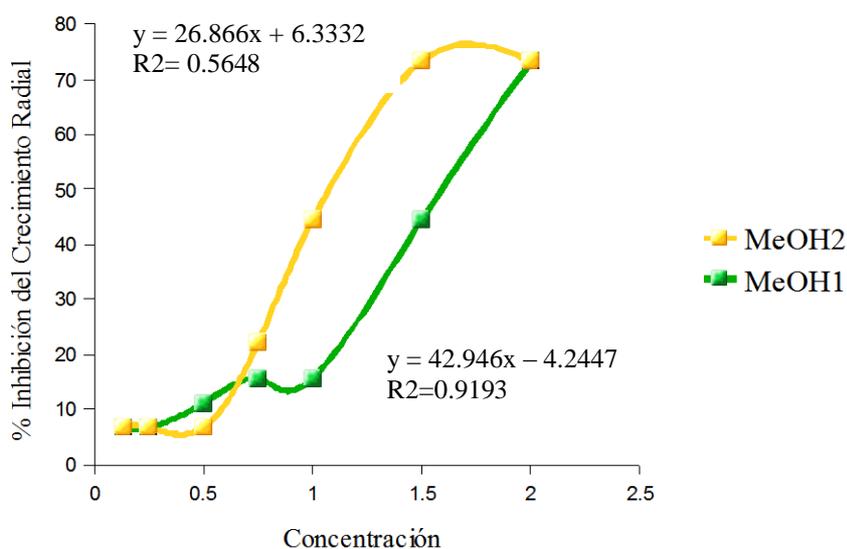


Figura 9: Determinación de CL₅₀ (concentración letal media) para los extractos MeOH1 y MeOH2 de *J. adstringens* sobre *T. mentagrophytes*.

Toxicidad general

Los resultados sobre la toxicidad del extracto MeOH1 sobre la larva nauplio II de *Artemia salina*, se muestran en el cuadro 12, en el cual se observa que el extracto MeOH1 es moderadamente tóxico al tener una CL₅₀ de 528.59 ppm.

Cuadro 11: Porcentaje de muerte de *Artemia salina* de extracto MeOH1 de *J. Adstringens*.

Extracto	
Concentración	<i>J. adstringens</i>
(ppm)	% de muerte
1000	100
100	0
10	0

ppm = partes por millón

Actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante sobre el extracto MeOH1 de *J. adstringens*, presentó una actividad antioxidante adecuada al obtener una CI₅₀ de 5.73 µg/mL, reduciendo el DPPH (2-2- difenil-1- picrilhidracilo). Como control positivo se utilizó la quercetina la cual mostró una CI₅₀ de 4.6 µg/mL (Apéndice 8).

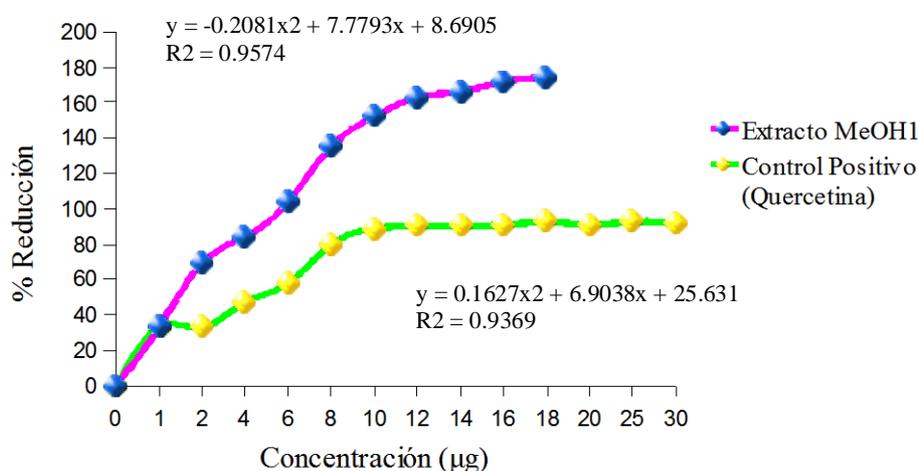


Figura 10: Comparación del porcentaje de reducción del extracto MeOH1 y el control positivo (Quercetina).

DISCUSIÓN.

La corteza de *J. adstringens* se comercializa a lo largo de la República Mexicana como principal producto herbolario para aliviar afecciones gastrointestinales, úlceras gástricas y ciertas lesiones cutáneas, originadas principalmente por bacterias y hongos (Canales, 2005; Argueta et al., 1994). Por tal motivo los resultados obtenidos en esta investigación confirman que la corteza de *J. adstringens* inhiben el crecimiento tanto de bacterias como de hongos de importancia médica, aunado a esto mostró una relevante actividad antioxidante y una toxicidad general media.

