



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ESTUDIO COMPARATIVO DE ALGUNAS ACTIVIDADES
BIOLÓGICAS DE LAS CORTEZAS DE *Ceiba aesculifolia*
subsp. *parvifolia*, *Juliania adstringens* y *Cyrtocarpa procera*
DE SAN RAFAEL, COXCATLÁN, PUEBLA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

JULIETA OROZCO MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

COMITÉ TUTOR: DRA. CLAUDIA TZASNA HERNÁNDEZ DELGADO

DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA

MÉXICO, D.F

SEPTIEMBRE, 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General de Administración Escolar UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de junio de 2010 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **OROZCO MARTÍNEZ JULIETA** con número de cuenta 301821537 con la tesis titulada "Estudio comparativo de algunas actividades biológicas de las cortezas de Ceiba aesculifolia subsp. parvifolia, Juliania adstringens y Cyrtocarpa procera de San Rafael, Coxcatlán, Puebla", realizada bajo la dirección de la DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ:

Presidente: DR. MANUEL JIMÉNEZ ESTRADA
Vocal: DR. CÉSAR MATEO FLORES ORTIZ
Secretaria: DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
Suplente: DR. JAVIER CABALLERO NIETO
Suplente: DRA. CLAUDIA TZASNÁ HERNÁNDEZ DELGADO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 01 de septiembre de 2010


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente de la interesada

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A los apoyos recibidos por:

- CONACyT, con número (CVU/Becario): 262090/220312.

-UNAM PAPCA 2009-2010.

-UNAM PAPIIT 207808.

-Al proyecto por parte de KEW, Royal Botanic Gardens: Plantas útiles de San Rafael, Coxcatlán (MGU/Useful Plants Project Mexico).

A los miembros del Comité Tutor:

- Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado.

- Dr. Manuel Jiménez Estrada.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de Tesis, **Dra. Margarita Canales Martínez**, por haberme guiado en la realización de este trabajo, por su apoyo y los conocimientos tan valiosos que me transmitió.

A los miembros del comité tutor:

Dra. Tzasna Hernández Delgado, por los consejos y el apoyo que siempre me brindó.

Dr. Manuel Jiménez Estrada, por enriquecer este trabajo con sus observaciones y sugerencias.

A los miembros del jurado:

Dr. César Flores, por la ayuda en el análisis de las muestras por HPLC y las correcciones realizadas a este trabajo.

Dr. Javier Caballero Nieto, por los comentarios y sugerencias realizadas durante la revisión de este trabajo.

A la **Dra. Ana María García Bores** y al **Dr. José Guillermo Ávila**, por sus consejos y las facilidades otorgadas en el laboratorio de Fitoquímica

Al **M. en C. Ángel Durán Díaz**, por su ayuda en el análisis estadístico y los buenos consejos que siempre me dio.

Al **M. en C. Luis Barbo**, por la ayuda otorgada en el análisis de las muestras por HPLC en el laboratorio de Biogeoquímica.

A la **M. en C. Rocío Serrano Pinales**, porque siempre estuvo dispuesta a ayudarme, con sus consejos, paciencia y la amistad que me brindó.

A las **Biólogas Karla Martínez Elizalde y Angélica Jauri Castillo**, porque sin su ayuda este trabajo nunca hubiera terminado. Gracias por su apoyo y amistad.

*“Soy de las que piensan
que la ciencia tiene una
gran belleza. Un sabio en
su laboratorio no es
solamente un teórico. Es
también un niño colocado
ante los fenómenos
naturales que le
impresionan como un
cuento de hadas.”*

Marie Curie.

A mis padres y hermano:

Por su apoyo y cariño incondicional

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Fitoquímica y Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras.....	3
Índice de Cuadros.....	6
Resumen.....	8
Abstract.....	10
Introducción.....	12
Valle de Tehuacán-Cuicatlán.....	14
San Rafael, Coxcatlán.....	15
Descripción botánica y antecedentes de las especies evaluadas	
<i>Ceiba aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> Rose.....	17
<i>Cyrtocarpa procera</i> Kunth.....	19
<i>Juliania adstringens</i> Schltldl.....	21
Planteamiento del problema.....	26
Hipótesis.....	26
Objetivos.....	27
Metodología	
Colecta del material vegetal.....	28
Obtención de los extractos.....	28
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	29
Efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	30
Evaluación de la actividad antifúngica.....	30
Evaluación de la actividad antioxidante.....	32
Contenido de fenoles totales.....	32
Evaluación de la toxicidad general.....	32
Fraccionamiento biodirigido.....	33
Análisis estadísticos.....	38
Resultados y Análisis	
Colecta del material vegetal.....	39
Obtención de los extractos.....	39
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	42

Efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	54
Evaluación de la actividad antifúngica.....	60
Evaluación de la actividad antioxidante.....	63
Contenido de fenoles totales.....	63
Evaluación de la toxicidad general.....	66
Fraccionamiento biodirigido.....	68
Discusión.....	87
Conclusiones.....	100
Apéndices	
1.- Método de difusión en agar o de Kirby Baüer.....	102
2.- Microtécnica de dilución en caldo.....	104
3.- Efecto de los extractos sobre el crecimiento bacteriano.....	106
4.- Inhibición del crecimiento radial por difusión en agar.....	108
5.- Determinación de la concentración fungicida media (CF ₅₀).....	109
6.- Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).....	110
7.- Contenido de fenoles totales.....	112
8.- Toxicidad general sobre <i>Artemia salina</i>	114
9.- Técnicas cromatográficas.....	116
10.- Métodos cualitativos.....	119
Literatura consultada.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ubicación geográfica del poblado de San Rafael.....	16
Figura 2.	Corteza de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	17
Figura 3.	Distribución en México de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	18
Figura 4.	Hojas de <i>C. procera</i>	19
Figura 5.	Distribución en México de <i>C. procera</i>	20
Figura 6.	Corteza de <i>J. adstringens</i>	21
Figura 7.	Distribución en México de <i>J. adstringens</i>	22
Figura 8.	Actividad antibacteriana de los extractos de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	44
Figura 9.	Actividad antibacteriana de los extractos de <i>C. procera</i>	46
Figura 10.	Actividad antibacteriana de los extractos de <i>J. adstringens</i>	47
Figura 11.	Comparación de los halos de inhibición de los extractos MeOH1 de las tres cortezas en las cepas bacterianas.....	49
Figura 12.	Comparación de los halos de inhibición de los extractos MeOH2 de las tres cortezas en las cepas bacterianas.....	50
Figura 13.	Comparación de los halos de inhibición de los extractos MeOH1 de las cortezas en cuanto al tipo de cepa bacteriana.....	50
Figura 14.	Comparación de los halos de inhibición de los extractos MeOH2 de las tres cortezas en cuanto al tipo de cepa bacteriana.....	51
Figura 15.	Comparación de la CMI de las cuatro cepas Gram positivas sobre los extractos MeOH2 de las tres cortezas.....	52
Figura 16.	Comparación de la CMI de las nueve cepas Gram negativas sobre los extractos MeOH2 de las tres cortezas.....	53
Figura 17.	Efecto del extracto MeOH2 de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> sobre la curva de crecimiento de <i>S. epidermidis</i>	55
Figura 18.	Efecto del extracto MeOH2 de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> sobre la curva de crecimiento <i>V. cholerae</i> Tor.....	56
Figura 19.	Efecto del extracto MeOH2 de <i>C. procera</i> sobre la curva de crecimiento <i>S. epidermidis</i>	57

Figura 20.	Efecto del extracto MeOH ₂ de <i>C. procera</i> sobre la curva de crecimiento <i>V. cholerae</i> Tor.....	57
Figura 21.	Efecto del extracto MeOH ₂ de <i>J. adstringens</i> sobre <i>S. aureus</i>	58
Figura 22.	Efecto del extracto MeOH ₂ de <i>J. adstringens</i> sobre <i>V. cholerae</i> No-01..	59
Figura 23.	Porcentajes de inhibición del crecimiento radial del extracto MeOH ₁ de <i>C. procera</i> sobre <i>T. mentagrophytes</i>	62
Figura 24.	Actividad antioxidante de la quercetina.....	64
Figura 25.	Actividad antioxidante de los extractos MeOH ₂ de las cortezas.....	64
Figura 26.	Toxicidad general del extracto MeOH ₂ de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> y <i>J. adstringens</i>	67
Figura 27.	Efecto de la Fracción 6 del extracto MeOH ₂ de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> sobre la curva de crecimiento de <i>S. epidermidis</i>	70
Figura 28.	Efecto de la Fracción 6 del extracto MeOH ₂ de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> No-01.....	70
Figura 29.	Porcentajes de reducción de la Fracción 6 del extracto MeOH ₂ de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	71
Figura 30.	Cromatograma de la Fracción 5 del extracto MeOH ₂ de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	72
Figura 31.	Cromatograma de la Fracción 6 del extracto MeOH ₂ de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	72
Figura 32.	Cromatograma de la Fracción 7 del extracto MeOH ₂ de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	73
Figura 33.	Efecto de la Fracción 7 del extracto MeOH ₂ de <i>C. procera</i> sobre la curva de crecimiento de <i>S. epidermidis</i>	76
Figura 34.	Efecto de la Fracción 7 del extracto MeOH ₂ de <i>C. procera</i> sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> Tor.....	76
Figura 35.	Porcentaje de reducción de la Fracción 7 del extracto MeOH ₂ de <i>C. procera</i>	77
Figura 36.	Cromatograma de la Fracción 5 del extracto MeOH ₂ de <i>C. procera</i>	78
Figura 37.	Cromatograma de la Fracción 6 del extracto MeOH ₂ de <i>C. procera</i>	78

Figura 38. Cromatograma de la Fracción 7 del extracto MeOH ₂ de <i>C. procera</i>	79
Figura 39. Porcentaje de reducción de la Fracción 9 del extracto MeOH ₂ de <i>J. adstringens</i>	82
Figura 40. Cromatograma de la Fracción 3 del extracto MeOH ₂ de <i>J. adstringens</i>	83
Figura 41 Cromatograma de la Fracción 9 del extracto MeOH ₂ de <i>J. adstringens</i>	83
Figura 42. Diluciones para evaluar toxicidad general sobre <i>A. salina</i>	115

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Antecedentes de <i>J. adstringens</i>	24
Cuadro 2.	Comparación de los usos etnomedicinales de las especies evaluadas.....	25
Cuadro 3.	Cepas bacterianas evaluadas.....	29
Cuadro 4.	Cepas de hongos filamentosos y levaduras evaluadas.....	31
Cuadro 5.	Fraccionamiento por CC y CCF del extracto MeOH ₂ de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	34
Cuadro 6.	Fraccionamiento por CC y CCF del extracto MeOH ₂ de <i>C. procera</i> ...	35
Cuadro 7.	Fraccionamiento por CC y CCF del extracto MeOH ₂ de <i>J. adstringens</i>	36
Cuadro 8.	Datos de colecta y de herbario de las tres cortezas.....	40
Cuadro 9.	Rendimientos de los extractos MeOH ₁ de las cortezas.....	40
Cuadro 10.	Rendimientos de los extractos de las cortezas.....	41
Cuadro 11.	Actividad antibacteriana del cloramfenicol.....	43
Cuadro 12.	CMI y CBM de los extractos de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	45
Cuadro 13.	CMI y CBM de los extractos de <i>C. procera</i>	46
Cuadro 14.	CMI y CBM de los extractos de <i>J. adstringens</i>	48
Cuadro 15.	Actividad antifúngica de los extractos de <i>C. procera</i> y <i>J. adstringens</i>	61
Cuadro 16.	Contenido de fenoles totales de los extractos MeOH ₂ de las cortezas.....	65
Cuadro 17.	Comparación de la actividad antioxidante y CFT de los extractos MOH ₂ de las cortezas.....	65
Cuadro 18.	Actividad antibacteriana sobre <i>V. cholerae</i> Tor de las fracciones del extracto MeOH ₂ de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	69
Cuadro 19.	CMI de la Fracción 6 del extracto MeOH ₂ de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	69
Cuadro 20.	Compuestos presentes en las fracciones 5, 6 y 7 del extracto MeOH ₂ de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	73
Cuadro 21.	Actividad antibacteriana sobre <i>S. epidermidis</i> de las fracciones del extracto MeOH ₂ de <i>C. procera</i>	74

Cuadro 22.	CMI y CBM de la Fracción 7 del extracto MeOH ₂ de <i>C. procera</i>	75
Cuadro 23.	Principales compuestos presentes en las fracciones 5, 6 y 7 del extracto MeOH ₂ de <i>C. procera</i>	79
Cuadro 24.	Actividad antibacteriana de las fracciones del extracto MeOH ₂ de <i>J. adstringens</i> sobre <i>V. cholerae</i> No-01.....	80
Cuadro 25.	CMI y CBM de la Fracción 3 del extracto MeOH ₂ de <i>J. adstringens</i>	81
Cuadro 26.	Compuestos presentes en las fracciones 3 y 9 del extracto MeOH ₂ de <i>J. adstringens</i>	84
Cuadro 27.	Comparación de los extractos de las tres cortezas y sus fracciones más activas.....	86
Cuadro 28.	Concentraciones para preparar las soluciones problema para evaluar la actividad antioxidante.....	111

RESUMEN

Las plantas han formado la base del sistema de la medicina tradicional que ha estado en existencia por miles de años y continúan aportando a la humanidad nuevos remedios. México se considera como uno de los países con mayor diversidad de biota en todo el mundo, posee el cuarto lugar en cuanto a la diversidad de plantas fanerógamas, con aproximadamente 30,000 especies que representan entre el 10 y 12% del total mundial. El Valle de Tehuacán-Cuicatlán tiene gran importancia para la conservación de uno de los principales reservorios de la biodiversidad de las zonas áridas y semiáridas de México. San Rafael es un poblado que se localiza dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y el sitio es objeto de una línea de investigación etnobotánica regional, que pretende conocer la condición actual de los recursos naturales, encaminada a proveer herramientas de manejo para el uso y preservación de los recursos naturales dentro de la reserva de la biosfera. En el presente trabajo se realizó un estudio fitoquímico en relación con el uso tradicional de tres especies de plantas medicinales de esta región. Se comparó la actividad antimicrobiana, antioxidante y toxicidad general de las cortezas de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, y *Juliania adstringens* utilizadas en San Rafael para el tratamiento de diabetes, dolor de riñones, tumores, gastritis y heridas, y la corteza de *Cyrtocarpa procera* empleada para tratar el dolor de riñones. Se obtuvieron los extractos hexánicos, metanólicos crudos (MeOH1) y metanólicos libres de compuestos no polares (MeOH2) de las cortezas y se evaluó la actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas por medio del método de difusión en agar de Kirby Baüer y con la microtécnica de dilución en caldo; se determinó el efecto de los extractos sobre la curva de sobrevivencia bacteriano; la actividad antifúngica se evaluó con el método de inhibición del crecimiento radial por difusión y dilución en agar; la actividad antioxidante se determinó por el método de reducción del radical 2,2-difenilpicril-hidracil; la concentración de fenoles totales se estimó utilizando el reactivo de Folin-Ciocalteu; la toxicidad general se evaluó sobre *Artemia salina*; además se realizó un fraccionamiento biodirigido, utilizando técnicas cromatográficas de capa fina (CCF), en columna (CC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los extractos MeOH1 y MeOH2 presentaron actividad antibacteriana siendo los extractos MeOH2 los que mostraron los

valores más bajos de CMI. Los extractos MeOH1 y MeOH2 de *C. procera* y *J. adstringens* presentaron actividad antifúngica sobre *Trichophyton mentagrophytes* y *Rhizoctonia solani*, siendo el extracto MeOH1 de *C. procera* el que mostró la mayor inhibición sobre *T. mentagrophytes* ($CF_{50} = 471.30 \mu\text{g/mL}$). Los extractos MeOH2 de las cortezas presentaron actividad antioxidante, siendo para *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* una $CA_{50} = 6.15 \mu\text{g/mL}$, *C. procera* una $CA_{50} = 4.78 \mu\text{g/mL}$ y *J. adstringens* una $CA_{50} = 5.73 \mu\text{g/mL}$, y con un contenido de fenoles totales de 28, 68 y 40% respectivamente. En cuanto a la evaluación de la toxicidad de los extractos MeOH2 sobre *A. salina*, *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* obtuvo una $CL_{50} = 2.82 \mu\text{g/mL}$, *J. adstringens* una $CL_{50} = 7.33 \mu\text{g/mL}$, en cuanto a *C. procera* no sobrevivió ningún organismo a la concentración de $2 \mu\text{g/mL}$. En el fraccionamiento biodirigido de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, se encontró que en la fracciones 5, 6 y 7 se encuentran metabolitos como terpenos, fenilpropanoides, isoflavonas y fenoles. Para *C. procera* se encuentra la presencia de catecol y catequina en la fracción 5 y ácido gálico en las fracciones 6 y 7. En cuanto a *J. adstringens* en las fracciones 3 y 9 se encuentran en su mayoría fenilpropanoides. Estos resultados sugieren que el uso de estas tres cortezas en la medicina tradicional se justifica bajo una base científica.

ABSTRACT

The plants have formed the base of the system of the traditional medicine that has been in existence for thousands of years and they continue contributing to humanity new remedies. Mexico is considered one of the countries with more biota diversity in the entire world, possesses the fourth place for its diversity of fanerogams plants, with approximately 30,000 species that represent between the 10 and 12% of the total world. The Tehuacan-Cuicatlan Valley has great importance for the conservation of one of the main reserves of biodiversity of arid and semi-arid areas of Mexico. San Rafael is located inside the Valley of Tehuacan-Cuicatlan and the place is object of a line of a regional ethnobotanical research that seeks to know the current condition of the natural resources, guided to provide handling tools for the use and preservation of the natural resources inside the reservation of the biosphere. This investigation was carried out a phytochemical study in connection with the traditional use of three species of medicinal plants of this region. It was compared the antibacterial, antifungal, antioxidant and general toxicity activities of the barks of *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *Cyrtocarpa procera* and *Juliania adstringens* used in San Rafael, Coxcatlán, Puebla. The hexane, crude methanol (MeOH1) and methanol free of not polar compounds (MeOH2) extracts, were obtained of the barks and was evaluated the antibacterial activity on Gram-positive and Gram-negative bacteria by disc-diffusion method and the microtechnique of dilution in broth; the effect of the extracts was evaluated on the curve of bacterial survival; the antifungal activity was evaluated with the radial growth by diffusion and dilution in agar method; the antioxidant activity was evaluated by reduction of the 2,2-diphenilpicril-hydracil radical method; the concentration of total phenols were evaluated using the reagent of Folin-Ciocalteu; the general toxicity were evaluated on brine shrimp *Artemia salina*; furthermore was carried out a separation process, using thin layer chromatography, in column and high performance liquid chromatography. The MeOH1 and MeOH2 extracts presented antibacterial activity, the MeOH2 extract showed the lowest MIC values. The MeOH1 and MeOH2 extracts of *C. procera* and *J. adstringens* presented antifungal activity against *Trichophyton mentagrophytes* and *Rhizoctonia solani*, the extract MeOH1 of *C. procera* showed the higher inhibition against *T. mentagrophytes* (CF₅₀= 471.30 µg/mL). The

antioxidant activities of MeOH2 extracts of the barks were *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* $EC_{50}= 6.15 \mu\text{g/mL}$, *C. procera* $EC_{50}= 4.78 \mu\text{g/mL}$ and *J. adstringens* $EC_{50}= 5.73 \mu\text{g/mL}$, and with a content of total phenols of 28, 68 and 40% respectively. In the evaluation of the general toxicity on *A. salina* of the MeOH2 extracts, *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* obtained a $LC_{50}= 2.82 \mu\text{g/mL}$, *J. adstringens* a $CL_{50}= 7.33 \mu\text{g/mL}$ and with the extract of *C. procera* no one organism had survived at the lowest concentration ($2 \mu\text{g/mL}$). In the separation process of *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, was found that in the fractions 5, 6 and 7 were present some metabolites like terpenes, phenylpropanoids, isoflavones and phenols. For *C. procera* found in the fraction 5 the presence of catechol and catechin, and gallic acid in the fractions 6 and 7. In *J. adstringens*, the fractions 3 and 9 were composed in their majority with phenylpropanoids. These results suggest that the use of these three barks in the traditional medicine is justified under a scientific base.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han formado las bases del sistema de la medicina tradicional que ha estado en existencia por miles de años y continúan aportando a la humanidad nuevos remedios. Los remedios herbales se han desarrollado a través de ensayos y errores por muchos siglos, y las curas más importantes fueron pasadas verbalmente de generación en generación. Aunque científicamente algunas de las propiedades terapéuticas atribuidas a las plantas se han comprobado como erróneas, la terapia de las plantas medicinales está basada en los conocimientos empíricos de miles de años. Se estima que el 20% de la población mundial continúa confiando en las plantas medicinales como medicina alternativa (Gurib-Fakim, 2006).