En lo referente al rendimiento de los extractos obtenidos de *J. adstringens*, de la partición realizada, el extracto MeOH₂ presentó el mayor rendimiento con un 23.86%, mientras que el extracto hexánico presentó un menor rendimiento con un 15.19% (Cuadro 3), lo que muestra que la corteza presenta en mayor cantidad compuestos de naturaleza polar como por ejemplo: ácidos masticadienónico y 3-alfa-hidroximasticadienónico entre otras (Olivera. et. al., 1999). Revelando de esta forma que los resultados son lógicos pues las cortezas están formadas por taninos, ligninas, triterpenos y polisacáridos principalmente. Sin embargo, la diferencia en el rendimiento de los extractos obtenidos se atribuye posiblemente a la acumulación de metabolitos secundarios los cuales sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra la depredación por microorganismos, insectos y herbívoros (Fernández, 1999).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la actividad antibacteriana, el extracto MeOH₁ de la corteza fue activo tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas siendo *S.lutea* la que mostró los halos de inhibición mas grandes (Cuadro 4 y Figura 2) lo anterior coincide con Canales y colaboradores (2005) quienes reportan que la infusión de la corteza es utilizada para el tratamiento de enfermedades de posible origen bacteriano como dolor de riñones, gastritis y heridas infectadas (Canales et al., 2005 y 2006), de esta manera *S.aureus* y *S.epidermidis* (infecciones de piel) y *E.coli* (vias urinarias), fueron sensibles al extracto MeOH₁. Con estos resultados se valida el uso etnomedicinal que se le da a la corteza de *J. adstringens* en San Rafael Coxcatlán.

Los valores obtenidos de la CMI y CBM mostraron que para ambos extractos (MeOH1 y MeOH2) las bacterias Gram positivas resultaron ser más sensibles, ya que se necesitó de concentraciones menores para inhibir su crecimiento (MeOH1, MIC de 0.25 a 0.50 mg/mL y CBM de 0.50 a 0.75 mg/mL; MeOH2, MIC de 0.25 a 0.50 mg/mL y CMB de 0.75 mg/mL). Probablemente esto se deba a la composición estructural de las bacterias y a la susceptibilidad de cada cepa al extracto probado, ya que el péptido glucano en el caso de las bacterias Gram positivas se encuentran inmersas en una matriz compuesta de ácidos teicoicos, teicurónicos y lipoteicos; confiriéndole a la pared celular una carga negativa neta, que es necesaria para que la célula pueda asimilar cationes divalentes, esta característica la hace más sensible a los compuestos polares, a diferencia de las Gram negativas en las que la membrana es más resistente a los disolventes orgánicos y menos permeable a las moléculas de carácter hidrofóbico (Cimanga et al., 2002; Gros et al., 1985; Nikaido et al., 1979).

Sin embargo, en ambos casos la cepa de *E. coli*, es la menos sensible al requerir concentraciones mayores que van de 1.50 a concentraciones por arriba de >2.00 mg/mL para inhibir su crecimiento (Cuadro 5). Esto probablemente se debe a que en la actualidad el consumo excesivo de los antibióticos en el hombre ha originado un estado de resistencia a los agentes antimicrobianos, que actúan sobre la inhibición de las funciones ribosomales, la inhibición a la síntesis proteica y la inhibición de la síntesis de la pared celular. Por lo que la resistencia de *E. coli* ha aumentado en los últimos años, siendo esta resistente a la ampicilina, aminoglucósidos, tetraciclinas, eritromicina, amoxicilina y cotrimoxazol, esto se debe a los cambios genotípicos adquiridos que persisten durante el cultivo y ausencia del fármaco (Davis et al., 1996).

Concerniente a la curva de crecimiento bacteriano de *S. aureus* y *V.cholerae* No-01 con el extracto MeOH2, mostró que los agentes antimicrobianos tuvieron un efecto bacteriostático, es decir, inhiben el crecimiento y la proliferación del microorganismo, siendo estas incapaces de reproducirse y manteniéndose estables durante los 9 tiempos (24 horas), el efecto bacteriostático es extremadamente benéfico al permitir que las defensas normales del hospedero destruyan al microorganismo (Davis et al., 1996).

Con respecto a la determinación de MIC y CBM de la fracción más activa (fracción 3) se pudo observar que las bacterias Gram-positivas fueron más sensibles, pues requieren de bajas concentraciones para inhibir su crecimiento (CMI=0.25 mg/mL; CBM= 0.50 mg/mL) (Cuadro 8), esto se debe a que el mecanismo de acción de los compuestos presentes en la fracción 3 podrían estar relacionados con alteraciones de ADN, síntesis de proteínas e inhibidores en la transcripción o traducción (Calderón, 1997; Ávila, 1996), existiendo similitudes entre los extractos (MeOH1 y MeOH2) y la fracción activa (fracción 3) sobre la susceptibilidad del grupo bacteriano. Por lo que se valida el uso medicinal de esta corteza para aliviar enfermedades de posible origen bacteriano; sin embargo, para las bacterias Gram-negativas se requieren concentraciones mayores (CMI de 0.25 a 1.00 mg/mL; CBM de 0.50 a > 4.00 mg/mL) (Cuadro 8). Esto quizás se deba a que los extractos y la fracción interactúan con diversos compuestos, formando así un sinergismo (“trabajar juntos”) (Katzung y Trevor, 1997), lo que permite una mayor actividad antibacteriana a menor concentración.

Para el fraccionamiento de los compuestos activos, las fracciones más activas y con mayor rendimiento (fracción 3 y 9) fueron sometidas a una cromatografía de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC). En general los compuestos son muy parecidos ya que la longitud de onda entre la que absorben es de 237 a 356 nm esto posiblemente nos indica la presencia de algunos triterpenos (Figura 7 y 8). Lo anterior coincide con Oviedo et al, 2004 quien purificó los compuestos : ácido masticadienónico y ácido 3-alfa-hidroxicasticadienónico, triterpenos que absorben a una longitud de onda de 220 nm y con un tiempo de retención de 24 minutos. Sin embargo, el rango puede variar por efecto de los solventes utilizados en el aislamiento del compuesto (Olsen, 2003).

En cuanto a la actividad antifúngica, se encontró que los extractos MeOH1 y MeOH2, fueron activos únicamente en un hongo dermatofito (*T. mentagrophytes*); estos resultados son interesantes y de gran relevancia ya que *T. mentagrophytes* es causante del pie de atleta (Myrvin y Weiser, 1991) y utilizando concentraciones mayores a 2.00 mg/mL de los extractos antes mencionados se puede alcanzar el 100% de inhibición.

Al determinar la concentración letal media (CL₅₀) para *T. mentagrophytes* utilizando los extractos MeOH1 y MeOH2 de *J. adstringens*, se obtuvo que para inhibir el 50% del crecimiento radial de dicho hongo se requieren concentraciones mayores del extracto MeOH1 de 2.00 mg/mL y para el extracto MeOH2 se requieren concentraciones de 1.50 mg/mL del extracto de *J. adstringens*.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la toxicidad general del extracto MeOH1 de *J. adstringens* se encontró que de acuerdo con Padmaja et al. (2002), el extracto MeOH1 de *J. adstringens* es medianamente tóxico al tener una LC₅₀= 528.5975 µg/mL. Este es el primer dato sobre la toxicidad de la corteza de *J. adstringens*.

La evaluación de la actividad antioxidante presentó una actividad adecuada con respecto a la quercetina (control positivo) quien requiere una CI₅₀ de 4.6 µg/mL. Esta actividad antioxidante adecuada del extracto se debe a que al reducir en un 50% al compuesto DPPH se requieren de 5.73 µg/mL. Por lo que la actividad antioxidante tiene un gran impacto, ya que estudios han mostrado que la ingesta de productos con elevada acción antioxidante está vinculada con una baja incidencia de enfermedades vinculadas con el estrés oxidativo (Okusa et al., 2007).

Resultó de gran importancia evaluar la actividad antibacteriana, antifúngica, antioxidante y toxicidad general del extracto de *J. adstringens*. Lo antes mencionado justifica y valida totalmente el empleo de la corteza dentro de la medicina tradicional, ya que al presentar compuestos con actividad antimicrobiana lo hace una planta adecuada para combatir diferentes procesos infecciosos causados principalmente por bacterias y hongos.

CONCLUSIÓN.

- Los extractos MeOH1 y MeOH2 de la corteza de *J. adstringens* (Cuachalalate) presentaron actividad antibacteriana.
- Las bacterias de tipo Gram positivas resultaron ser las más sensibles en comparación a las de tipo Gram negativo.
- Los extractos MeOH1 y MeOH2 de la corteza de *J. adstringens* presentaron actividad antifúngica en *Trichophyton mentagrophytes*.
- El extracto MeOH2 tiene un efecto bacteriostático.
- El extracto MeOH1 de *J. adstringens* es medianamente tóxico.
- El presente trabajo valida el uso de la corteza de *J. adstringens* dentro de la medicina tradicional de San Rafael Coxcatlán, Puebla para combatir infecciones de origen bacteriano, por lo tanto su uso etnobotánico coincide con los resultados obtenidos en esta investigación.

APÉNDICE 1

Descripción botánica de la planta estudiada.

Juliania adstringens (Schldl.) Schldl

Nombre común:

Chalalate, coachalalate, cuachalala, volador. Distrito Federal: cuachalatl (náhuatl). Michoacán: maceran, matixeran, pacueco. Oaxaca: cuachinala (Argueta y Cano, 1994); Puebla: cuachalalate, cuachalala (Canales, 2005)

Botánica y ecología:

Árbol de 10 metros de altura con el tronco torcido de corteza moreno grisáceo o gris plomizo con grandes escamas, hojas agrupadas de tres a cinco en las puntas de las ramas en el haz son verde opaco y en el envés son verde grisáceo, las flores se pueden encontrar solitarias o en ramilletes, madera, resinosa, dioico. Los frutos son nueces abultadas que están en ramas de color verde pálido (Figura 10.). De origen desconocido, habita en clima cálido, semicálido, y templado entre 100 y 3000 msnm, crece en zonas perturbadas de bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, de matorral xerófilo, bosque espinoso, mesófilo de montaña y pino-encino. Ampliamente distribuida en el Estado de México, Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Distrito Federal, Guerrero, Oaxaca y Puebla (Olivera et al., 1999).