Actualmente, el 25% de los principios activos derivados de las plantas, se consideran como drogas importantes en uso en varios países. La mayoría de estos compuestos químicos se derivan de plantas medicinales las cuales principalmente fueron descubiertas a través de la investigación etnobotánica, y los compuestos tienen el mismo o similar uso como las plantas de las cuales se derivaron (Newman y Cragg, 2007; Gurib-Fakim, 2006).

Las propiedades farmacológicas de las plantas es producida por una amplia variedad de metabolitos secundarios (Salisbury, 1992). De los cuales se han aislado alrededor de 50,000 estructuras y todavía hay por describirse miles de compuestos (Pichersky y Gang, 2000), por lo que debido a su gran diversidad molecular, estos representan un recurso biogenético sumamente rico para el descubrimiento de nuevas drogas (Cowan, 1999).

A partir de estudios clínicos, farmacológicos y químicos de algunas plantas medicinales se han obtenido moléculas muy importantes para la farmacología como es el caso del ácido acetilsalicílico (antiinflamatorio, analgésico, antipirético), la digitoxina (cardiotónico, antiarrítmico), la morfina (analgésico) y la pilocarpina (miótico y antiglaucomatoso) (Butler, 2004).

A nivel mundial, se considera que existen alrededor de 250,000 especies de plantas vasculares, sin embargo existe un déficit de información básica sobre la riqueza, distribución y composición de la biota (Pagaza y Fernández, 2004).

México se considera como uno de los países con mayor diversidad de biota en todo el mundo, posee el cuarto lugar en cuanto a su diversidad de plantas fanerógamas, con aproximadamente 30,000 especies que representan entre el 10 y 12% del total mundial (González, 1998; Alanís et al., 2004). El total de la flora fanerógama conocida en México se calcula en forma aproximada en 220 familias, 2, 410 géneros y 22, 000 especies (Alanís et al., 2004).

México contiene una elevada proporción de taxa de distribución restringida. Esta abundancia de endemismos en la flora de México, asociada a su notable diversidad, es indicadora de que el territorio del país ha sido lugar de origen y desarrollo de un gran número de grupos de plantas. El fenómeno es particularmente espectacular en las zonas áridas y semiáridas, donde el endemismo a menudo no sólo atañe a grupos taxonómicos de rango elevado, sino también a formas biológicas (Alanís et al., 2004).

La Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán tiene gran importancia para la conservación de uno de los principales reservorios de la biodiversidad de las zonas áridas y semiáridas de México. Por lo que en el presente trabajo se realizó una evaluación fitoquímica de tres especies vegetales de esta zona.

VALLE DE TEHUACÁN-CUICATLÁN

En 1998, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, se convirtió en una de las 18 Reservas de la Biosfera de México, apoyada por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) (Lira, 2001).

La Reserva de Tehuacán-Cuicatlán se sitúa entre los estados de Puebla y Oaxaca, y tiene un área aproximada de 10,000 Km², en donde se encuentra una gran diversidad de recursos naturales. Esta región se considera como la más rica de México en cuanto a recursos vegetales (Casas et al., 2001), ya que en esta zona se encuentran 2,703 especies de plantas las cuales representan entre el 10 y 11.4% de la flora mexicana, de la cual el 30% son endémicas de la región (Dávila et al., 2002). Las familias con un mayor número de especies presentes en esta zona son: Asteraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae. Más del 25% de las plantas vasculares del Valle se usan por diferentes comunidades humanas que habitan la región (Canales et al., 2006; Rosas, 2003).

La historia cultural del Valle de Tehuacán-Cuicatlán data de casi 10,000 años atrás, durante los cuales han habitado esta región 7 grupos étnicos (Nahuas, Popolocas, Mazatecos, Chinantecos, Ixcatecos, Cuicatecos y Mixtecos) (Casas et al., 2001).

Por otra parte, esta región ha tenido enorme relevancia para la construcción de la prehistoria de la región cultural conocida como Mesoamérica, ya que en algunas cuevas del Valle de Tehuacán se han encontrado evidencias sobre la domesticación de plantas y el origen de la agricultura (Blanckaert et al., 2004).

La larga historia cultural junto con la gran diversidad florística indica que el recurso vegetal se ha utilizado y manejado de diferentes maneras. No obstante, son pocas las investigaciones que registran alguna información sobre el uso y sistematización de los recursos (Blanckaert et al., 2004).

San Rafael es un poblado que se localiza dentro del Valle de Tehuacán- Cuicatlán. El sitio es objeto de una línea de investigación etnobotánica regional, que pretende conocer la condición actual de los recursos naturales, encaminada a proveer herramientas de

manejo para el uso y preservación de los recursos naturales dentro de la reserva de la biosfera. La presente contribución ha sido la base para realizar un estudio sobre la fitoquímica en relación con el uso tradicional de las plantas medicinales de esta región.

SAN RAFAEL, COXCATLÁN.

San Rafael es un poblado que pertenece al municipio de Coxcatlán, que se localiza dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, al sureste del estado de Puebla (Figura 1), entre las coordenadas 18° 12' y 18° 14' de latitud norte, así como 97° 07' y 97° 09' de longitud oeste, en un intervalo altitudinal de 957 a 1400 m.s.n.m. (Medina, 2000; Fernández, 1999).

El clima es de categoría Bs1 (h')w''(w)eg (Fernández, 1999), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22 °C (Medina, 2000).

La vegetación predominante es matorral espinoso con especies como *Bursera morelensis* Ramirez, *Bursera aptera* Ramírez, *Opuntia puberula* Pfeiffer, *Ceiba parvifolia* Rose y *Acacia cochliacantha* Humb (Rzedowski, 1978; Fernández, 1999; Casas et al., 2001).

Los suelos de la región están pobremente desarrollados y pueden ser divididos en dos grandes tipos: regosoles, predominantemente calcáreos y regosoles éutricos y xerosoles, predominantemente xerosoles háplicos (Casas et al., 2001).

En San Rafael se han registrado un total de 374 especies vegetales pertenecientes a 249 géneros y 87 familias, de las cuales 368 especies fueron registradas con uno o más usos (18% utilizadas como plantas medicinales) (Rosas, 2003).

La comunidad de San Rafael es relativamente de poca antigüedad. Se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 298 habitantes. La actividad económica más importante es la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. Los campesinos de la comunidad también se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

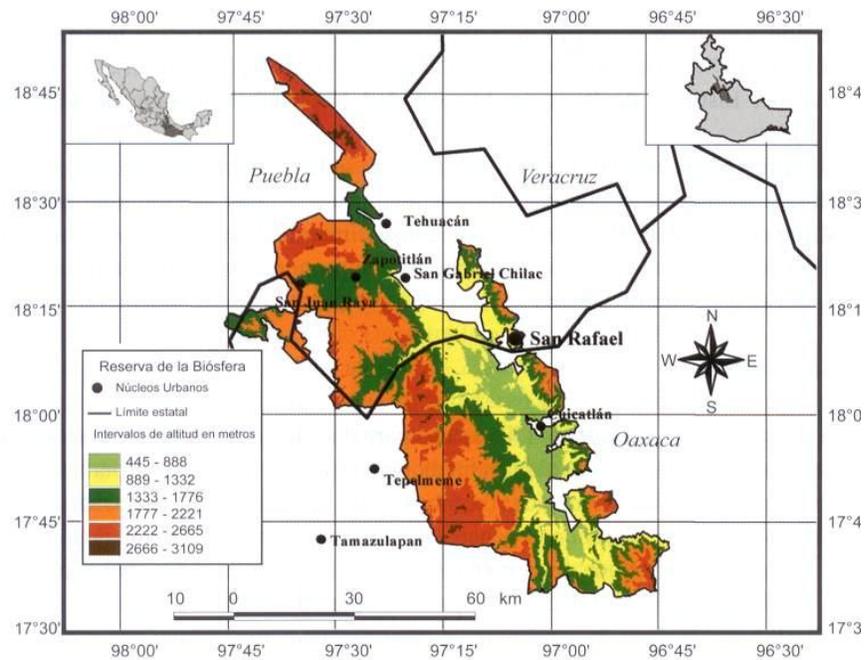


Figura 1. Ubicación geográfica del poblado de San Rafael.

Las investigaciones desde el punto de vista químico farmacológico de las plantas medicinales se deben incrementar enfocándose al estudio de nuevos principios activos o moléculas prototipo para el desarrollo de compuestos farmacológicamente activos, menos tóxicos, más selectivos y por lo tanto más eficaces como podría ser el caso de la composición química presente en las cortezas de *Ceiba aeculifolia* subsp. *parvifolia*, *Juliania adstringens* y *Cyrtocarpa procera*.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y ANTECEDENTES DE LAS ESPECIES EVALUADAS

Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia* Rose*A) CLASIFICACIÓN:**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malvales

Familia: Bombacaceae

Género: *Ceiba*Especie: *Ceiba aesculifolia*Subespecie: *Ceiba aesculifolia parvifolia* Rose

Figura 2. Corteza de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

B) NOMBRE COMÚN:

Pochote, pochotle, ceiba, pochote de secas (Reyes et al., 2004; Canales et al., 2005 y 2006; Avendaño et al., 2006).

C) DESCRIPCIÓN:

C. aesculifolia subsp. *parvifolia* es un árbol caducifolio de hasta 10 m. de alto, con tronco generalmente cubierto por corcho a manera de protuberancias (Figura 2) y ramas ornamentadas con espinas. Sus hojas son ovaladas a redondas, muy pecioladas y con 5 a 6 foliolos. Las flores son blanco amarillentas, con pétalos enrollados de 13 cm. de largo, suculentos y de estambres largos. Florece entre noviembre y enero. Sus frutos son cápsulas de 8 cm de largo que en su interior contienen semillas morenas, esféricas y lisas con abundante lana blanca (Reyes et al., 2004).

D) DISTRIBUCIÓN:

Esta especie se distribuye en la República Mexicana en los estados de: Guerrero, Morelos, Puebla, Oaxaca, Tabasco y Yucatán (Figura 3) (Reyes et al., 2004).

E) ETNOBOTÁNICA:

La corteza del Pochote se utiliza para hacer pequeñas figuras artesanales. Las flores son preparadas en guisos. En tiempos prehispánicos la fibra del fruto se empleaba para confeccionar telas para príncipes y reyes, también es usada para rellenar cojines, almohadas, colchones y otros artículos de mueblería. Las almohadas tienen especial demanda para enfermos de asma o con padecimientos de alergia. Las semillas inmaduras son comestibles y además proporcionan aceite que puede usarse en la fabricación de jabón (Avendaño et al., 2006). En San Rafael, Coxcatlán, Puebla la corteza se toma en infusiones para tratar diabetes, dolor de riñones, tumores, gastritis y para curar heridas (Canales et al., 2005).

F) ANTECEDENTES:

Canales y col., 2005, encontraron actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* sobre *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Vibrio cholerae*.



Figura 3. Distribución en México de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

Cyrtocarpa procera* Kunth.*A) CLASIFICACIÓN:**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Burserales

Familia: Anacardiaceae

Género: *Cyrtocarpa*Especie: *Cyrtocarpa procera* Kunth**Figura 4.** Hojas de *C. procera***B) NOMBRE COMÚN:**

Estado de México: chucum-pum. Michoacán: chucumpuz, chupandia. Nayarit: chocote, puei (cora) (Argueta y Cano, 1994). Puebla: Chupandilla (Canales et al., 2005 y 2006).

C) DESCRIPCIÓN:

C. procera es un árbol de aproximadamente 6 m. de altura, la corteza está cubierta con vellos. Las hojas parecen plumas; tienen un soporte que las une a los tallos (Figura 4). Presenta racimos de flores blancas. Los frutos están cubiertos de pelos y miden 2 cm de largo (Argueta y Cano, 1994).

D) HABITAT Y DISTRIBUCIÓN:

Es una especie originaria de México. Habita en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados entre los 600 y los 1100 m.s.n.m. Es una planta silvestre, asociada a bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino y de pino. Se encuentra ampliamente distribuida en: Colima, Michoacán, Estado de México, Puebla y Oaxaca (Figura 5) (Argueta y Cano, 1994).

E) ETNOBOTÁNICA:

La corteza de *C. procera* es la parte más usada. En el Estado de México se emplea para resolver trastornos del aparato digestivo, tales como diarrea y disentería. En Nayarit se prepara en cocimiento junto con Cuachalalate (*Juliania adstringens*) y se emplea para lavar heridas y llagas, y lograr una cicatrización más rápida; administrada por vía oral, se usa para quitar el dolor de cintura. En Michoacán se recomienda masticarla para curar el dolor de muelas y la tos (Argueta y Cano, 1994). En San Rafael, Coxcatlán, Puebla se utiliza para aliviar males del riñón (Canales et al., 2005).

F) ANTECEDENTES:

Canales y col., 2005, demostraron la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza de *C. procera* sobre *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae* y *Shigella boydii*.

Rodríguez- López y col., 2006, evaluaron la actividad tóxica de los extractos de hexano, diclorometano y acetona de la corteza de *C. procera* sobre *Artemia salina*, encontrando que todos los extractos mostraron actividad significativa. También aislaron el β -sitosterol e identificaron siete ácidos grasos.

Rodríguez- López y col., 2003, reportan la actividad espasmolítica del extracto de cloroformo-metanol (1:1) de la corteza de *C. procera*.



Figura 5. Distribución en México de *C. procera*

Juliania adstringens* Schltl.*A) CLASIFICACIÓN:**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Burserales

Familia: Julianiaceae

Género: *Juliania*Especie: *Juliania adstringens* Schltl**Figura 6.** Corteza de *J. adstringens***B) SINÓNIMOS:***Amphipterygium adstringens* Standl, *Hypopterygium adstringens* Schltl.**C) NOMBRE COMÚN:**

Chalalate, cuachalalate, cuachalala, volador. Distrito Federal: cuachalatl (náhuatl).

Michoacán: maceran, matixeran, pacueco. Oaxaca: cuachinala (Argueta y Cano, 1994).

D) DESCRIPCIÓN:

J. adstringens es un árbol de 10 m. de altura con el tronco torcido de corteza moreno grisáceo o gris plomizo con grandes escamas (Figura 6), las hojas están 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, tiene madera resinosa, es una especie dioica. Los frutos son nueces abultadas que están en ramas de color verde pálido (Argueta y Cano, 1994).

E) HABITAT Y DISTRIBUCIÓN:

Habita en clima cálido, semicálido, y templado entre 100 y 3000 m.s.n.m., crece en zonas perturbadas de bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, de matorral xerófilo, bosque espinoso, mesófilo de montaña y pino-encino. Se encuentra distribuida en el Estado de México, Michoacán, Jalisco, Guanajuato, Distrito Federal, Guerrero, Oaxaca y Puebla (Figura 7) (Olivera et al., 1999; Argueta y Cano, 1994).



Figura 7. Distribución en México de *J. adstringens*

F) ETNOBOTÁNICA:

El Cuachalalate, es una planta de uso muy antiguo de la cual se ha confirmado una actividad antitumoral y anticancerígeno 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).

Este mismo cocimiento de la corteza se toma o se pone en fomentos sobre los tumores o cáncer; 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, calentura, caída de cabello, afecciones respiratorias, manchas en la piel, gangrena y como antidiabético (Rzedowski, 1978).

En San Rafael, Coxcatlán, Puebla, la corteza del Cuachalate se prepara en infusiones para tratar diabetes, heridas, tumores, gastritis y dolor de riñones (Canales et al., 2005).

G) ANTECEDENTES:

Se encuentran varios estudios fitoquímicos de *J. adstringens*, como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Antecedentes de *J. adstringens*.

Autor	Actividad	Compuesto aislado
González y Delgado, 1962		Saporgenina, ácido masticadienónico y ácido α - hidroximasticadienónico.
Mata et al., 1991		Ácidos anacárdicos y aldehídos anacárdicos.
Navarrete et al., 1998	Antiulcerogástrico	
Olivera et al., 1999	Antiinflamatoria	Ácido α - hidroximasticadienónico.
Arrieta et al., 2003	Gastroprotectiva	Ácido α - hidroximasticadienónico y el β -sitosterol.
Makino et al., 2004		Triterpenos tipo tirucalano
Oviedo-Chávez et al., 2004	Antiinflamatoria	Masticadienónico y 3 α -hidroximasticadienónico.
Canales et al., 2005	Antibacteriana	
Oviedo et al., 2005	Citotóxica	
Rosas et al., 2006	Citotóxica	Ácido anacárdico.
Déciga-Campos et al., 2006	Sin toxicidad sobre ratón y <i>Artemia salina</i> y sin actividad mutagénica	
Castillo-Juárez et al., 2007 y 2009	Anti- <i>Helicobacter pylori</i> .	Ácido anacárdico

Canales y col., 2005, reportan que los pobladores de San Rafael confunden las cortezas del Pochote y Cuachalalate, ya que en algún momento de su desarrollo la corteza de ambas especies presentan ornamentaciones similares, esta es la razón por la que les den un uso medicinal similar. En cuanto a la corteza de la Chupandilla se vende la corteza como si fuera la del Cuachalalate. En el Cuadro 2 se comparan los usos medicinales que el poblado de San Rafael les da a las tres cortezas a estudiar

Cuadro 2. Comparación de los usos etnomedicinales de las especies evaluadas.

Especie Nombre común	<i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i> Pochote	<i>J. adstringens</i> Cuachalalate	<i>C. procera</i> Chupandilla
	Diabetes	Diabetes	
	Dolor de riñones	Dolor de riñones	
Uso etnomedicinal	Tumores	Tumores	Dolor de riñones
	Gastritis	Gastritis	
	Heridas	Heridas	

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las cortezas de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *J. adstringens* y *C. procera* son utilizadas en la medicina tradicional para aliviar padecimientos de posible origen infeccioso, por lo que, en esta investigación se justifica el uso de estas especies bajo una base científica.

HIPÓTESIS

Las plantas sintetizan diversos metabolitos secundarios algunos de estos presentan actividad antibacteriana, antifúngica, antioxidante, etc. En la medicina tradicional se usa una gran variedad de plantas para aliviar diversos padecimientos, en particular *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *J. adstringens* y *C. procera* son utilizadas para curar enfermedades similares. Entonces posiblemente estas especies sintetizen metabolitos secundarios responsables de estas actividades biológicas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Comparar la actividad antimicrobiana, antioxidante y toxicidad general de los extractos metanólicos de las cortezas de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *J. adstringens* y *C. procera*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Obtener los extractos metanólicos de las cortezas de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *J. adstringens* y *C. procera*.
- Evaluar la actividad antibacteriana, antifúngica, toxicidad general, antioxidante y contenido de fenoles totales de los extractos metanólicos de cada una de las cortezas.
- Determinar la concentración: mínima inhibitoria (CMI), bactericida mínima (CBM), fungicida media (CF₅₀), capacidad antioxidante 50 (CA₅₀) y concentración letal media (CL₅₀) de los extractos metanólicos de las cortezas de las tres especies.
- Determinar el efecto de los extractos que hayan mostrado actividad antibacteriana sobre la curva del crecimiento bacteriano.
- Fraccionar los extractos metanólicos y obtener la(s) fracción(es) con mayor actividad biológica de cada una de las cortezas.
- Comparar las fracciones activas de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *J. adstringens* y *C. procera* de acuerdo a su actividad biológica y composición química.

METODOLOGÍA

A) COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL.

Las cortezas de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *C. procera*, y *J. adstringens* fueron colectadas en San Rafael, Coxcatlán, Puebla, durante el mes de agosto del 2007; se depositó un ejemplar en el herbario IZTA para su identificación y número de colecta.

B) OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.

Los extractos de las tres cortezas se obtuvieron por el método de maceración (Domínguez, 1979). Se pesaron las cortezas secas y se colocaron en trozos en un matraz, se obtuvo el extracto metanólico crudo (MeOH1) de cada una de las cortezas, el cual se filtró y destiló a presión reducida en un rotavapor. Los extractos se colocaron en recipientes de vidrio con la finalidad de completar la evaporación del solvente. Para obtener los extractos metanólicos libres de compuestos no polares (MeOH2), los extractos crudos (MeOH1) se sometieron a una partición con hexano. El rendimiento de los extractos se determinó por diferencia de peso con relación al peso seco de la planta.

PRUEBAS BIOLÓGICAS

C) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Se utilizaron 13 cepas bacterianas (cuatro Gram positivas y nueve Gram negativas) de importancia médica (Cuadro 3).

Cuadro 3. Cepas bacterianas evaluadas.

Tipo	Cepa	Clasificación, serotipo o donadas por:
Gram positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 12398
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 19430
	<i>Bacillus subtilis</i>	Laboratorio de
	<i>Sarcina lutea</i>	microbiología de la
Gram negativas	<i>Enterobacter aerogenes</i>	FES Cuautitlán
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Laboratorio de Análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	ATCC 27155
	<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 19430
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
	<i>Vibrio cholerae</i>	INDRE 206 (aislada de agua contaminada)
	<i>Vibrio cholerae</i>	Caso clínico (cc)
	<i>Vibrio cholerae</i>	CDC V12 (Tor)
	<i>Vibrio cholerae</i>	No-01

C.1) Evaluación cualitativa

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana, se llevó a cabo de acuerdo con el método de difusión en agar (Apéndice 1), en el cual los discos fueron impregnados con 2000 µg del extracto a probar; como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloramfenicol, y como control negativo se utilizaron sensidiscos con 10 µL del solvente empleado para diluir el extracto a evaluar (Cole, 1994; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; Beer y Sherwood, 1945).

C.2) Evaluación cuantitativa

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se utilizó la microtécnica de dilución en caldo (Apéndice 2), en donde las concentraciones empleadas fueron: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 µg/mL. Las cajas se inocularon con 100 µL de un cultivo bacteriano a una concentración de 1×10^5 UFC/mL durante 24 hrs. (Koneman, 1985).

D) EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

Para las tres cortezas se evaluó el efecto de los extractos MeOH₂ sobre la curva de crecimiento bacteriano (Apéndice 3). Se utilizó una cepa bacteriana Gram positiva y una Gram negativa (que hayan mostrado mayor sensibilidad en las pruebas cuantitativas). Se monitoreó su crecimiento en nueve tiempos durante 24 horas, al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto ($\frac{1}{2}$ CMI, CMI, CBM) y un grupo testigo (Kubo et al., 1993 citado en Ávila, 1996).

E) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Se utilizaron tres cepas de levaduras y cinco cepas de hongos filamentosos de importancia médica y agronómica (Cuadro 4):

Cuadro 4. Cepas de hongos filamentosos y levaduras evaluadas.

Tipo	Cepa	Número ATCC o donadas por:
Filamentosos	<i>Fusarium sporotrichum</i>	NRLL3299
	<i>Fusarium moniliforme</i>	Laboratorio de
	<i>Aspergillus niger</i>	Fisiología Vegetal de la
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	UBIPRO FES Iztacala
	<i>Rhizoctonia solani</i>	INIFAP, Celaya
Levaduras	<i>Candida albicans</i>	14065
	<i>Candida albicans</i>	Laboratorio de Análisis Clínicos de la FES Iztacala
	<i>Candida albicans</i>	Laboratorio de Micología y Parasitología de la Facultad de
	<i>Criptococcus neoformans</i>	Medicina UNAM

E.1) Evaluación cualitativa.

La evaluación cualitativa para *A. niger*, *T. mentagrophytes*, *F. sporotrichum*, *F. moniliforme* y *R. solani* se realizó con el método cualitativo de inhibición del crecimiento radial (Apéndice 4). Los sensidiscos se impregnaron con 2000 µg de cada extracto; se utilizó como control positivo ketoconazol a una concentración de 7 µg, como control negativo se utilizaron discos impregnados con 10 µL de cada uno de los solventes que se utilizaron para disolver el problema (Wang y Bun, 2002). La evaluación para *C. albicans* y *C. neoformans* se llevó a cabo con el método de difusión en agar de Kirby-Baüer a las mismas concentraciones que la prueba bacteriana (Apéndice 1).

E.2) Evaluación cuantitativa.

Para la determinación de la Concentración Fungicida Media (CF_{50}) se utilizó el método de inhibición del crecimiento radial (Apéndice 5). Para lo cual los extractos se incluyeron en el agar, las concentraciones empleadas fueron: 2000, 1500, 1000, 750, 500 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Método modificado de Wang y Bun, 2002).

F) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

La actividad antioxidante se evaluó con el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) (Apéndice 6). Se determinó la Capacidad antioxidante 50 (CA_{50}), utilizando las siguientes concentraciones: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como control positivo se utilizó la quercetina a las mismas concentraciones que el compuesto problema. Como control negativo se utilizaron pozos con 200 μL de MeOH grado HPLC (Okusa et al., 2007).

G) CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (CFT).

Para el CFT se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu (Apéndice 7). Se realizó una curva de calibración de ácido gálico con las siguientes concentraciones: 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La concentración que se utilizó para cada extracto fue de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y las absorbancias se interpolaron con la curva de calibración del ácido gálico (Método modificado de Singleton et al., 1999).

H) EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD GENERAL.

La toxicidad general se realizó con larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach) (Apéndice 8). Se obtuvo la Concentración Letal Media (CL_{50}) utilizando concentraciones de: 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como control negativo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO), el cual fue el

solvente empleado para disolver el problema (McLaughlin 1991; McLaughlin y Rogues, 1998).

PRUEBAS QUÍMICAS

I) FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO

Para el fraccionamiento, se utilizaron técnicas cromatográficas de columna (CC), de capa fina (CCF) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Apéndice 9). La fase estacionaria de la CC consistió en sílica-gel malla 70-230 (Sigma 5-2509). Para agrupar las alícuotas se corrieron cromatofolios de sílica gel Merck (Kieselgel 60), se observaron con luz UV (366-254 nm) y se revelaron con sulfato cérico.

Se utilizó el 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 (DAD) a una λ de 260 nm, realizando un barrido completo de 200 a 400 nm.

→ **Fraccionamiento del extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.**

A partir de 40 gr de extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* se realizó una CC, en donde la fase móvil consistió en mezclas de hexano (Hex), cloroformo (CHCl₃), acetato de etilo (AcOEt) y metanol (MeOH) en orden creciente de polaridad. Se obtuvieron 133 alícuotas de 500 mL y se agruparon en 16 fracciones (Cuadro 5).

Cuadro 5. Fraccionamiento por CC y CCF del extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*

Eluyente	Proporción (100%)	Alícuota	Fracción	Rendimiento (g)
Hex-CHCl ₃	50:50	1-9	1	0.0643
	20:80	10-11	2	0.0025
CHCl ₃ -AcOEt	50:50	12-17	3	0.0688
		18-20	4	0.2222
AcOEt	100	21-27	5	0.4807
AcOEt-MeOH	90:10	28-30	6	2.4698
		31-39	7	1.9729
	80:20	40	8	1.3561
		41-49	9	5.3569
	70:30	50	10	0.4806
		51-67	11	2.8196
	60:40	68-84	12	6.3754
		85-91	13	4.3060
	50:50	92-101	14	2.3294
	MeOH	100	102-114	15
115-133			16	3.9858

→ **Fraccionamiento del extracto MeOH₂ de *C. procera***

El fraccionamiento se realizó con 50 g del extracto MeOH₂, la fase móvil consistió en mezclas de AcOEt y MeOH en orden creciente de polaridad. Se obtuvieron 157 alícuotas de 250 mL que se agruparon en 35 fracciones (Cuadro 6).

Cuadro 6. Fraccionamiento por CC y CCF del extracto MeOH₂ de *C. procera*.

Eluyente	Proporción (100%)	Alícuota	Fracción	Rendimiento (g)	
AcOEt	100	1-3	1	0.643	
		4	2	0.014	
	90:10	5-6	3	0.014	
		7-9	4	0.012	
		10-11	5	0.331	
		12-15	6	0.395	
		16	7	3.466	
		17-20	8	2.630	
	80:20	21	9	0.413	
		22-23	10	0.435	
		24-31	11	0.757	
		32	12	0.166	
		33-37	13	0.748	
		38-41	14	0.283	
		42-60	15	4.412	
		61-68	16	2.004	
AcOEt-MeOH		70:30	70	17	0.256
			71	18	0.054
	60:40	72	19	0.253	
		73	20	0.252	
		74-76, 78-81	21	0.878	
		77	22	0.161	
		82-84, 86-96	23	3.442	
		85	24	0.199	
		97	25	0.088	
		98	26	0.072	
50:50	99	27	0.072		
	100	28	0.056		
	101	29	0.025		
	102-103	30	0.112		
	104-117	31	0.535		
MeOH	100	118-127	32	0.532	
		128-137	33	0.980	
		138-152	34	0.453	
		153-157	35	0.241	

→ **Fraccionamiento del extracto MeOH₂ de *J. adstringens*.**

Se emplearon 50 g del extracto MeOH₂, la fase móvil consistió en mezclas de AcOEt y MeOH en orden creciente de polaridad. Se obtuvieron 151 alícuotas de 300 mL cada una, las cuales se agruparon en 61 fracciones (Cuadro 7).

Cuadro 7. Fraccionamiento por CC y CCF del extracto MeOH₂ de *J. adstringens*.

Eluyente	Proporción (100%)	Alícuota	Fracción	Rendimiento (g)
AcOEt	100	1	1	0.4016
		2-3	2	0.3534
		4-5	3	0.1797
		6-7	4	0.1583
AcOEt-MeOH	90-10	8	5	0.0574
		9-10	6	0.0698
		11	7	0.0103
		12-13	8	0.7781
		14	9	0.9216
		15	10	0.4552
AcOEt-MeOH	80-20	16-17	11	0.5429
		18	12	0.8986
		19	13	0.4729
		20-21	14	0.603
		22-25	15	0.8727
		26-27	16	0.1988
		28-31	17	0.6387
		32	18	0.0145
		33-34	19	1.3694
		35-36	20	0.824
MeOH-AcOEt	70-30	37-38	21	0.2697
		39	22	0.2457
		40	23	0.0291
		41	24	0.1182
		42	25	0.0426
		43	26	0.2101
MeOH-AcOEt	60-40	44	27	0.1976
		45	28	0.1888
		46	29	0.0444

Cuadro 7. Continuación...

Eluyente	Proporción (100%)	Alícuota	Fracción	Rendimiento (g)
MeOH-AcOEt	50-50	47	30	0.0476
		48	31	0.0022
		49	32	0.0029
		50	33	0.0005
		51	34	0.0444
		52	35	0.0428
		53	36	0.038
		54	37	0.087
		55-56	38	0.0212
		57	39	0.019
		58	40	0.0253
		59-65	41	0.3235
		66-68	42	0.1508
		69-71	43	0.0578
MeOH	100	72-74	44	0.1587
		75-78	45	0.8
		79-81	46	0.1779
		82-84	47	0.3358
		85	48	0.1879
		86-88	49	0.1266
		89-92	50	0.1484
		93-98	51	0.0147
		99	52	0.0164
		100-104	53	0.0709
		105-110	54	0.1294
		111-112	55	0.1736
		113-114	56	0.1474
		115-116	57	0.1836
		117-122	58	0.0122
		123-126	59	0.3102
		127-140	60	0.2385
141-151	61	0.3167		

J) ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizaron análisis estadísticos (ANOVA factorial) para determinar si existe alguna diferencia significativa, entre la actividad antibacteriana de las tres cortezas, utilizando como base los datos de actividad antibacteriana cualitativa de los extractos de las tres cortezas.

Para el análisis de la actividad antifúngica, antioxidante y toxicidad general, se realizaron regresiones, utilizando la línea de tendencia que tenga un mejor ajuste (r^2).

RESULTADOS Y ANÁLISIS

A) COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL.

B) OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS.

Las cortezas de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *C. procera* y *J. adstringens* se colectaron durante el mes de agosto del 2007, en San Rafael, Coxcatlán, Puebla. En el Cuadro 8 se muestran los datos obtenidos del herbario IZTA y los gramos colectados de cada una de las cortezas.

Cuadro 8. Datos de colecta y de herbario de las tres cortezas.

Nombre científico:	<i>Ceiba aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	<i>Juliania adstringens</i>	<i>Cyrtocarpa procera</i>
Nombre común:	Pochote	Cuachalalate	Chupandilla
Familia:	Bombacaceae	Julianeaceae	Anacardiaceae
Gramos colectados:	940 g	502.5 g	1009.5 g
No. De colecta:	RRL147	MCM14	MPF371

El rendimiento de los extractos metanólicos crudos (MeOH1) de cada especie se muestra en el Cuadro 9. En el Cuadro 10 se presentan las particiones hexánicas del extracto MeOH1 en donde se observa que de la partición de cada extracto, el extracto MeOH2 tuvo un mayor rendimiento en comparación con la fase no polar (extracto hexánico), lo cual indica que las tres especies presentan una mayor cantidad de compuestos de polaridad alta.

Cuadro 9. Rendimientos de los extractos MeOH1 de las cortezas.

Especie	Rendimiento de MeOH1	
	g	%
<i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	84.0	8.94
<i>J. adstringens</i>	218.71	43.52
<i>C. procera</i>	130.36	12.91

Porcentaje de rendimiento con base al peso seco de las cortezas colectadas

Cuadro 10. Rendimientos de los extractos de las cortezas.

Especies	MeOH1 utilizado para la partición	MeOH2		Hexánico	
	g	g	%	g	%
<i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	65	57.34	88.21	6.24	9.6
<i>J. adstringens</i>	100	74.37	74.37	25.48	25.48
<i>C. procera</i>	70	64.04	91.48	4.8	6.85

Porcentaje de rendimiento con base al peso del extracto MeOH1 utilizado en la partición.

C) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

Los extractos MeOH1 y MeOH2 de las tres cortezas presentaron actividad antibacteriana sobre cepas Gram positivas y negativas. Los extractos hexánicos no presentaron actividad antibacteriana y todas las cepas bacterianas fueron sensibles al control positivo (cloramfenicol) (Cuadro 11), y el control negativo no inhibió el crecimiento bacteriano.

Cuadro 11. Actividad antibacteriana del cloramfenicol

Cepa	Halo de inhibición (mm)
<i>S. aureus</i>	10.00 ± 1.00
<i>S. epidermidis</i>	6.66 ± 1.15
<i>B. subtilis</i>	29.33 ± 2.62
<i>S. lutea</i>	32.00 ± 0.50
<i>E. aerogenes</i>	19.33 ± 0.47
<i>E. agglomerans</i>	19.67 ± 0.47
<i>Y. enterocolitica</i>	25.67 ± 0.47
<i>S. typhi</i>	28.00 ± 1.63
<i>E. coli</i>	21.67 ± 1.70
<i>V cholerae</i> agua	8.33 ± 0.58
<i>V. cholerae</i> cc	27.67 ± 0.47
<i>V. cholerae</i> Tor	7.33 ± 0.58
<i>V. cholerae</i> No-01	7.33 ± 0.58

Sensidiscos impregnados con 25 µg de cloramfenicol.

Mediciones con respecto a tres repeticiones.

→ **Actividad antibacteriana de los extractos de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.**

Los extractos MeOH1 y MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* mostraron actividad antibacteriana sobre las cuatro cepas Gram positivas. MeOH1 presentó actividad sobre seis cepas Gram negativas y MeOH2 presentó actividad en cinco cepas Gram negativas, *S. typhi* únicamente fue sensible a MeOH1 (Figura 8).

En el Cuadro 12 se presentan los valores de la evaluación cuantitativa (CMI y CBM). Las cepas Gram positivas *S. aureus* y *S. epidermidis* fueron las más sensibles a MeOH1 (CMI: 0.50 mg/mL; CBM: 0.75 mg/mL). Para MeOH2 la cepa Gram positiva que mostró menor sensibilidad fue *B. subtilis* (CMI: 1.00 mg/mL; CBM: 1.50 mg/mL), las otras tres cepas de bacterias Gram positivas mostraron la misma sensibilidad para MeOH2 (CMI: 0.75 mg/mL; CBM: 1.00 mg/mL).

En cuanto a las bacterias Gram negativas *V. cholerae* No-01, cc y Tor fueron las más sensible al extracto MeOH1 (CMI: 0.50 mg/mL; CBM: 0.75 mg/mL) y para MeOH2 fueron *V. cholerae* No-01, cc y Tor (CMI: 0.75 mg/mL; CBM: 1.00 mg/mL). En la mayoría de los casos la sensibilidad de las bacterias sobre el extracto MeOH1 fue menor que para el extracto MeOH2.

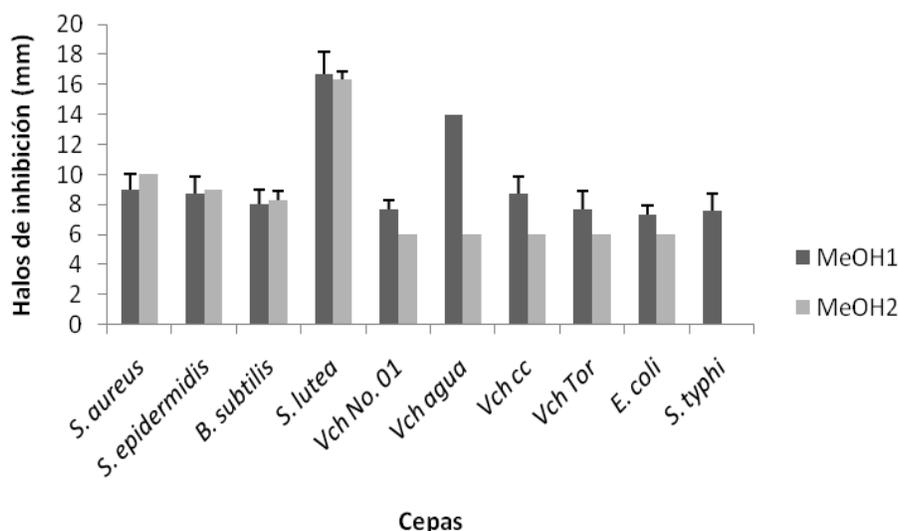


Figura 8. Actividad antibacteriana de los extractos de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

Cuadro 12. CMI y CBM de los extractos de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

Cepas	MeOH1		MeOH2	
	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>S. aureus</i>	0.50	0.75	0.75	1.00
<i>S. epidermidis</i>	0.50	0.75	0.75	1.00
<i>B. subtilis</i>	1.00	1.50	1.00	1.50
<i>S.lutea</i>	0.75	1.00	0.75	1.00
<i>Vch No. 01</i>	0.50	0.75	0.75	1.00
<i>Vch agua</i>	1.00	1.50	1.00	1.50
<i>Vch cc</i>	0.50	0.75	0.75	1.00
<i>Vch Tor</i>	0.50	0.75	0.75	1.00
<i>E. coli</i>	1.00	1.50	1.50	2.00
<i>S. typhi</i>	1.00	1.50	Na	Na

Na: no activo; CMI y CBM en mg/mL

→ Actividad antibacteriana de los extractos de *C. procera*.

En cuanto a los extractos MeOH1 y MeOH2 de *C. procera*, presentaron actividad sobre las mismas cepas bacterianas, siendo solamente *V. cholerae* No-01 en donde no se observó actividad por parte de ambos extractos (Figura 9).

La cepa Gram positiva *S. lutea* fue la más sensible a MeOH1 (CMI: 0.125 mg/mL; CBM: 0.25 mg/mL). *S. aureus* y *S. epidermidis* fueron las más sensibles a MeOH2 (CMI: 0.50 mg/mL; CBM: 0.75 mg/mL). En cuanto a las Gram negativas, *Y. enterocolitica* fue la más sensible para MeOH1 (CMI: 0.75 mg/mL; CBM: 0.10 mg/mL), mientras que *V. cholerae* Tor y *Y. enterocolitica* las más sensibles a MeOH2 (CMI: 0.50 mg/mL; CBM: 0.75 mg/mL) (Cuadro 13).