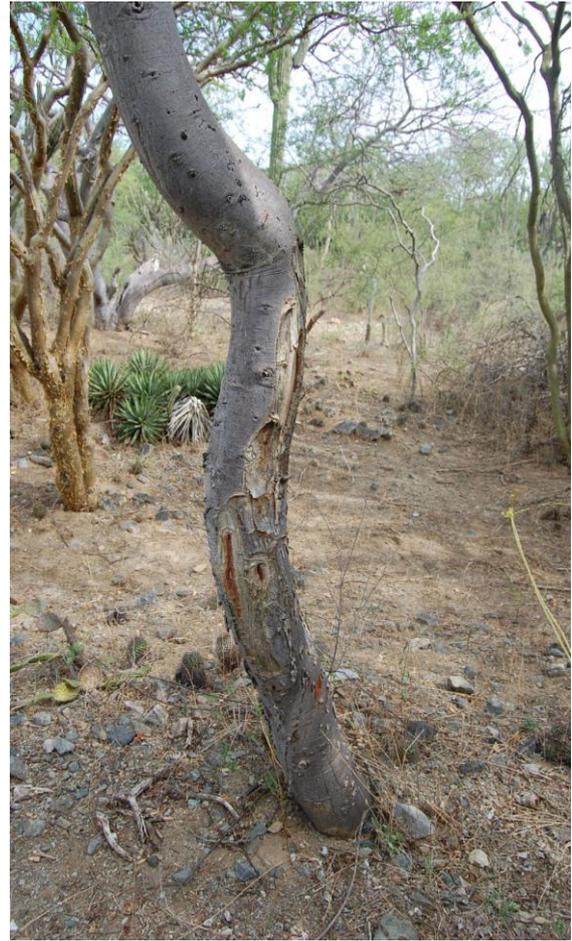


Figura 1: Árbol de *Juliania adstringens*.

Etnobotánica y antropología:

El cuachalalate, es una planta de uso muy antiguo de la cual se ha confirmado una actividad antitumoral y anticancerígena en cierto tipo de tumores, por lo que se recomienda su uso medicinal (Argueta y Cano, 1994).

En varios estados de la República, se menciona el empleo, del cuachalalate, principalmente del cocimiento, para tratar úlceras, cáncer de estómago, gastritis y ciertas lesiones cutáneas. Para las úlceras también se remoja la corteza hasta que el agua tome color para administrarla como agua de uso. Para las heridas su cocimiento es normal, se pone en polvo sobre ellas, o se macera en agua y con este se lavan. Los granos se curan mediante la ingestión del cocimiento o la aplicación de la goma blanca o la resina de la corteza, al igual que en llagas. Granos, heridas y llagas, en el hombre o animales, se lavan una vez al día con el agua donde se ha hervido la “cáscara”. Así mismo, se utiliza en golpes o postemas, mordeduras o piquetes de animales venenosos y como cicatrizante (Olivera et al., 1999).

También se utiliza para lavados vaginales cuando se presentan infecciones en la vagina, fiebre puerperal, flujo de mujeres, frío, inflamación, infección o caída de la matriz y de ovarios (Argueta y Cano, 1994).

Otras aplicaciones medicinales de las que se tienen noticia son: fiebres intermitentes, paludismo, caída de cabello, afecciones respiratorias, manchas en la piel, gangrena y como antidiabético (Rzedowski, 1978).

Historia:

En el siglo XVI, Francisco Hernández comenta: “la corteza es fría y secante, resuelve los tumores machacada y aplicada”. Durante el siglo XX en la obra de Maximino Martínez en donde la registra como: anticancerosa, antipalúdico, astringente y para la fiebre tifoidea; y posteriormente, la Sociedad Farmacéutica de México, la registra como astringente (Argueta y Cano, 1994).

APÉNDICE 2

Área de Colecta de *Juliania adstringens*.

La corteza de *J. adstringens* fue colectada en la localidad de San Rafael, municipio de Coxcatlán, se localiza al sureste de Tehuacán, en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m. (Figura 11).

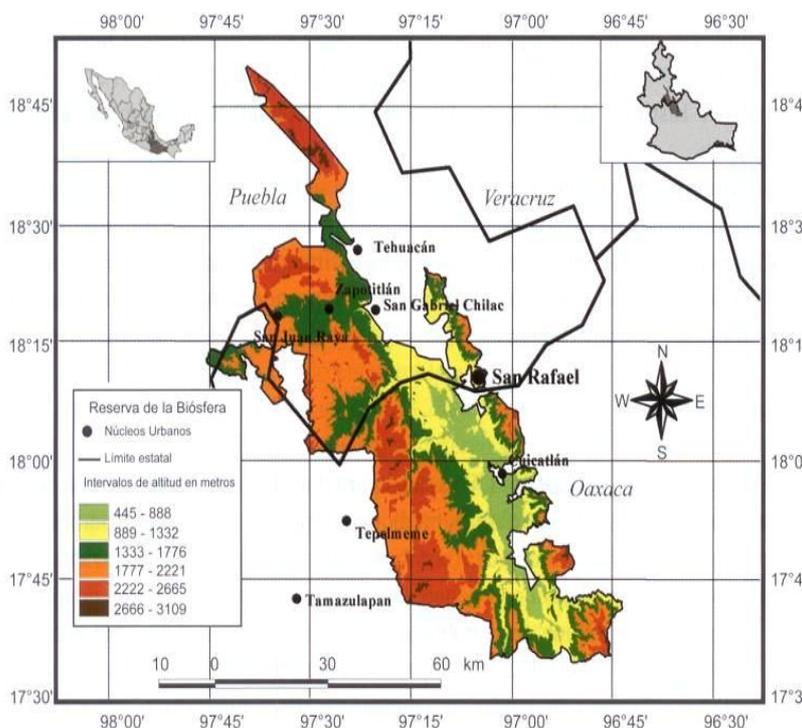


Figura 2: Ubicación geográfica del poblado de San Rafael.

Clima

El clima es de tipo Bs (h') w'' (w) eg de acuerdo con la clasificación de Koeppen, 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 registrados en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación casi duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

Hidrografía

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

Edafología

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

Vegetación

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

Fernández (1999), reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael: Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cordones). Chiotillal de *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber) Rose, en el nivel próximo al cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal de esta región, con una alta densidad arbustiva. Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* (Ramírez), *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouquieria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fruticosa*, 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 pauciflora* (Brandege), *Senna wisliseni*, *Mimosa luisiana* 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).

La población.

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

APENDICE 3

Técnica de Maceración

(Domínguez, 1973).

Se tomó la corteza seca y molida de la planta, se le agregó un solvente de polaridad alta, en este caso se utilizó metanol. Una vez obtenido el extracto, se destiló el exceso de solvente a presión reducida. El extracto metanólico obtenido se colocó en charolas de vidrio para completar la evaporación del solvente, finalmente se calculó el rendimiento total por diferencia de peso (Domínguez, 1973). El extracto MeOH1 se sometió a una partición con hexanos, de esta manera se obtuvo el extracto MeOH2.

APÉNDICE 4

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

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

Medio:

Para los ensayos con las cepas bacterianas se utilizó como medio de cultivo estándar el agar Müeller-Hinton (Bioxon 110-1), ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos. Para el caso de las levaduras se utilizó agar PDA. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor difusión del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

INÓCULO

Bacterias:

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

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

Si la suspensión de organismos es más turbia que el estándar, se añade solución salina al 0.9 % hasta igualarlas. Una vez logrado esto, se sumerge un segundo hisopo de poliéster, 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 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 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 Müeller-Hinton está lista para la aplicación de las muestras a las que se les evaluará su actividad antibacteriana.

Hongos:

Se tomó con una pipeta pasteur un botón de 5mm de diámetro del micelio del hongo. Se depositó el botón del micelio en el centro de una caja de petri con agar PDA. Una vez que el micelio ha crecido alrededor de 10 mm de diámetro, se colocaron los sensidiscos. El cultivo se inocula a 23°C. Se determinó si hay actividad cuando el micelio no crece mas allá de la zona de difusión de la muestra a probar, formando un medio círculo alrededor del sensidiscos.

Aplicación de sustancias:

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

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

Preparación de las muestras:

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

Controles negativos:

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

Control positivo:

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

Incubación:

Bacterias:

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

Hongos:

Los hongos fueron cultivados en cajas de petri con 20 mL de agar PDA, se incubaron a una temperatura de 23°C sin mayor tensión de CO₂.

APÉNDICE 5

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

Método de macrodilución en agar

(Koneman, 1985).

Preparación de reactivos y diluciones:

Las disoluciones antimicrobianas de trabajo se prepararon diluyendo la droga en el agar de Müeller-Hinton según las concentraciones deseadas (0.125, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00 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 colocó la cantidad necesaria del extracto obteniendo la concentración requerida. Después de mezclar bien el contenido se transfirió a una caja de petri.

Inoculación e incubación de los tubos:

Se preparó un inóculo el cual contenía 10⁶ UFC/mL (unidades formadoras de colonia/mL) ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de turbidez (se utilizó el estándar 0.5 de McFarland y diluyendo luego 1:200 en caldo). Se añadió a cada tubo, 1 mL del inóculo ajustado. Incubar los tubos a 35 °C durante 16 a 20 horas. No se recomienda la incubación en atmósfera de CO₂ a menos que sea esencial para el desarrollo del microorganismo.