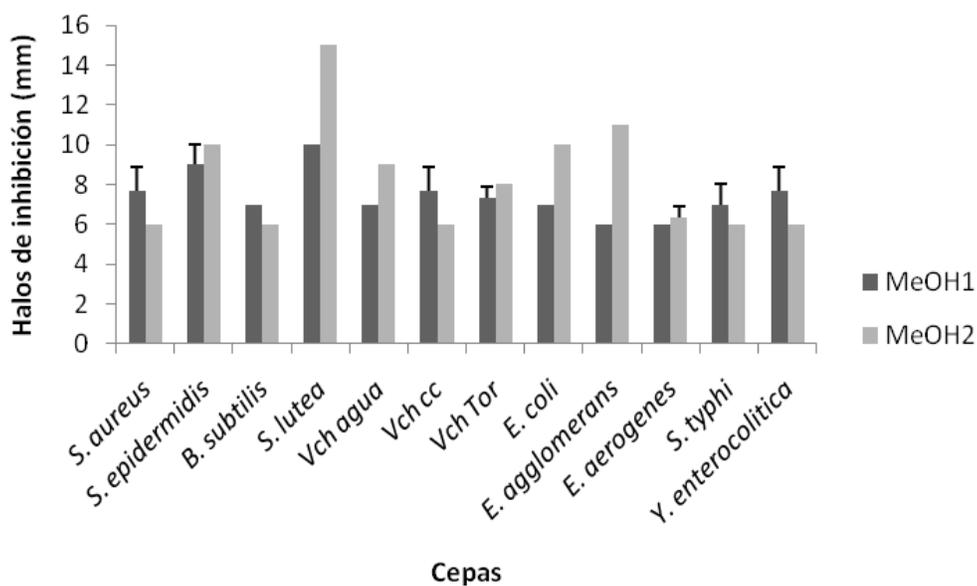


Figura 9. Actividad antibacteriana de los extractos de *C. procera*.

Cuadro 13. CMI y CBM de los extractos de *C. procera*.

Cepas	MeOH1		MeOH2	
	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>S. aureus</i>	1.50	2.00	0.50	0.75
<i>S. epidermidis</i>	1.50	2.00	0.50	0.75
<i>B. subtilis</i>	1.50	2.00	0.75	1.00
<i>S. lutea</i>	0.125	0.25	2.00	>2.00
<i>Vch agua</i>	1.50	2.00	0.75	1.00
<i>Vch cc</i>	1.50	2.00	0.75	1.00
<i>Vch Tor</i>	1.50	2.00	0.50	0.75
<i>E. coli</i>	>2.00	>>2.00	2.00	>2.00
<i>E. agglomerans</i>	>2.00	>>2.00	2.00	>2.00
<i>E. aerogenes</i>	>2.00	>>2.00	2.00	>2.00
<i>S. typhi</i>	>2.00	>>2.00	2.00	>2.00
<i>Y. enterocolitica</i>	0.75	1.00	0.50	0.75

CMI y CBM en mg/mL

→ **Actividad antibacteriana del extracto de *J. adstringens*.**

En la Figura 10 se observa que el extracto MeOH1 de *J. adstringens* presentó actividad sobre las 13 cepas bacterianas, mientras que MeOH2 solamente presentó actividad sobre once, siendo *E. aerogenes* y *S. typhi* en donde no se observó actividad.

Las cepas más sensibles a MeOH1 fueron *S. aureus*, *S. epidermidis* y *V. cholerae* cc (CMI: 0.25 mg/mL; CBM: 0.50 mg/mL). Mientras que para MeOH2 las cuatro cepas Gram positivas y cinco cepas Gram negativas (cuatro de *V. cholerae* y *Y. enterocolitica*) presentaron la misma sensibilidad (CMI: 0.5 mg/mL; CBM: 0.75 mg/mL) (Cuadro 14).

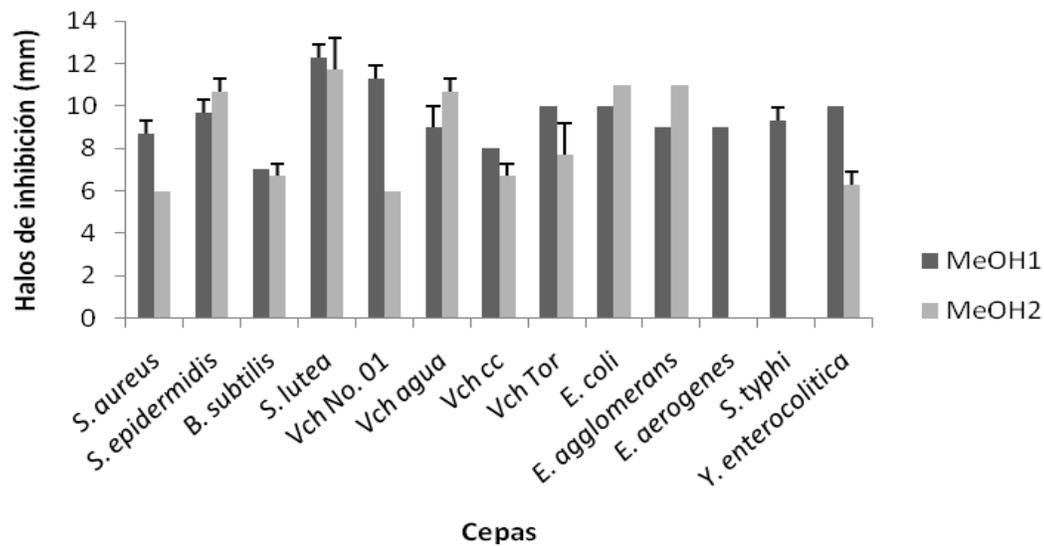


Figura 10. Actividad antibacteriana de los extractos de *J. adstringens*.

Cuadro 14. CMI y CBM de los extractos de *J. adstringens*.

Cepas	MeOH1		MeOH2	
	CMI	CBM	CMI	CBM
<i>S. aureus</i>	0.25	0.50	0.50	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>S. lutea</i>	0.50	0.75	0.50	0.75
Vch No. 01	0.50	0.75	0.50	0.75
Vch agua	0.50	0.75	0.50	0.75
Vch cc	0.25	0.50	0.50	0.75
Vch Tor	1.50	2.00	0.50	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	Na	Na
<i>S. typhi</i>	1.50	2.00	Na	Na
<i>Y. enterocolitica</i>	0.50	0.75	0.50	0.75

Na: no activo; CMI y CBM en mg/mL

★Comparación de la actividad antibacteriana de los extractos MeOH1 y MeOH2 de las tres cortezas.

En la Figura 11, se muestra la comparación de los halos de inhibición del extracto MeOH1 de las tres cortezas sobre las cepas bacterianas. En general se observa que no hubo variación en cuanto a los halos de inhibición de las cortezas, los cuales están entre los 5 y 10 mm. El ANOVA mostró que hay diferencias significativas entre las cortezas (F: 145.77, P: 0.000), las cepas (F: 80.72, P: 0.000) y existe una interacción entre corteza y cepa (F: 52.52, P: 0.000). En cuanto a la actividad antibacteriana de MeOH2 se puede observar que los halos de inhibición varían en los extractos de las tres cortezas (Figura 12). El ANOVA mostró que existen diferencias significativas entre las cortezas (F: 227.23,

P: 0.000), las cepas (F: 540.03, P: 0.000) y hay interacción entre corteza y cepa (F: 137.36, P: 0.000).

En la Figura 13 se muestra la comparación de la actividad antibacteriana del extracto MeOH1 de las tres cortezas tomando en cuenta el tipo de cepa (Gram positiva y negativa), y se observan diferencias significativas entre las cortezas (F: 4.45, P: 0.014), el tipo bacteriano (F: 14.63, P: 0.000) y existe interacción entre corteza y cepa (F: 5.42, P: 0.006).

En cuanto al extracto MeOH2 no se encontraron diferencias significativas entre las cortezas (F: 0.67, P: 0.516), pero si hay diferencias significativas (F: 34.64, P: 0.000) entre el tipo bacteriano existiendo una interacción entre corteza y cepa (F: 6.80, P: 0.002) (Figura 14).

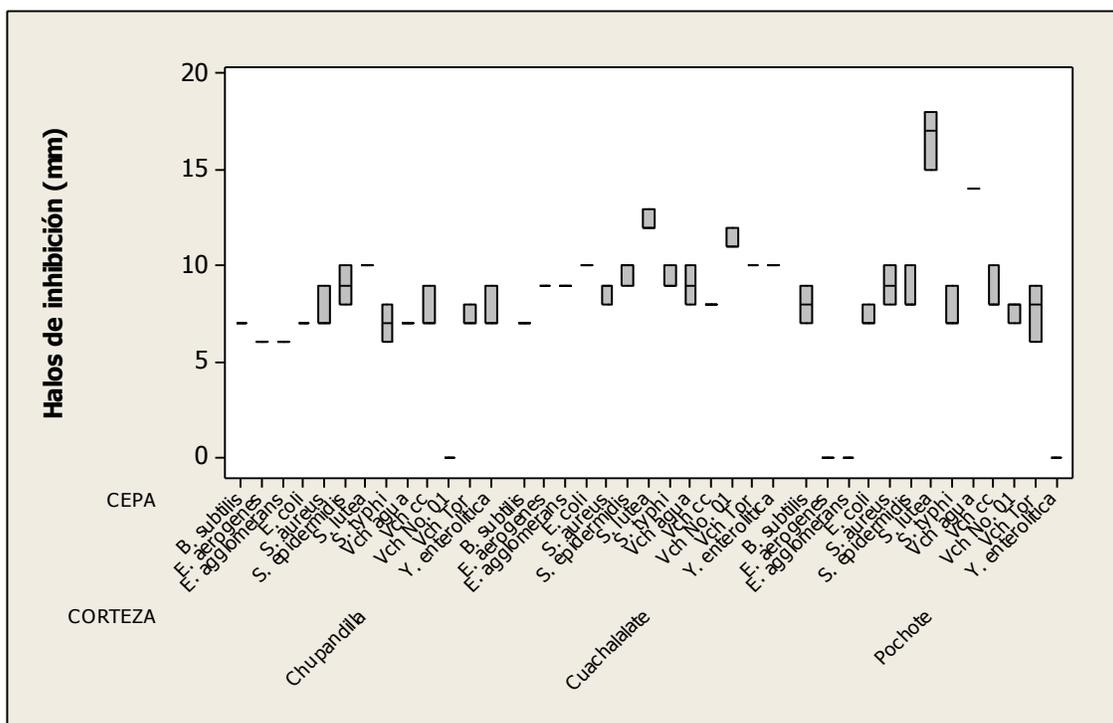


Figura 11. Comparación de los halos de inhibición de los extractos MeOH1 de las tres cortezas en las cepas bacterianas.

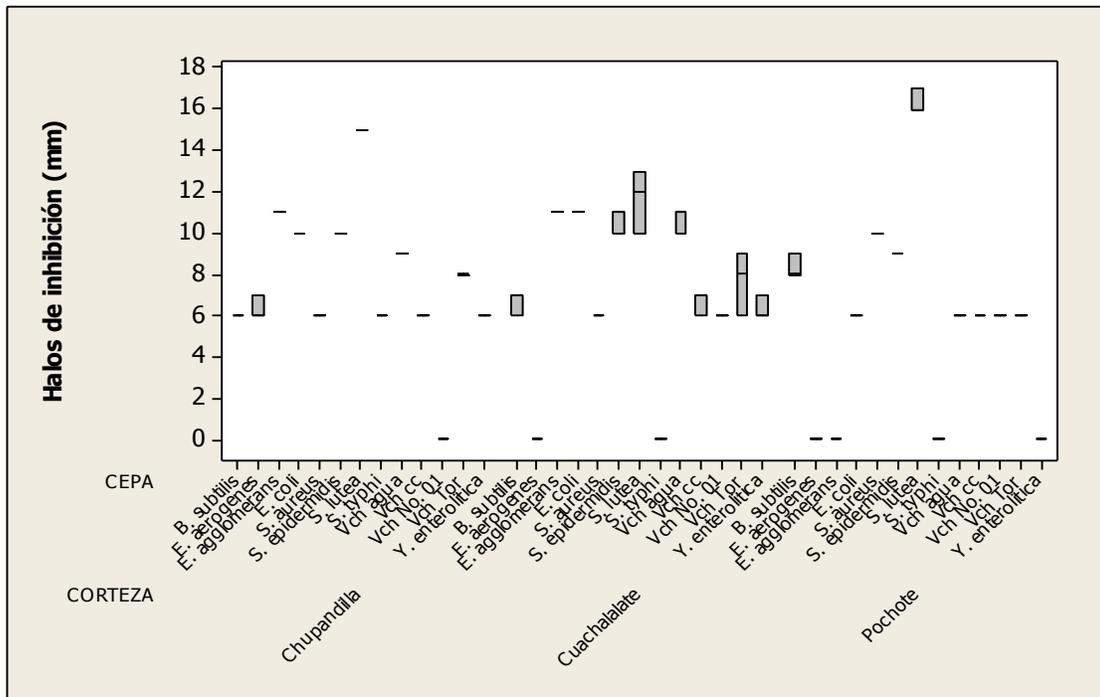


Figura 12. Comparación de los halos de inhibición de los extractos MeOH2 de las tres cortezas en las cepas bacterianas.

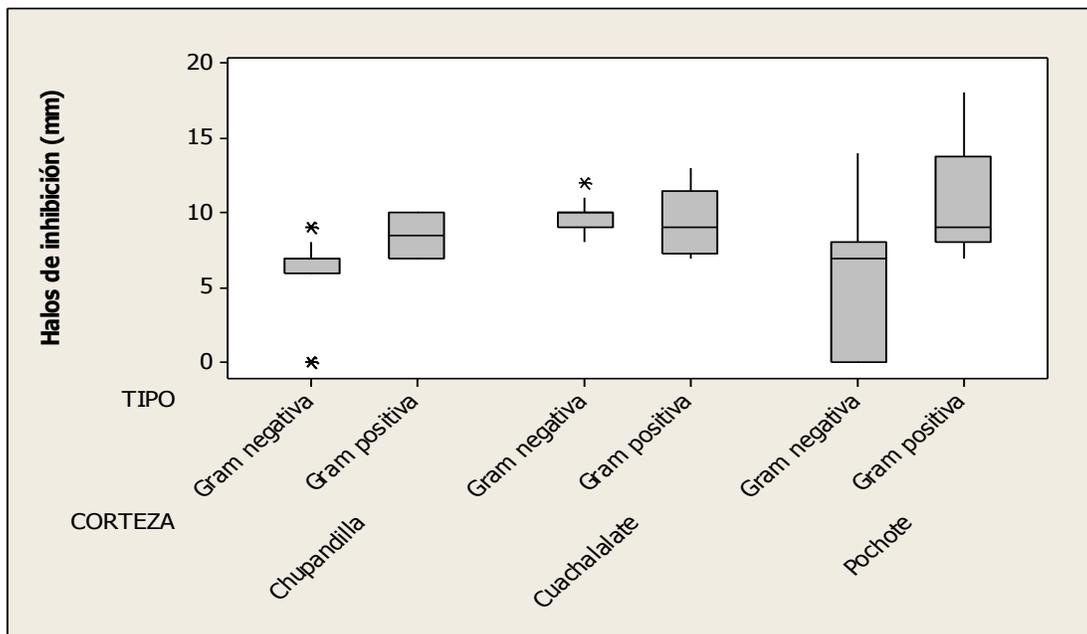


Figura 13. Comparación de los halos de inhibición de los extractos MeOH1 de las tres cortezas en cuanto al tipo de cepa bacteriana.

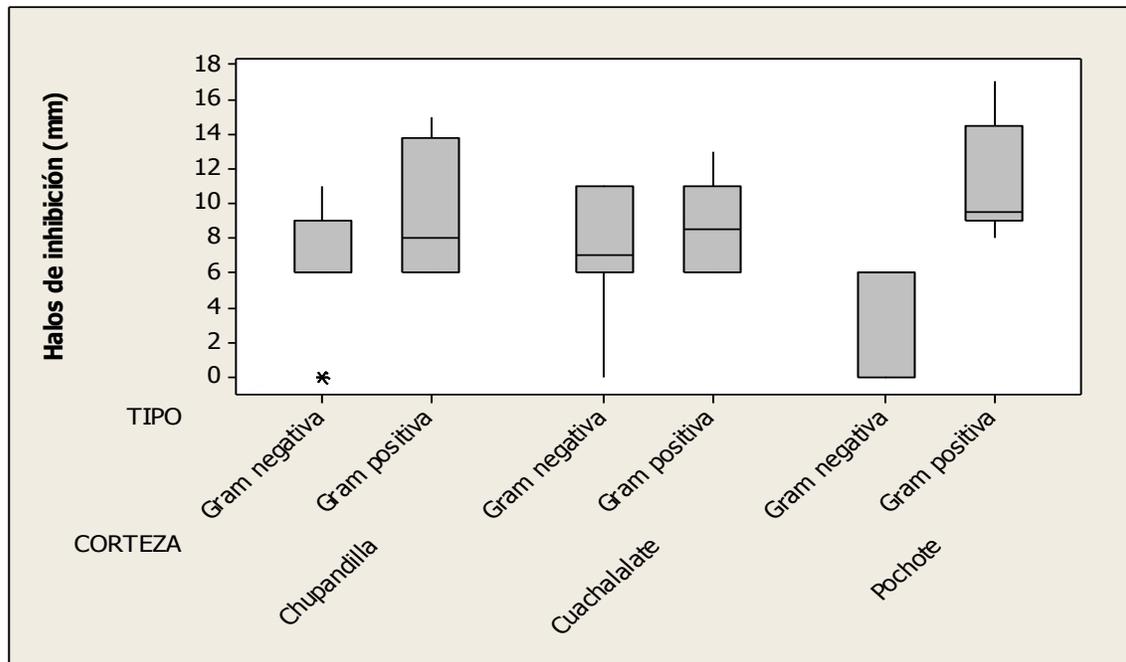


Figura 14. Comparación de los halos de inhibición de los extractos MeOH₂ de las tres cortezas en cuanto al tipo de cepa bacteriana.

En cuanto a la comparación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos MeOH₂ de tres cortezas y las 4 cepas Gram positivas, se puede observar en la Figura 15 que para *S. aureus*, *S. epidermidis* y *B. subtilis* presentan las mayores CMI para el extracto MeOH₂ de *C. esculifolia* subsp. *parvifolia* (CMI: 0.75 mg/mL), y *S. lutea* presenta las mayores concentraciones de CMI para el extracto MeOH₂ de *C. procera* (CMI: 2.00 mg/mL).

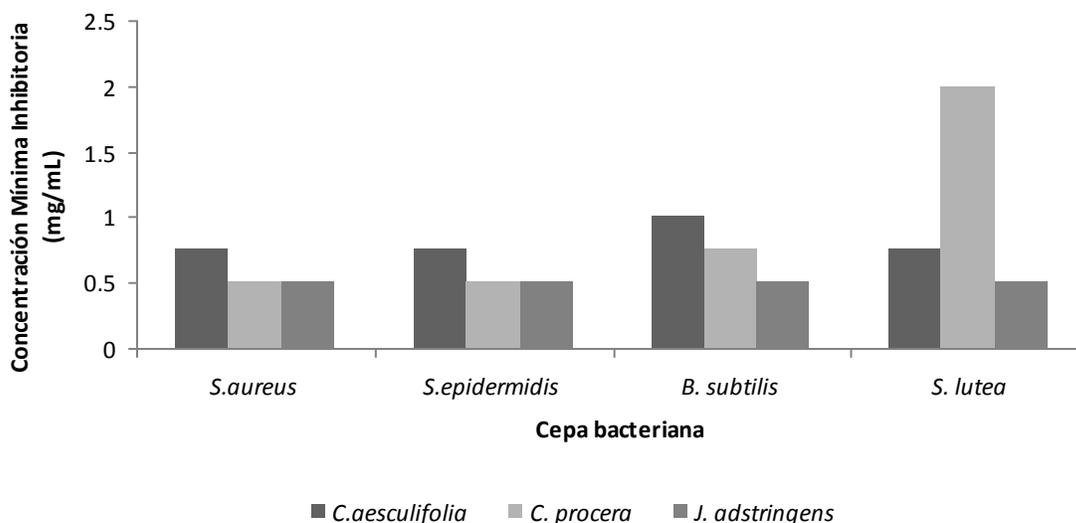


Figura 15. Comparación de la CMI de las cuatro cepas Gram positivas sobre los extractos MeOH₂ de las tres cortezas

En la Figura 16 se muestra la comparación de las 9 cepas Gram negativas y los extractos MeOH₂ las tres cortezas, observándose que para *V. cholerae* No-01, agua y Tor presentan las mayores CMI para el extracto MeOH₂ de *C. esculifolia* subsp. *parvifolia* (CMI: 0.75 mg/mL; 1.00 mg/mL; 0.75 mg/mL, respectivamente), mientras que para *V. cholerae* cc y *E. agglomerans* son más sensibles al extracto MeOH₂ de *J. adstringens* (CMI: 0.50 mg/mL; 1.00 mg/mL, respectivamente) y *S. typhi* y *E. aerogenes* solo son sensibles ante el extracto MeOH₂ de *C. procera*. Para *Y. enterocolitica* los extractos MeOH₂ de *C. procera* y *J. adstringens* presentaron la misma CMI (CMI: 0.50 mg/mL). *E. coli* es más sensible al extracto MeOH₂ de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* (CMI: 1.50 mg/mL).

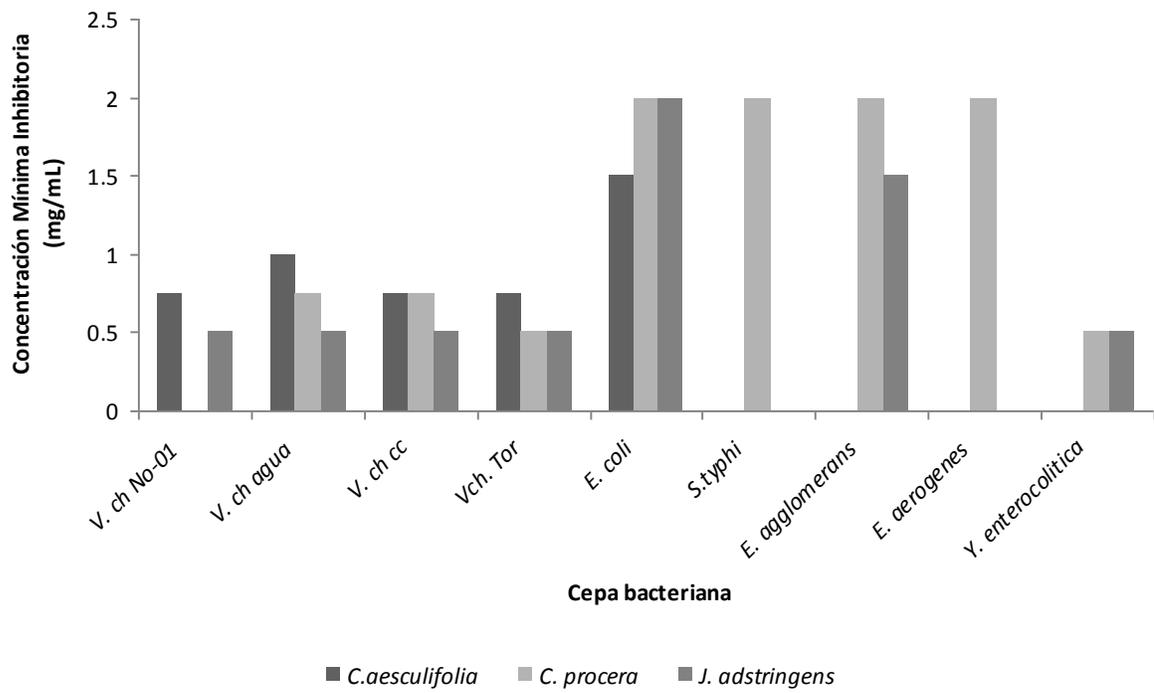


Figura 16. Comparación de la CMI de las nueve cepas Gram negativas sobre los extractos MeOH2 de las tres cortezas

D) EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

★Efecto del extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis* y *V. cholerae* Tor.

En la Figura 17 se muestra el efecto del extracto MeOH2 sobre *S. epidermidis* y se observa que la concentración de CBM (1.00 mg/mL) es bactericida a las 12 horas, siendo una curva de múltiples impactos ya que se necesitan 14 impactos antes de que se produzca la muerte de las bacterias. Mientras que las concentraciones de ½ CMI (0.375 mg/mL) y CMI (0.75 mg/mL) son bacteriostáticas.

Para *V. cholerae* Tor (Figura 18) se puede observar que a las 7 horas se inhibe el crecimiento bacteriano en un 100% para la concentración de CBM (0.75 mg/mL) y se determinó que se necesitan 14 impactos para que se produzca la inactivación total de las especies bacterianas.

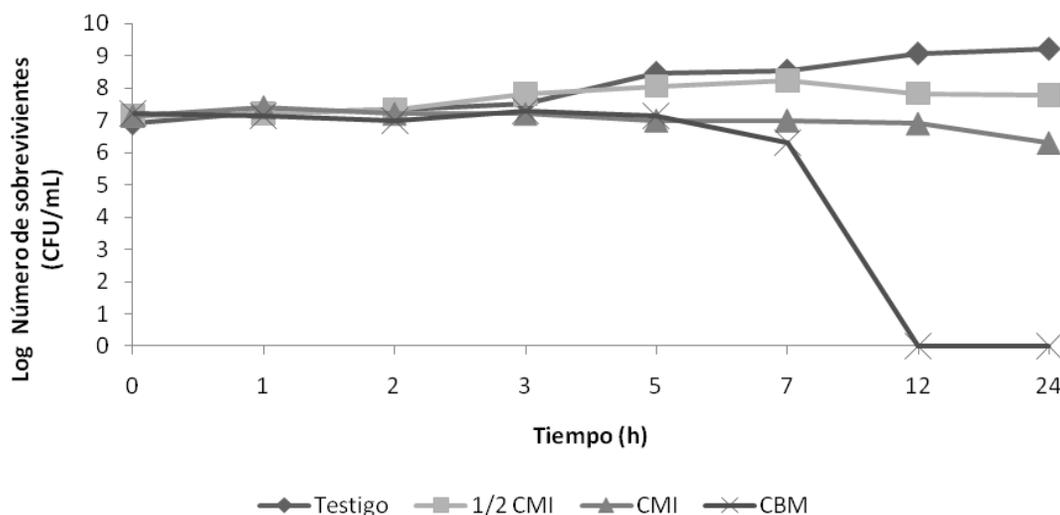


Figura 17. Efecto del extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis*: ½CMI: 0.375 mg/mL; CMI: 0.75 mg/mL; CBM: 1.00 mg/mL..

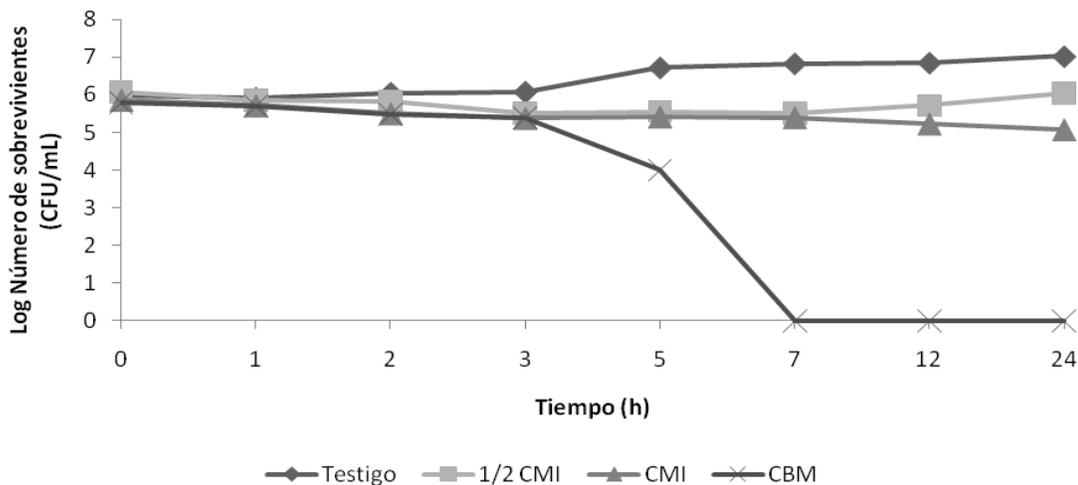


Figura 18. Efecto del extracto MeOH₂ de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* Tor: 1/2CMI: 0.25 mg/mL; CMI: 0.50 mg/mL; CBM: 0.75 mg/mL..

★Efecto del extracto MeOH₂ de *C. procera* sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis* y *V. cholerae* Tor.

En la Figura 19 se muestra el efecto del extracto MeOH₂ sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis* y se observa que la concentración de CBM (0.75 mg/mL) es bactericida a las 2 horas, requiriéndose 13 impactos antes de que se produzca la muerte de la población bacteriana. Para *V. cholerae* Tor (Figura 20), CBM (0.75 mg/mL) es bactericida a las 24 horas y se necesitan 10 impactos para matar a las bacterias.

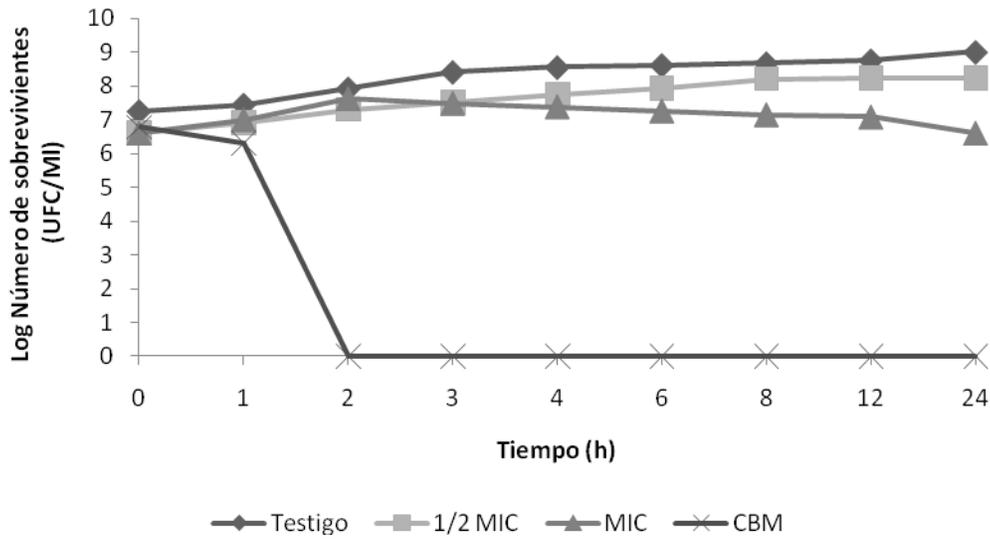


Figura 19. Efecto del extracto MeOH₂ de *C. procera* sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis*: 1/2CMI: 0.25 mg/mL; CMI: 0.50 mg/mL; CBM: 0.75 mg/mL..

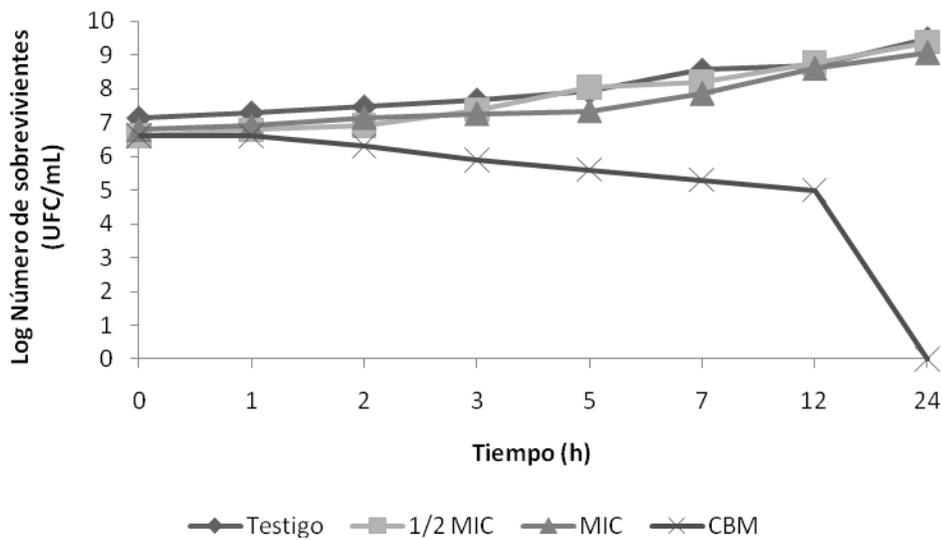


Figura 20. Efecto del extracto MeOH₂ de *C. procera* sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* Tor: 1/2CMI: 0.25 mg/mL; CMI: 0.50 mg/mL; CBM: 0.75 mg/mL..

★Efecto del extracto MeOH2 de *J. adstringens* sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* y *V. cholerae* No-01.

En la Figura 21 se muestra el efecto del extracto sobre *S. aureus* y se observa que al tiempo 3 y 7, las concentraciones de CMI y CBM (0.50 mg/mL; 0.75 mg/mL respectivamente) son bactericidas, necesitando para CBM 13 impactos para la muerte de las células bacterianas.

Para *V. cholerae* No-01 se puede observar en la Figura 22, que a las 7 horas la concentración de CBM (0.75 mg/mL) es bactericida necesitando 23 impactos para inhibir completamente el crecimiento bacteriano.

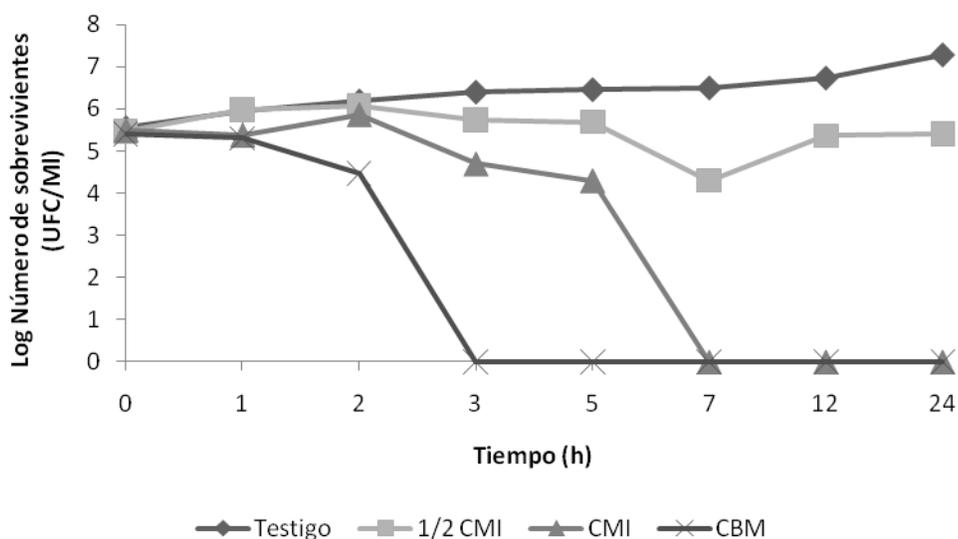


Figura 21. Efecto del extracto MeOH2 de *J. adstringens* sobre La curva de crecimiento de *S. aureus*: 1/2CMI: 0.25 mg/mL; CMI: 0.50 mg/mL; CBM: 0.75 mg/mL..

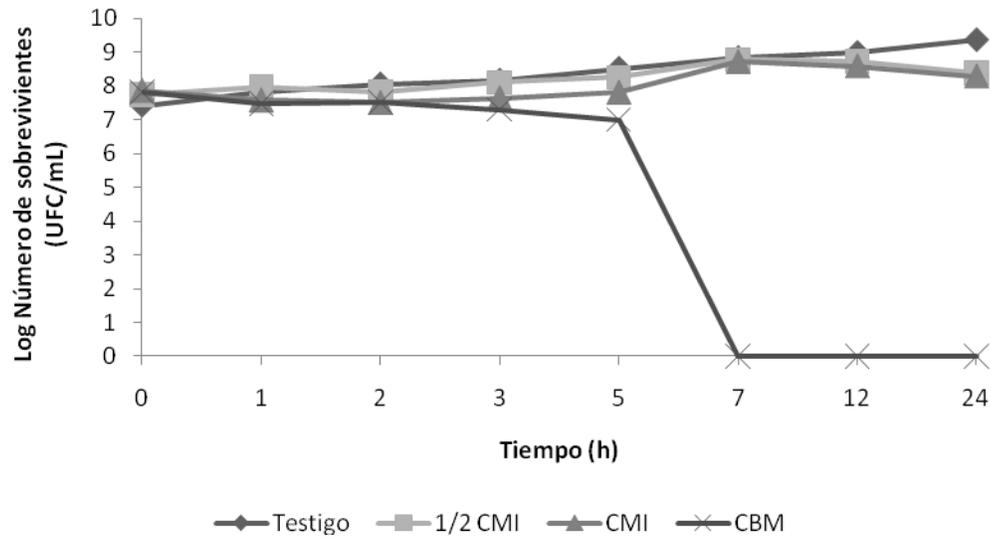


Figura 22. Efecto del extracto MeOH₂ de *J. adstringens* sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* No-01: 1/2CMI: 0.25 mg/mL; CMI: 0.50 mg/mL; CBM: 0.75 mg/mL..



E) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

En cuanto a la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de las cortezas, se observa que tanto el extracto MeOH1 y MeOH2 de las cortezas de *C. procera* y *J. adstringens* presentaron actividad antifúngica frente a *T. mentagrophytes* y el extracto MeOH1 de *C. procera* y el extracto MeOH2 de *J. adstringens* presentaron actividad antifúngica sobre *R. solani* (Cuadro 15). De acuerdo a los resultados obtenidos, los extractos de *C. aesculifolia subsp. parvifolia*, no presentaron actividad antifúngica. En cuanto a la actividad sobre las levaduras ningún extracto presentó actividad. Los extractos hexánicos no presentaron actividad antifúngica. Todas las cepas de hongos miceliados fueron sensibles al ketoconazol (control positivo).

Cuadro 15. Actividad antifúngica de los extractos de *C. procera* y *J. adstringens*.

	<i>C. procera</i>					<i>J. adstringens</i>				
	<i>Fs</i>	<i>Fm</i>	<i>An</i>	<i>Rs</i>	<i>Tm</i>	<i>Fs</i>	<i>Fm</i>	<i>An</i>	<i>Rs</i>	<i>Tm</i>
MeOH1	x	x	x	✓	✓	x	x	x	x	✓
MeOH2	x	x	x	x	✓	x	x	x	✓	✓
Hexánico	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

✓: activo; x: no activo

Para la determinación de la CF_{50} , el extracto MeOH1 de *C. procera* presentó una CF_{50} de 471.30 $\mu\text{g/mL}$ sobre *T. mentagrophytes* (Figura 23). En los demás casos se necesitan concentraciones mayores a 2,000 $\mu\text{g/mL}$ para inhibir el 50% del crecimiento fúngico.