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 incapaz de inhibir por completo el desarrollo a esa concentración.

Determinación de la concentración bactericida mínima

(Finegold y Jo Baron, 1989)

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

Microtécnica de dilución en caldo.

(Koneman, 1985).

La microtécnica de dilución tiene el mismo principio que el método de dilución en caldo, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica. Las placas que se utilizaron son de 96 concavidades.

La microplaca se preparó colocando 50 µL de caldo Müller - Hinton (Bioxon 260) con la concentración del extracto probado en las concavidades apropiadas. Se deja 24 horas para que se evapore el solvente en el que se disolvió el extracto.

Se preparó una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 mL de caldo Mueller-Hinton (Bioxon 260) y se incubó a 35°C durante 18 a 24 horas (produciendo una concentración bacteriana de aproximadamente 10^8 organismos) y se diluyeron en caldo Muller-Hinton para obtener una concentración aproximada de 10^5 organismos/mL. En cada una de las 96 concavidades se colocaron 50 µL de esta suspensión diluida.

Una vez cargada la placa con la suspensión bacteriana, se cubre con una tapa para evitar el desecamiento durante la incubación. Todas las placas se incubaron a 35°C durante 18 a 24 horas. Como control negativo se utilizó el solvente del extracto.

Después del tiempo de incubación se añade a cada concavidad 50 µL de una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada. La placa se incubó otros 30 minutos. En las concavidades donde se desarrolle el organismo, el colorante es reducido a color rojo visible, produciendo un botón rojo en el fondo de la concavidad. Donde no hay desarrollo, la solución permanece clara.

APENDICE 6.

Efecto del extracto sobre la curva de crecimiento bacteriano.

(Ávila, 1996)

Se preparó un tubo para cada extracto y se muestreó a partir del tiempo cero y en intervalos de una hora durante los primeros cuatro tiempos, después 2 muestreos cada dos horas, un muestreo a las 12 horas y finalmente a las 24 horas. Se preparó y rotuló un tubo sin antídoto como testigo. Se preparó el inóculo con aproximadamente 1×10^8 bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Müeller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación).

Se inoculó con ayuda de una micropipeta 100 µL de la suspensión de bacterias (1×10^8 UFC/mL) en los tubos que contendrán los extractos, estos tendrán la concentración de CMI y sus múltiplos medios; esto es, la mitad del CMI y CBM. La concentración final es de aproximadamente 1×10^5 bacterias/mL de caldo en cada tubo. Se incubará en una estufa a 35°C sin presión de CO₂.

Se llevo a cabo la toma de muestras (50 µL) a los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 y 24 horas de cada una de los tubos preparados.

APÉNDICE 7

Método cualitativo de inhibición del crecimiento radial

(Wang y Bun, 2002)

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas petri (100 X 15 mm) que contengan 20 mL de agar de papa dextrosa, en el cual se inocula un botón de 5 mm de diámetro del micelio. Después que el micelio se ha desarrollado hasta 10 mm, se colocan discos previamente impregnados con el compuesto activo, la preparación de los discos es igual a la técnica de difusión en agar. Si el primer ensayo es con un extracto crudo, se recomienda usar concentraciones grandes de activo (2.00 mg por disco). Los discos se colocan a una distancia de 30 mm del límite micelal.

Incubación:

Las placas son incubadas a 23 °C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

Controles negativos

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

Controles positivos

Se evaluó la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos de 0.007 mg/disco de Ketoconazol.

Interpretación de resultados

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

Método cuantitativo de inhibición del crecimiento radial

(Wang y Bun, 2002).

El ensayo contra hongos filamentosos se lleva a cabo en cajas petri (60 X 15 mm), que contengan 6 ml de agar papa dextrosa, con las siguientes concentraciones del extracto a probar 2.00, 1.50, 1.0, 0.75, 0.50, 0.25, 0.125 mg/mL. posteriormente se coloca un botón de 5mm de diámetro de micelio en el centro de la caja.

Incubación

Las placas son incubadas a 23 °C durante 72 horas hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

Interpretación de resultados.

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

APÉNDICE 8

Actividad Antioxidante

(Murillo, 2006).

La actividad antioxidante se evaluó midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-30 ppm), por medio de espectrometría UV-VIS. En una placa de ELISA se adicionarán 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (2-30 ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionaron 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final fue de 100 µg/mL; inmediatamente se protege de la luz y se mantendrá en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA SLT Spetra; el control negativo fue aplicando 200 µL de metanol en los pozos y como control positivo se usa quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Interpretación de Resultados

Los resultados fueron reportados obteniendo el porcentaje de reducción y se calculó 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).