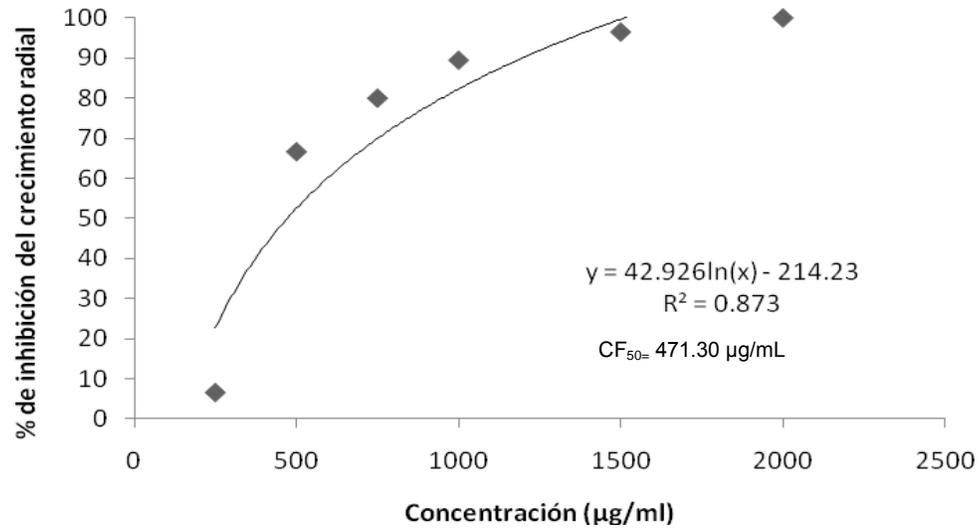


Figura 23. Porcentajes de inhibición del crecimiento radial del extracto MeOH1 de *C. procera* sobre *T. mentagrophytes*.

F) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

G) CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (CFT).

La actividad antioxidante se evaluó con los extractos MeOH2 de cada corteza. La quercetina (control positivo) mostró una CA_{50} de 4.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 24). Con respecto a los extractos de las cortezas, estas presentaron una actividad similar (Figura 25), ya que se une eficientemente al radical libre del DPPH, obteniendo los siguientes resultados: *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* obtuvo una CA_{50} de 6.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. *C. procera* CA_{50} de 4.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y *J. adstringens*, CA_{50} de 5.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

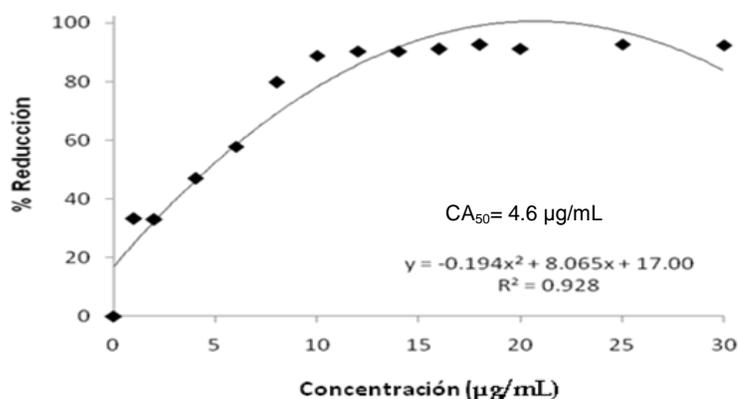


Figura 24. Actividad antioxidante de la quercetina.

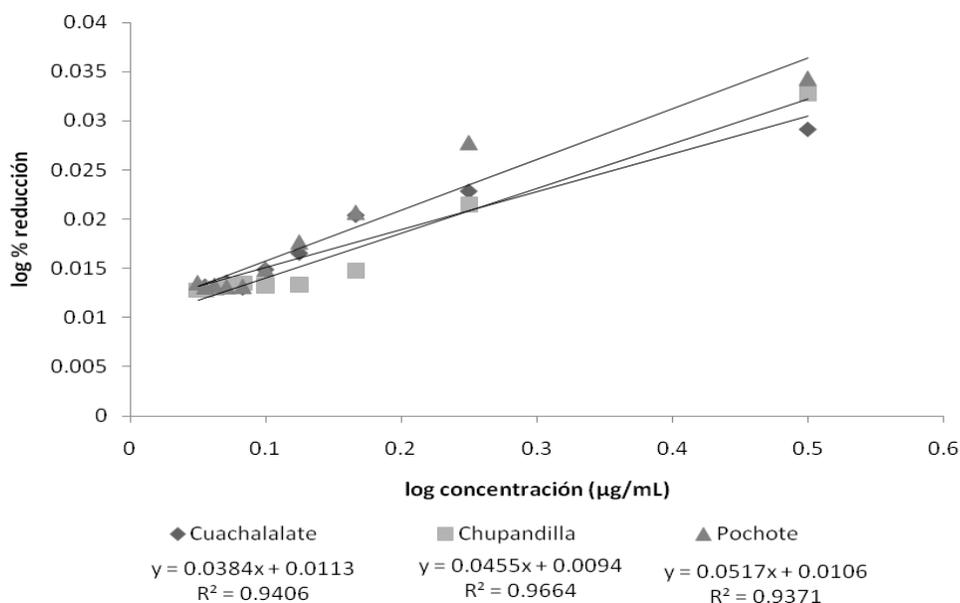


Figura 25. Actividad antioxidante de los extractos MeOH2 de las cortezas.

En el Cuadro 16 se muestran las absorbancias de los extractos MeOH₂ de cada corteza y el porcentaje de fenoles totales, como se puede observar *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* presenta 28%, *C. procera* 68% y *J. adstringens* 40% de fenoles totales.

Cuadro 16. Contenido de fenoles totales de los extractos MeOH₂ de las cortezas.

Corteza	Absorbancia	Fenoles totales (%)
<i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	0.1633	28
<i>C. procera</i>	0.2667	68
<i>J. adstringens</i>	0.1967	40

Existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de fenoles y la actividad antioxidante, en el Cuadro 17 se puede observar que entre mayor cantidad de fenoles hay en el extracto la actividad antioxidante es mayor. *C. procera* presenta la mayor actividad antioxidante y la mayor cantidad de fenoles totales, por el contrario *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* la que presentó la menor actividad antioxidante y menor cantidad de fenoles.

Cuadro 17. Comparación de la actividad antioxidante y CFT de los extracto MeOH₂ de las cortezas

Corteza	Actividad antioxidante (µg/mL)	Fenoles totales (%)
<i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	6.15	28
<i>C. procera</i>	4.78	68
<i>J. adstringens</i>	5.73	40



H) EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD GENERAL

En cuanto a la evaluación de la toxicidad general sobre larva nauplio de *A. salina*, los extractos MeOH₂ de las tres cortezas presentaron una toxicidad general alta, ya que a concentraciones menores a 10 µg/mL no sobrevive el 50%. Para el caso de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* la CL₅₀ es de 2.82 µg/mL, para *J. adstringens* de 7.33 µg/mL y en el caso de *C. procera* no sobrevivió ningún organismo a la concentración de 2 µg/mL. (Figura 26).

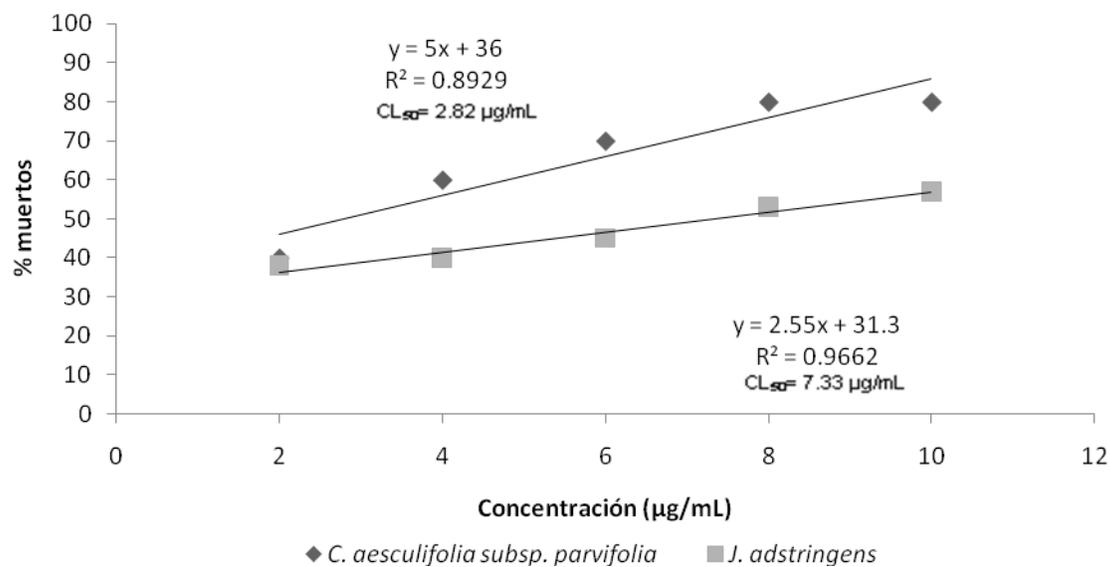


Figura 26. Toxicidad general del extracto MeOH₂ de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* y *J. adstringens*.



I) FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO

→ **Fraccionamiento del extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.**

De las 16 fracciones que se obtuvieron por medio de CC y CCF, se les evaluó la actividad antibacteriana sobre *V. cholerae* Tor, siendo las fracciones 4, 5, 6, 7 y 8, las que presentaron actividad. La fracción 6 mostró el mayor halo de inhibición (11 mm) (Cuadro 18). En el Cuadro 19 se muestran las CMI de la fracción 6 presentando actividad antibacteriana en 9 de las 13 cepas bacterianas, siendo las cepas más sensibles: *V. cholerae* No-01, *V. cholerae* Tor y *P. aeruginosa*, todas con CMI de 0.5 mg/mL.

Cuadro 18. Actividad antibacteriana sobre *V. cholerae* Tor de las fracciones del extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

Fracción	Halo de inhibición (mm)
4	8
5	6
6	11
7	8
8	10

Mediciones con respecto a una repetición.

Cuadro 19. CMI de la Fracción 6 del extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

Cepa	CMI (mg/mL)
<i>S. aureus</i>	0.75
<i>S. epidermidis</i>	0.75
<i>E. aerogenes</i>	1.00
<i>V. cholerae</i> No-01	0.5
<i>V. cholerae</i> Tor	0.5
<i>E. agglomerans</i>	0.75
<i>E. coli</i>	1.00
<i>P. aeruginosa</i>	0.5
<i>Y. enterocolitica</i>	0.75

Se evaluó el efecto de la Fracción 6 sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis* y *V. cholerae* No-01 ya que obtuvieron la menor CMI (0.075 mg/mL y 0.5 mg/mL respectivamente). En la Figura 27 se muestra el efecto de la fracción 6 sobre *S. epidermidis*, en donde se observa que las concentraciones de $\frac{1}{2}$ CMI y CMI (0.375 mg/mL y 0.75 mg/mL respectivamente) son bacteriostáticas, lo mismo se observa en *V. cholerae* No-01 ($\frac{1}{2}$ CMI : 0.25 mg/mL; CMI: 0.50 mg/mL) (Figura 28).

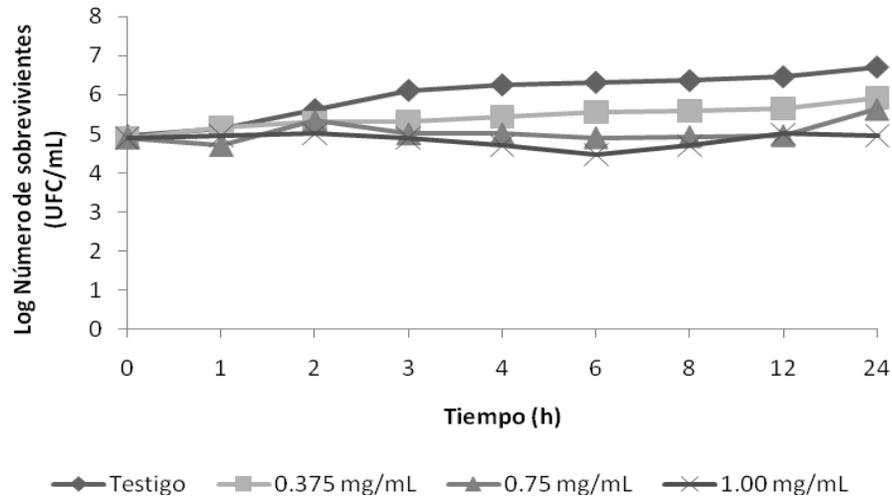


Figura 27. Efecto de la Fracción 6 del extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis*.

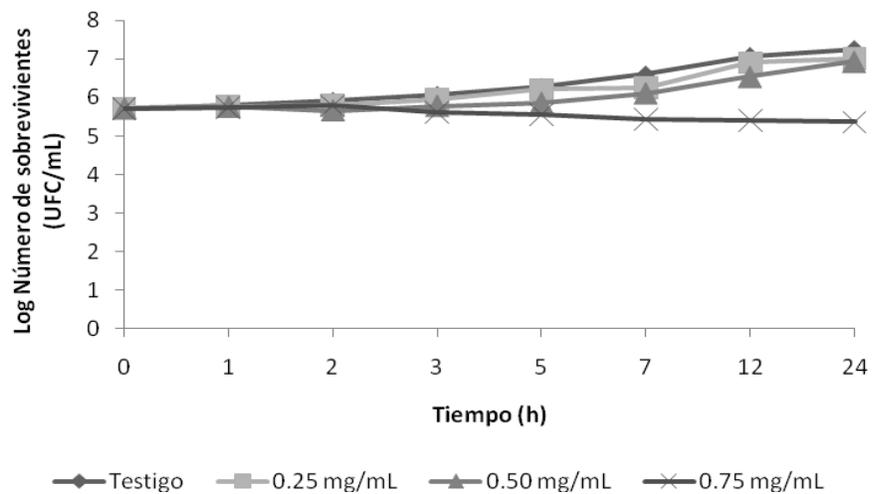


Figura 28. Efecto de la Fracción 6 del extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* No-01.

En la Figura 29, se muestra la evaluación de la actividad antioxidante de la Fracción 6, obteniendo una CA_{50} de 3.57 $\mu\text{g/mL}$. A comparación de la CA_{50} del extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* (CA_{50} : 6.15 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 25), se observa que los compuestos que constituyen a la fracción presentan mejor capacidad antioxidante.

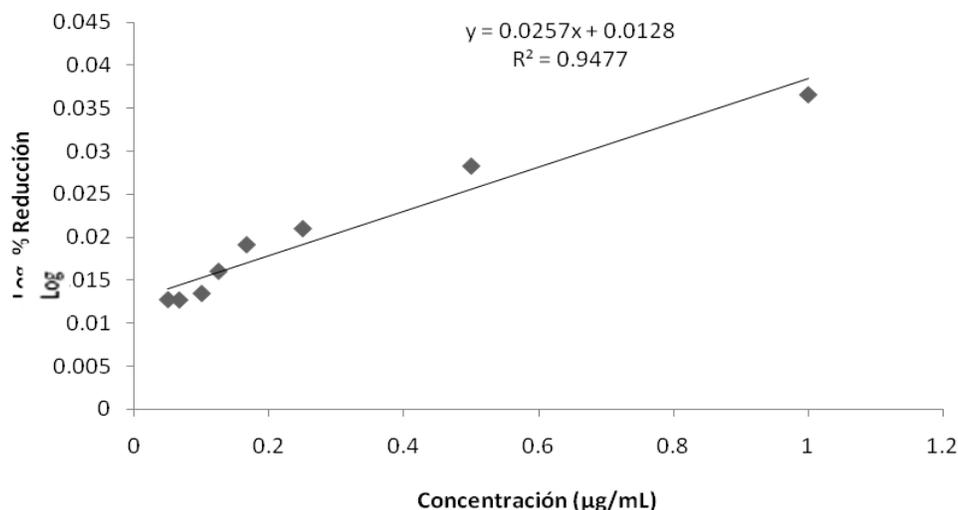


Figura 29. Porcentajes de reducción de la Fracción 6 del extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

También se obtuvo el CFT de la Fracción 6, encontrando que la fracción posee 50% de fenoles totales. También se le realizaron pruebas cualitativas para la presencia de fenoles y alcaloides (Apéndice 9). La Fracción 6 resultó ser positiva para cloruro férrico (presencia de fenoles), y para Dragendorff y Mayer que detectan presencia de alcaloides resultó negativo.

Los cromatogramas del análisis por HPLC de las fracciones 5, 6 y 7 se observan en las Figuras 30 a 32. En el Cuadro 20 se hace una comparación de las tres fracciones, encontrando que la Fracción 5 posee una mayor cantidad de compuestos, identificando terpenos y fenilpropanoides en su composición. En cuanto a la Fracción 6 se identifica la presencia de un fenilpropanoide, una isoflavona y una cumarina, y para la fracción 7 se identifican fenoles y fenilpropanoide. Esta identificación preliminar es con base a los tiempos de retención y su espectro de absorción bajo luz UV.

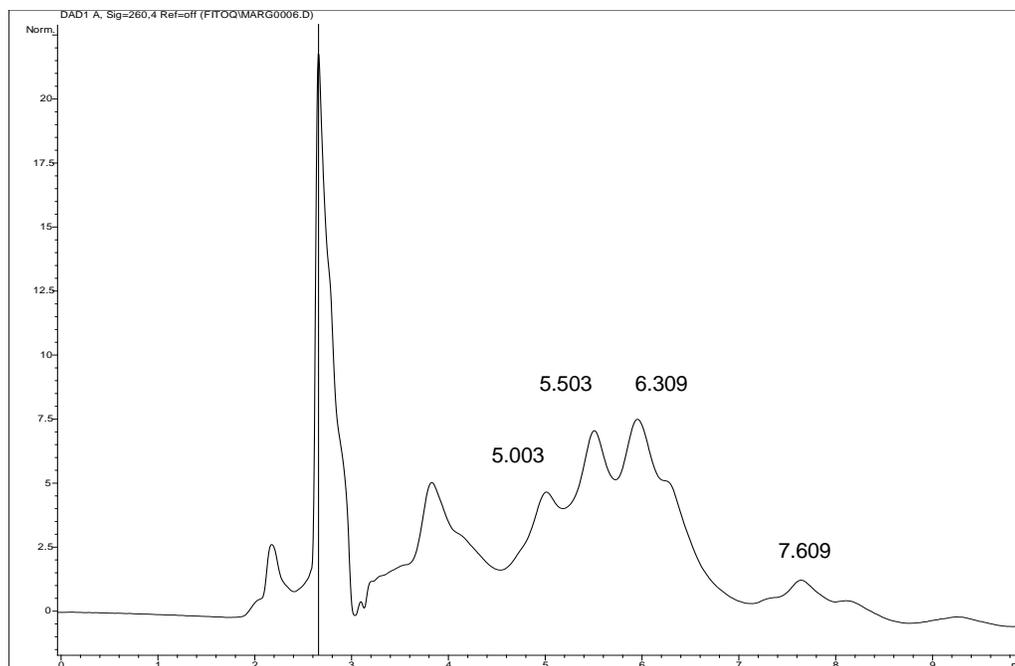


Figura 30. Cromatograma de la Fracción 5 del extracto MeOH₂ de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

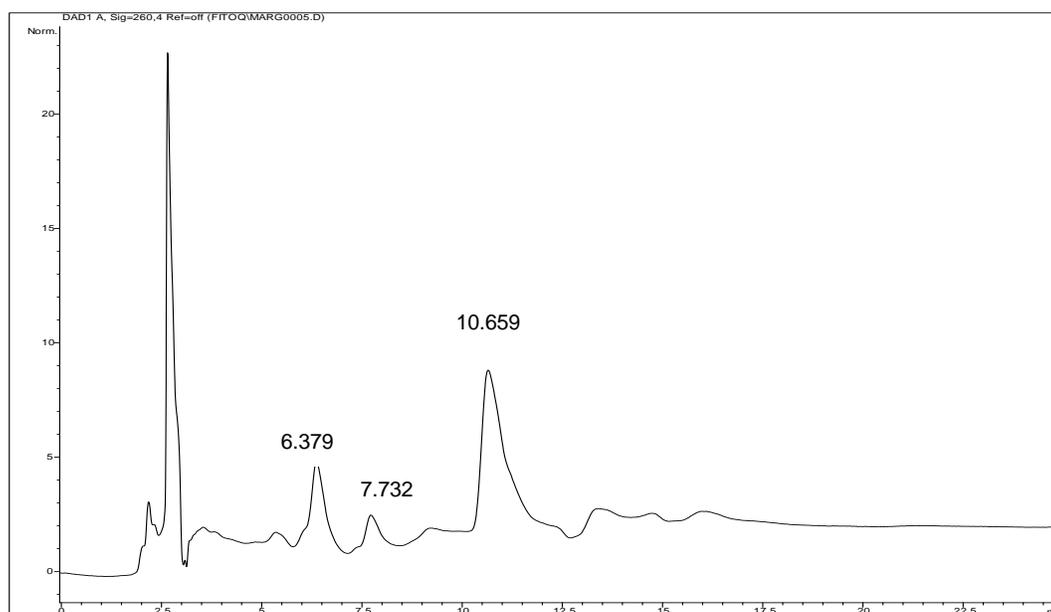


Figura 31. Cromatograma de la Fracción 6 del extracto MeOH₂ de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

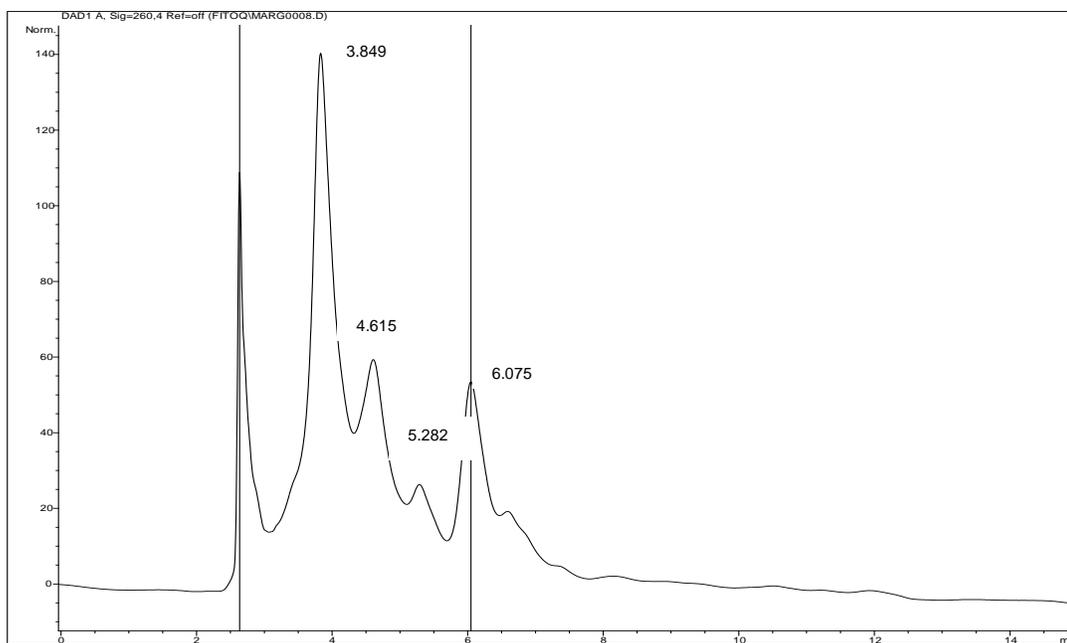


Figura 32. Cromatograma de la Fracción 7 del extracto MeOH₂ de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*..

Cuadro 20. Compuestos presentes en las fracciones 5, 6 y 7 del extracto MeOH₂ de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*

Fracción	Tiempo de retención	UV λ_{\max} (nm)	Compuesto
5	2.676	236	Terpeno
	3.822	236	Terpeno
	5.003	278	Fenilpropanoide
	5.503	280	Fenilpropanoide
	6.309	282	Fenilpropanoide
	7.609	232,282,310	Fenilpropanoide
6	6.379	284	Fenilpropanoide
	7.732		Isoflavona
	10.659	258	Cumarina
7	3.849	264,280	Fenol
	4.615	236,280	Fenilpropanoide
	5.282	236,276	Fenol
	6.075	236,262,282	Isoflavona

→ **Fraccionamiento del extracto MeOH2 de *C. procera***

De las 35 fracciones obtenidas de la CC y CCF, 23 mostraron actividad sobre *S. epidermidis* (Cuadro 21), la fracción más activa fue la 5, seguida de la fracción 6 y 7 (21, 17 y 17 mm, respectivamente).

Cuadro 21. Actividad antibacteriana sobre *S. epidermidis* de las fracciones del extracto MeOH2 de *C. procera*.

Fracción	Halo de Inhibición (mm)	Fracción	Halo de Inhibición (mm)
1	Na	19	8
2	Na	20	7
3	10	21	9
4	Na	22	9
5	21	23	9
6	17	24	11
7	17	25	Na
8	16	26	Na
9	14	27	Na
10	15	28	Na
11	11	29	Na
12	15	30	Na
13	13	31	8
14	12	32	7
15	11	33	Na
16	10	34	Na
17	9	35	7
18	Na		

Na: No activa; Mediciones con respecto a una repetición.

Debido a que la fracción 7 tuvo mayor rendimiento (3.466 g), se decidió obtener la CMI y CBM de esta fracción sobre las cepas bacterianas. Como se observa en el Cuadro 22, las concentraciones para CMI y CBM son menores que las obtenidas con el extracto MeOH2. Comparando el efecto las bacterias Gram positivas resultan ser las más

sensibles a la fracción, en particular *S. epidermidis* y *B. subtilis* al requerir valores de CMI y CBM de 0.0625 a 0.125 mg/mL respectivamente. En cuanto a las bacterias Gram negativas, la más sensible fue *E. aerogenes* pues necesita concentraciones de 0.25 y 0.75 mg/mL de CMI y CBM respectivamente.

Cuadro 22. CMI y CBM de la Fracción 7 del extracto MeOH2 de *C. procera*.

Cepa	CMI	CBM
<i>S. aureus</i>	0.125	0.25
<i>S. epidermidis</i>	0.062	0.125
<i>B. subtilis</i>	0.062	0.125
<i>S. lutea</i>	0.75	1.00
<i>V. cholerae</i> No-01	0.50	1.00
<i>V. cholerae</i> agua	0.50	1.00
<i>V. cholerae</i> cc	0.50	1.00
<i>V. cholerae</i> Tor	0.75	1.00
<i>E. coli</i>	0.50	0.75
<i>E. agglomerans</i>	0.50	1.50
<i>E. aerogenes</i>	0.25	0.75

CMI y CBM en mg/mL.

Tomando estos resultados se determinó el efecto de la Fracción 7 sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis* y *V. cholerae* Tor. En la Figura 33 se observa la curva de crecimiento de *S. epidermidis* y se puede determinar que a la concentración de CBM (0.125 mg/mL) la fracción es bactericida a las 8 horas. Es una curva de múltiples impactos ya que se necesitan 15 impactos antes de que se produzca la inactivación total de la población bacteriana.

Para *V. cholerae* Tor se puede observar en la Figura 34, que a las 3 horas se inhibe el crecimiento bacteriano en un 100% para la concentración de CBM (1.00 mg/mL) y se

determinó que se necesitan 15 impactos antes de que se produzca la inactivación total de las especies bacterianas.

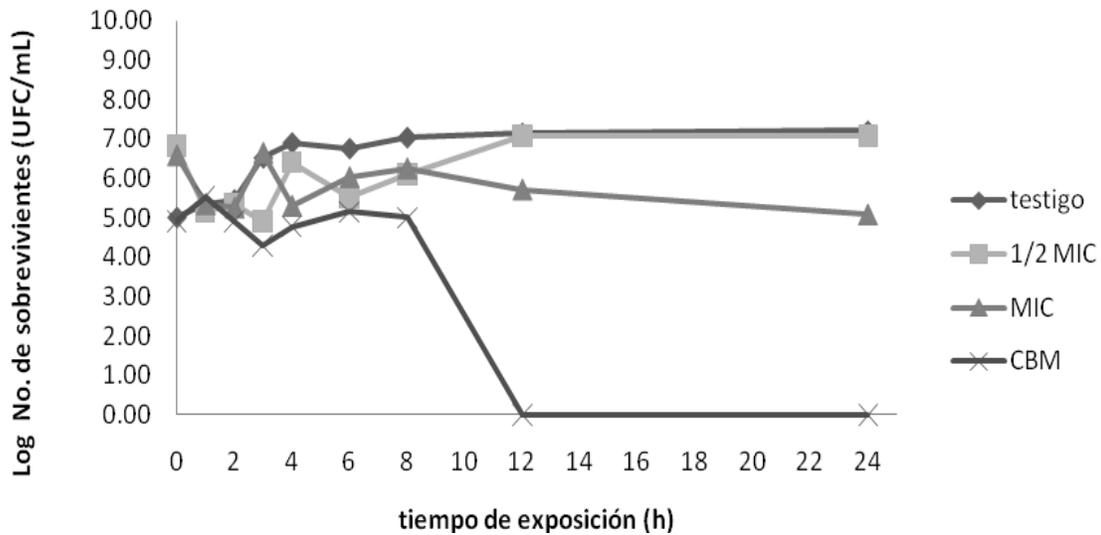


Figura 33. Efecto de la Fracción 7 del extracto MeOH₂ de *C. procera* sobre la curva de crecimiento de *S. epidermidis*: 1/2CMI= 0.312 mg/mL; CMI= 0.0626 mg/mL; CBM= 0.125 mg/mL.

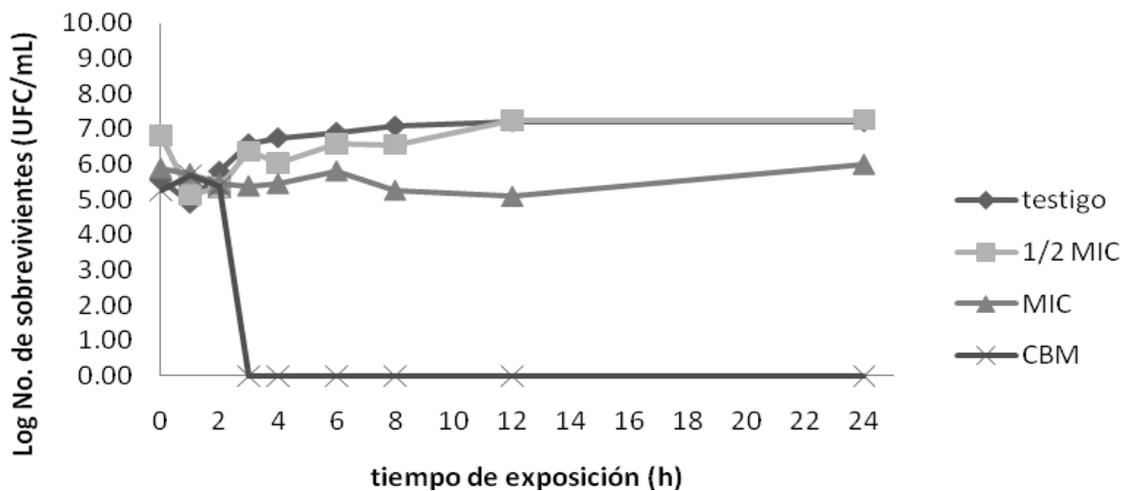


Figura 34. Efecto de la Fracción 7 del extracto MeOH₂ de *C. procera* sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* Tor: 1/2CMI= 0.375 mg/mL; CMI= 0.75mg/mL; CBM= 1.00 mg/mL.

Con esta misma fracción se evaluó la CA_{50} y el CFT, obteniendo que la fracción 7 tiene una gran capacidad antioxidante ya que tiene una CA_{50} de 0.6538 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 35). En cuanto al CFT se obtuvo que la fracción posee 97% de fenoles totales.

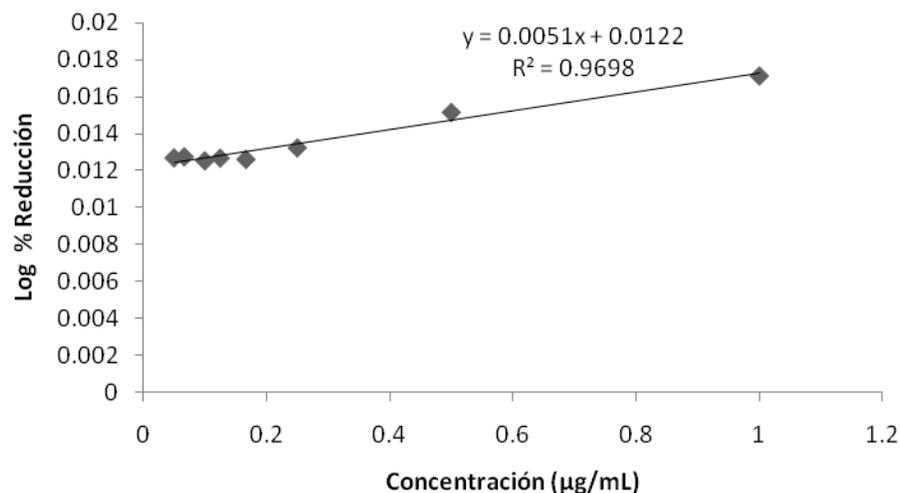


Figura 35. Porcentaje de reducción de la Fracción 7 del extracto MeOH₂ de *C. procera*.

A la Fracción 7 se le realizaron pruebas cualitativas para la presencia de fenoles y alcaloides (Apéndice 9). La fracción resultó ser positiva para cloruro férrico (presencia de fenoles), y para Dragendorff y Mayer que detectan presencia de alcaloides resultó negativo.

Los cromatogramas del HPLC de las fracciones 5, 6 y 7 comparadas con patrones de ácido gálico, catequina, catecol y quercetina, se muestran en las Figuras 36, 37 y 38. Se encontró que en la Fracción 5, se comprobó la presencia de catecol y catequina (Tr: 4.668 y 3.799 min respectivamente). En las Fracciones 6 y 7 se encontró la presencia de ácido gálico (Tr: 3.110 y 3.103 min respectivamente).

En el Cuadro 23 se muestran los principales compuestos de cada fracción, para la Fracción 5 aparte de la presencia de catecol y catequina se encuentran fenoles y fenilpropanoides, para las Fracciones 6 y 7 se encuentra ácido gálico y fenoles.

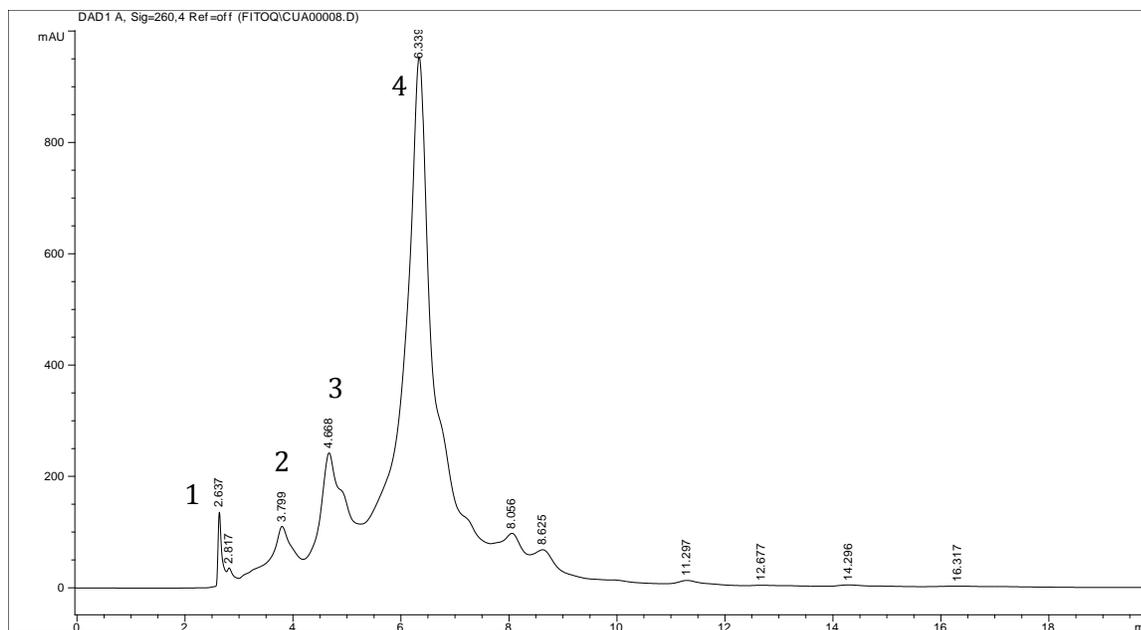


Figura 36. Cromatograma de la Fracción 5 del extracto MeOH₂ de *C. procera*.

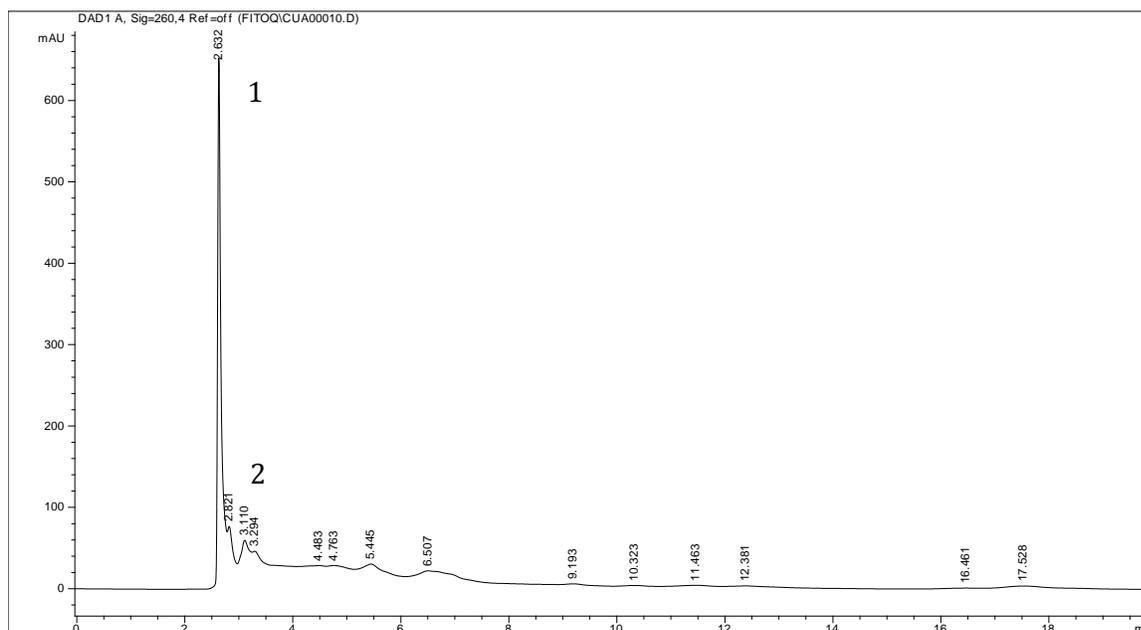


Figura 37. Cromatograma de la Fracción 6 del extracto MeOH₂ de *C. procera*.

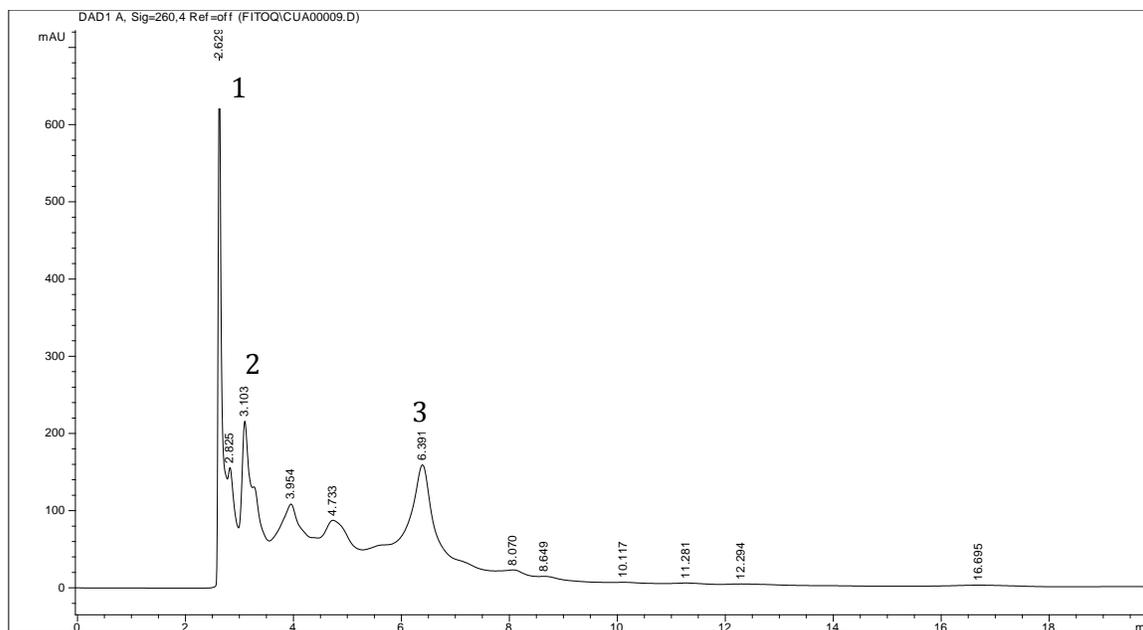


Figura 38. Cromatograma de la Fracción 7 del extracto MeOH₂ de *C. procera*.