REFERENCIAS

1. 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 6,13-14 pp.
2. Aguilar, A. y Zorrilla, C. 1985. Plantas tóxicas de México, IMSS. 1a. Ed.42-45 pp.
3. Argueta, V. A. y Cano, A. J. 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México, D.F. 1193 pp.
4. Ávila, A. J. G. 1996. Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional Purepecha. Tesis de Maestría. UNAM. Cuautitlán. 104 pp.
5. Calderón, J. E. 1997. Aplicación clínica de antibióticos y quimioterapeúticos. Séptima Edición. Ed. Méndez editores. México. 7-47 pp.
6. Canales, M. M. M. 2005. Base Fitoquímica del Uso Tradicional de Plantas para el Tratamiento de Enfermedades de Posible Origen Bacteriano en San Rafael Coxcatlán, Puebla. Tesis de Doctorado, FES-Iztacala. UNAM. México. D.F.145 pp.
7. Canales, M. M. M., Hernández, D. T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, 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.
8. Canales, M. M. M., Hernández, D. T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A. Y Lira, R. 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. Acta Botanica Mexicana 75: 21-43.

9. Carrasco. C. A.L. y Rivera. A. E., 2009. Actividad antibacteriana de compuestos aislados de la corteza de cuachalalate (*Juliania adstringens*) sobre bacterias patógenas de la cavidad oral. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM. México. D.F. 47-66 pp.
10. Castro, R. A. E. 1988. Estudio comparativo del conocimiento sobre plantas medicinales utilizadas por dos grupos étnicos del municipio de Pahuatlán, Puebla. Tesis de Licenciatura, FES-Iztacala. UNAM. México. D.F. 6-9 pp.
11. Chart, H. 2002. *Escherichia*. Greenwood, D., Slack, C. B. R y Peutherer F. J. En: A guide to microbial infections: medical microbiology pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control. Edición 16°. Editorial. Churchill Livingstone. 265-267 pp.
12. 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 from some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*. 79: 213-220.
13. Coley, P.D., Bryant, J. P., y Chaplin, F. S. 1985. Resources availability and plant antiherbivore. *Science* 230: 985-998.
14. Davis, B.D, Dulbecco, R, Eisen, H.N y Ginsberg, H.S. 1996. Tratado de microbiología (4ª edición). Editorial Masson, S.A. Barcelona. 1559 pp.
15. Domínguez. A. X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Primera edición. Editorial Limusa. México. D.F. 3-17 pp.
16. Fernández, B. Ma. N. 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis de maestría. UNAM. 98 pp.

17. Finegold, S. M. y Jo. Baron, E. 1989. Métodos para evaluar la efectividad antimicrobiana. En diagnóstico Microbiológico. 7° edición. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 879 pp.
18. Fleurentin, J. y Plelt, J. 1981. Las plantas Medicinales. Mundo Científico 10 (105): 926-934.
19. Foster, T. J. 2000. *Staphylococcus*. En: Samuel Baron. Medical microbiology. Seccion I bacteriology. Capítulo 12. Cuarta edición. Graduate school of biomedical sciences. University of Texas medical Branch. USA.
20. García, G. 1981. Plantas medicinales de la vertiente sur de La Sierra de Pachuca, Hidalgo. Tesis de Licenciatura, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México. D.F. 188 pp.
21. González, E. E., Delgado, N. 1962. Phytochemical investigation of *Amphypteygium adstringens*. Journal Pharmacology Science 51: 706-790.
22. González, E. E., Mckenna, G., Delgado, J. 1962. Anticancer Activity of the *Amphypteygium adstringens*. Journal Pharmacology Science 51: 901-905.
23. Gros, G. E., Pomilio, A. Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría general de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico. USA. Washington. 147 pp.
24. Harborne, J. B. 1973. Phytochemical Methods. Ed. Chapman and Hall. USA. 40 pp.
25. Harbone, J. B. 1988, Introduction to ecological biochemistry, 3^{ra} edition, Academic Press Harcourt Brace Jovanovich, publications London. 185 pp.
26. Katzung, G. B. y Trevor. J. A. 1997. Farmacología: auto evaluación y repaso. 2° edición. Editorial. El manual moderno. México. México. 851 pp.

27. Koneman, W. E. 1985. Diagnostico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. D.F. 380-402 pp.
28. Koneman, W. E. 1996. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. D.F. 439 pp.
29. Mata,R., Calzada, F., Navarrete, A. 1991. Long-chain phenols from the bark of *Amphyteygium adstringens*. Journal of Ethnopharmacology 34: 147-154.
30. Medina, S. J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una consecuencia edáfica. Tesis Licenciatura Biología. UNAM, Facultad de Ciencias. México. D.F. 1-6, 35 pp.
31. Mims, C., Playfair, J., Roitt, I., Wakelín, D., Williams, R. 1999. microbiología Medica. Ed. Harcourt. Barcelona. España. 430-540 pp.
32. Miranda. M. M., 2006. Efecto antimicrobiano del extracto acuoso de cuachalalate (*Amphyteygium adstringens*) en bacterias Gram (+), Gram (-) y *Helicobacter pylori*. Tesis de Licenciatura Química Farmacéutica Bióloga. FES-Cuautitlán. Estado de México. 64-73 pp.
33. Morales, B. I., 2000. Constituyentes Bioactivos Adicionales de *Amphyteygium adstringens* Shiede ex Schlecht (Julianiaceae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM. México. D.F. 4-16 pp.
34. Murillo, F. 2006. Actividad antioxidante in Vitro de las bebidas de frutas. Revista Tecnológica Alfa editores técnicos. 27 pp.
35. Myrving, Q. N., Weissner, R. S. 1991. Bacteriología y micología médica. Ed. Interamericana McGraw-Hill. México. 362-370, 650-658 pp.

36. Navarrete, A. 1982. Estudio químico y pruebas farmacológicas preliminares de la corteza de *Juliania adstringens* (Cuachalalate). Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México. D.F. 6-10 pp.
37. Navarrete, A., Avula, B., Joshi, B. C., Ji, X., Hersh, P., Khant, I. A. 2006. Determinación cuantitativa de triterpenos de *Amphypteygium adstringens* por cromatografía líquida y análisis de capa delgada. *Journal of Aoac International* 89: 1.
38. Navarrete, A., Martínez-Uribe y Reyes, B. 1998. Gastroprotective Activity of the Stem Bark of *Amphypteygium adstringens* in Rats. *Phytotherapy Research* 12: 1-4 pp.
39. Navarrete, A., Reyes, B., Silva, A. 1990. Evaluación farmacológica de la actividad antiulcerosa de *Amphypteygium adstringens* (Cuachalalate). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 21: 28-32.
40. Nikaido, H y Nakae, T. 1979. The outer membrana of gram-negative bacteria. *Advances in microbial physiology* 20: 163-250.
41. Niño, J., Correa Y. M. y Mosquera, O. M. 2006. Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of 11 Solanaceae Plants from Colombia Biodiversity. *Pharmaceutical Biology*.44, 1: 14-18.
42. Okusa, P. N., Penge, O., Devleeschouwer, M., Duez, P. 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 112: 476-481.
43. Olivas, S. M. P. 1999. Plantas Medicinales del Estado de Chihuahua. Universidad Autónoma de Cd. Juárez. Centro de Estudios Biológicos. México. Ciudad Juárez, Chihuahua. 3-5 pp.

44. Olivera, O. A. G., Soto, H. M., Martínez, V. M., Terrazas, S. T. y Solares, A. F., 1999. Phytochemical study of cuachalalate (*Amphypteygium adstringens* Schiede ex Schlecht). *Journal of Ethnopharmacology* 68: 109-118.
45. Olsen, D. E. 2003. Métodos ópticos de análisis. Ed. Reverté. México, DF. 535 pp.
46. Oviedo. C. I., Ramírez. A. I., Soto, H. M., Martínez. V. M. 2004. Principle of the bark of *Amphypteygium adstringens* (Julianiaceae with anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 11, 5 pp.
47. Padmaja, R., Arun, PC., Prashanth, D., Deepak, M., Amit, A., Anjana, M. 2002. Brine shrimp letality bioassay of selected Indian medicinal plants. *Fitoterapia* 73: 508-510.
48. Rosas, L. R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis Profesional, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México. D.F. 11-33 pp.
49. Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México, D.F. 432 pp.
50. Rzedowski, J. y Equihua, M. 1987. Atlas cultural de México. Ed. Secretaría de Educación Pública. Instituto Nacional de Antropología e Historia. Dpo. Editorial Planeta. México. D.F. 14-16 pp.
51. Salcedo-Sánchez, B. 1997. Insectos precortesianos de la cuenca de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de licenciatura, Biología, UNAM. Facultad de Ciencias. México. D.F. 6-10 pp.
52. Secretaria de Salud (SSA). Censo de Población 2001. Casa de salud de la comunidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ayuntamiento de Coxcatlán, Puebla, México. 10 pp.
53. Trease, G. E. y Evans, W. Ch. 1991. Farmacognosia. 13^o edición. Editorial Interamericana. McGrawhill. México. 901 pp.

54. Valiente- Banuet, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arizmendi, M. C., Ortega-Ramírez, J., Soriano, J. A. 2000. La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México 67: 25-75.
55. Valiente, B. L. 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis UNAM, México. 65 pp.
56. 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". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P. M. academic Press. New York, USA. 47-71 pp.
57. Vivanco, J. M., Cosío, E., Víctor, M., Loyola-Vargas y Flores, H. E. 2005. Mecanismos químicos de defensa de las plantas. Scientific American Latinoamérica X, 68-75 pp.
58. Wang, H., Bun, T. N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin -like protein from kiwi fruits. Phytochemistry 61: 1-6.