Cuadro 23. Principales compuestos presentes en las fracciones 5, 6 y 7 del extracto MeOH₂ de *C. procera*..

Fracción	Compuestos	Tiempo de retención (min)	UV λ_{\max} (nm)	Compuesto
5	1	2.637	236, 277	Fenol
	2	3.799		Catequina
	3	4.799		Catecol
	4	6.339	278	Fenilpropanoide
6	1	2.632	236, 278	Fenol
	2	3.110	273	ác. gálico
7	1	2.629	236, 278	Fenol
	2	3.103	273	ác. gálico
	3	6.391	236, 278	Fenol

→ **Fraccionamiento del extracto MeOH₂ de *J. adstringens*.**

De la CC y CCF del extracto MeOH₂ de *J. adstringens* se obtuvieron 61 fracciones. De la evaluación de la actividad antibacteriana sobre *V. cholerae* No-01, se obtuvieron 17 fracciones activas, siendo la fracción 3 la que presentó un mayor halo de inhibición (Cuadro 24).

Cuadro 24. Actividad antibacteriana de las fracciones del extracto MeOH₂ de *J. adstringens* sobre *V. cholerae* No-01.

Fracción	Halo de inhibición (mm)
1	10
2	12
3	14
4	13
5	9
6	8
7	8
8	8
9	6
10	6
11	7
12	11
13	7
14	9
15	11
16	6
17	7

Mediciones con respecto a una repetición.

Se determinó CMI y CBM de la Fracción 3. En el Cuadro 25 se puede observar que las bacterias Gram positivas fueron las más sensibles, pues requieren de bajas concentraciones para inhibir su crecimiento (CMI= 0.25 mg/mL; CBM= 0.5 mg/mL). Sin embargo, para las diferentes cepas de bacterias Gram negativas se requieren concentraciones mayores, siendo *V. cholerae* (cc, No-01 y agua) las que mostraron mayor sensibilidad a la Fracción 3 (CMI= 0.25 mg/mL; CBM= 0.5 mg/mL).

Cuadro 25. CMI y CBM de la Fracción 3 del extracto MeOH₂ de *J. adstringens*.

Cepa	CMI	CBM
<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	0.50
<i>V. cholerae cc</i>	0.25	0.50
<i>V. cholerae tor</i>	1.5	2.00
<i>E. coli</i>	2.00	3.00
<i>E. agglomerans</i>	2.00	3.00
<i>E. aerogenes</i>	2.00	3.00
<i>S. typhi</i>	1.50	2.00

CMI y CBM en mg/mL.

Por falta de rendimiento de la Fracción 3 (Cuadro 5), se decidió realizar las pruebas de antioxidantes y CTF con la fracción 9. En la Figura 39 se muestran los porcentajes de reducción de la fracción 9 a diferentes concentraciones obteniéndose una CA₅₀ de 8.025 µg/mL y en cuanto al CTF posee 34% de fenoles. En comparación con el extracto MeOH₂, éste posee una mayor cantidad de fenoles (40%) que la fracción.

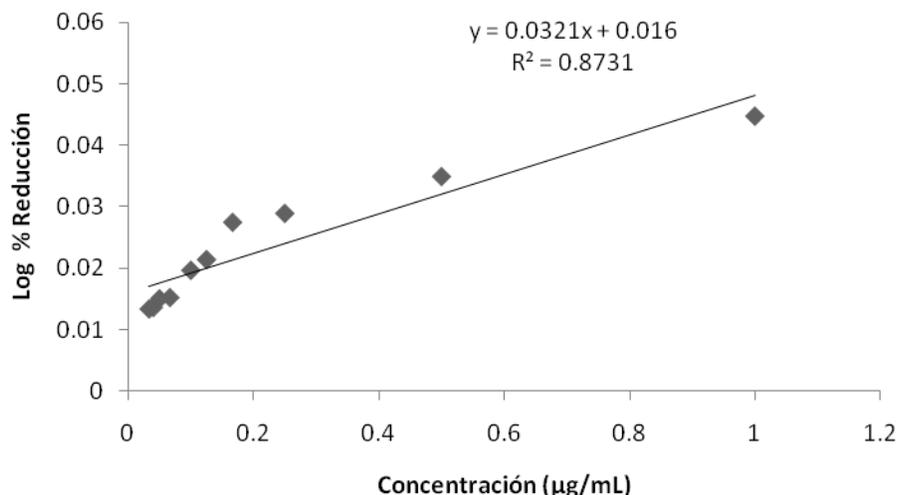


Figura 39. Porcentaje de reducción de la Fracción 9 del extracto MeOH₂ de *J. adstringens*.

El rendimiento de la Fracción 3 fue escaso (0.1797 g), por lo que no se evaluó el efecto sobre la curva de crecimiento bacteriano ni su actividad antioxidante y CFT. El análisis por HPLC de las fracciones 3 y 9 mostró que en ninguna estuvieron presentes los patrones de referencia (ácido gálico, catequina, catecol y quercetina). En la Figura 40 se presenta el cromatograma de la Fracción 3, en donde se observan dos picos mayoritarios (*b* y *c*), los cuales tienen un tiempo de retención de 3.9 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 26). Sin embargo, también se puede observar que la fracción no es totalmente pura debido a la presencia de otros compuestos.

También se obtuvo el cromatograma de la fracción activa 9 (Figura 41), en donde se observa que el pico de mayor abundancia fue el *e* 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 (Cuadro 26).

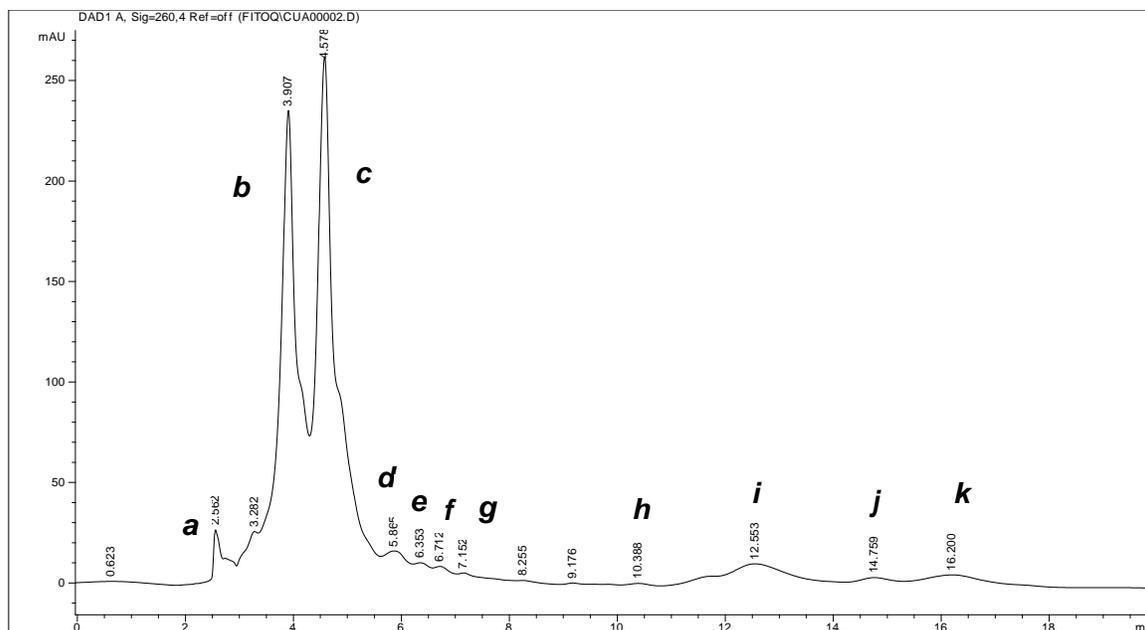


Figura 40. Cromatograma de la Fracción 3 del extracto MeOH2 de *J. adstringens*.

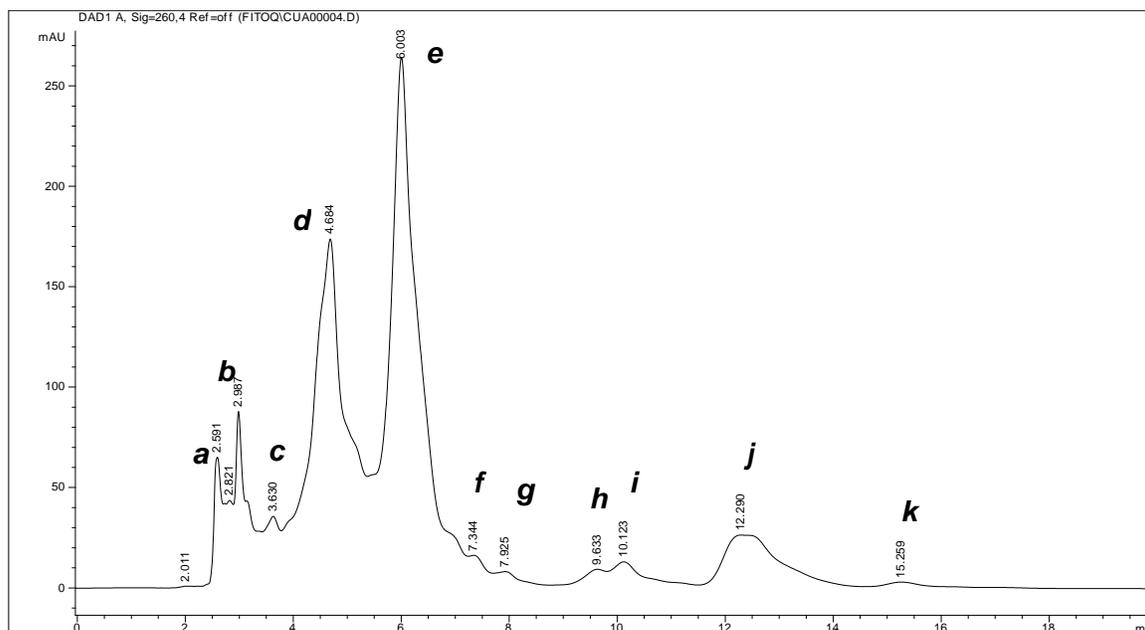


Figura 41. Cromatograma de la Fracción 9 del extracto MeOH2 de *J. adstringens*.

Cuadro 26. Tiempo de retención y máxima absorción de los compuestos presentes en las fracciones 3 y 9 extracto MeOH2 de *J. adstringens*.

Fracción	Compuesto	Tiempo de retención (min)	UV λ_{max} (nm)	Compuestos
3	a	2.56	236,280	Fenilpropanoide
	b	3.90	374,356	
	c	4.58	256,356	
	d	5.87	236,286	Fenilpropanoide
	e	6.38	236,346	Fenilpropanoide
	f	6.74	236,286,312	Fenilpropanoide
	g	7.18	236,272	Fenilpropanoide
	h	10.35	236,272	Fenilpropanoide
	i	12.56	240,286,312	Fenilpropanoide
	j	14.72	238,288,312	Fenilpropanoide
	k	16.18	236,270,288,364	
9	a	2.60	236,272	
	b	2.98	270	
	c	3.62	284	
	d	4.68	237,292	Fenilpropanoide
	e	6.00	237,294	Fenilpropanoide
	f	7.37	236,288	Fenilpropanoide
	g	7.92	236,286	Fenilpropanoide
	h	7.93	258,266,358	
	i	10.10	264,364	
	j	12.14	253,364	
	k	15.23	250,366	

→ Comparación de las actividades biológicas de los extractos y las fracciones.

En el Cuadro 27, se hace la comparación entre los extractos MeOH₂ de las tres cortezas contra las fracciones más activas de estas. En cuanto a la evaluación sobre la curva de sobrevivencia bacteriana, se encuentra que para *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, el extracto MeOH₂ es mejor en comparación a la Fracción 6, ya que esta fue bacteriostática siendo que el extracto crudo es bactericida. Con respecto a la actividad antioxidante la fracción tiene mejor capacidad antioxidante ($CA_{50}=3.57 \mu\text{g/mL}$), con un CFT del 50% en comparación del extracto MeOH₂ que obtuvo una CA_{50} de $6.51 \mu\text{g/mL}$ y un CFT de 28%.

Para *C. procera* se observa que no hay mucha diferencia entre las curvas de sobrevivencia bacteriana del extracto MeOH₂ y la fracción 7. Sin embargo, para la evaluación de la actividad antioxidante, la fracción tiene una mejor capacidad antioxidante que el MeOH₂, con $0.654 \mu\text{g/mL}$ y $4.78 \mu\text{g/mL}$ respectivamente y siendo que la fracción tiene un mayor porcentaje de fenoles totales (97%) que el extracto (68%).

En cuanto a *J. adstringens*, por falta de rendimiento de las Fracciones no se pudieron evaluar la actividad antibacteriana sobre las curvas de sobrevivencia, sin embargo la comparación se puede hacer con base a la actividad antioxidante y al CFT. Siendo el extracto MeOH₂ el que presentó una mejor CA_{50} con 5.73 y un CFT de 40% y la Fracción 3 obtuvo un CA_{50} de 8.025 y un CFT de 34%.

Cuadro 27. Comparación de los extractos de las tres cortezas y sus fracciones mas activas.

Extracto MeOH2	<i>Ceiba</i>		
	<i>aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	<i>Cyrtocarpa procera</i>	<i>Juliana adstringens</i>
Actividad antibacteriana			
4 gram positivas	4	4	4
9 Gram negativas	5	8	7
Curva letal			
Gram positiva	<i>S. epidermidis</i> Bactericida 12 hrs 14 impactos	<i>S. epidermidis</i> Bactericida 2 hrs 13 impactos	<i>S. aureus</i> Bactericida 3 hrs 13 impactos
Gram negativa	<i>V. cholerae</i> Tor Bactericida 7 hrs 14 impactos	<i>V. cholerae</i> Tor Bactericida 24 hrs 10 impactos	<i>V. cholerae</i> No-01 Bactericida 7 hrs 23 impactos
Actividad antifúngica			
CF ₅₀	-----	471.30 µg/m	<i>R. solani</i> , <i>T. mentagrophytes</i> >2,000 µg/mL
Actividad antioxidante			
CA ₅₀	6.15 µg/mL	4.78 µg/mL	5.73 µg/mL
CFT	28%	68%	40%
Toxicidad general			
CL ₅₀	2.82 µg/mL	0 µg/mL	7.33 µg/mL
Fracciones obtenidas por CC y CCF			
Fracciones activas	6	7	3
Actividad antibacteriana			
4 gram positivas	2	4	3
9 Gram negativas	7	7	8
Curva letal			
Gram positiva	<i>S. epidermidis</i> Bacteriostática	<i>S. epidermidis</i> Bactericida 12 hrs 15 impactos	No se evaluó
Gram negativa	<i>V. cholerae</i> No-01 Bacteriostática	<i>V. cholerae</i> Tor Bactericida 3 hrs 15 impactos	-----
Actividad antioxidante			
CA ₅₀	3.57 µg/mL	0.6538 µg/mL	8.025 µg/mL
CFT	50%	97%	34%

DISCUSIÓN

Las plantas medicinales son un elemento importante en el sistema médico indígena en México, el cual, cuenta con alrededor de 62 grupos étnicos, por lo que hay un amplio conocimiento sobre el uso y empleo de plantas medicinales, estos conocimientos tienen un gran valor y se debe salvaguardar, ya que a partir de éste, se descubren los compuestos biológicamente activos basadas en las teorías del cuerpo, enfermedades y su tratamiento (Waldstein, 2006; Heinrich, 2000).

Los pobladores de San Rafael confunden las cortezas de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* (Pochote) y *J. adstringens* (Cuachalalate), ya que en algún momento de su desarrollo la corteza de ambas especies presentan ornamentaciones similares, esto causa que les den un uso medicinal similar, aplicándolas para el tratamiento de diabetes, dolor de riñones, tumores, gastritis y heridas (Canales et al., 2005). En cuanto a la corteza de *C. procera* (Chupandilla) es utilizada en la comunidad para el dolor de riñones, frecuentemente en los mercados de plantas medicinales, se vende la corteza de la Chupandilla como si fuera la del Cuachalalate.

En el presente trabajo se comparó la actividad antimicrobiana, antioxidante y toxicidad general de los extractos de las tres cortezas, tratando así, de hacer un estudio preliminar para validar su uso etnomedicinal.

A) COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL y OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.

Las cortezas se colectaron en San Rafael, Coxcatlán, Puebla en el mes de agosto del 2007, mes que corresponde, según la clasificación de Koppen a un clima árido con lluvias y una temperatura promedio de 22°C (Medina, 2000). Es importante mencionar que para estas fechas, en San Rafael todavía no caían las primeras lluvias y el ambiente estaba muy seco. El hecho de que se hayan colectado las tres cortezas en la misma fecha y localidad, fue lo más adecuado, puesto que las condiciones ambientales pueden

determinar la cantidad y tipo de metabolitos secundarios presentes en las plantas (Harbone, 1977; Anaya, 2004).

Los resultados obtenidos en el porcentaje de rendimiento de los extractos MeOH1 con respecto al peso seco de las cortezas (Cuadro 9), muestran que las cantidades obtenidas de los extractos de cada una de las cortezas varían entre el 9 y 44%, esta diferencia en la cantidad de compuestos puede deberse a diversos factores como son: el lugar de crecimiento, la diferencia de especies y la edad del árbol (Harkin y Rowe, 1971), como es en el caso del Pochote y el Cuachalalate, lo cuales presentan ornamentaciones similares en determinado estado de crecimiento. En cuanto a las particiones del los extractos MeOH1 que se muestran en el Cuadro 10, se observa en los tres casos los extractos MeOH2 tienen mayor rendimiento que las particiones hexánicas, Harkin y Rowe (1971) mencionan que en las cortezas de los árboles los compuestos polares (taninos, polifenoles, glucósidos) son generalmente de tres a cinco veces más abundantes que los compuestos no polares (grasas, ceras, terpenos, esteroides), por lo que esto sea probablemente la razón de que MeOH2 tenga mayor rendimiento.

B) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.

La gente de San Rafael utiliza las tres cortezas para curar heridas y dolor de riñones (Canales et al., 2005 y 2006). Las heridas pueden infectarse por bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, esta fue la razón por la que los extractos se evaluaron sobre los dos tipos de bacterias para validar el uso etnomedicinal de las cortezas.

En la piel los microorganismos residentes más habituales y estables se limitan a algunos géneros de bacterias Gram positivas, entre los que se hallan ciertas especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus* y diversas especies de *Corynebacterium* y de *Propionibacterium* (Brooks et al., 2008; Madigan et al., 2009).

Las bacterias Gram negativas son constituyentes ocasionales de la microbiota normal de la piel, aunque los organismos intestinales como *Escherichia coli* se estén inoculando continuamente en la superficie cutánea por contaminación fecal (Madigan et al., 2009).

En cuanto al dolor de riñones, las principales causas son cálculos renales, cáncer, insuficiencia renal e infecciones causadas por bacterias, principalmente Gram negativas y algunos hongos (Brooks et al., 2008).

Los extractos MeOH1 de las tres cortezas inhibieron el crecimiento de un mayor número de cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas en comparación con los extractos MeOH2 (Figuras 11-13), esto puede deberse a que el extracto MeOH1 contiene una mezcla de compuestos polares y no polares, que por un lado pudieran formar una acción antagónica sobre los compuestos activos, o por otro lado no haya antagonismo y únicamente en el extracto MeOH2 al retirar los compuestos no polares se concentren los activos. Probablemente al obtener el extracto MeOH2, el cual es libre de compuestos no polares, los compuestos activos actúan más eficazmente sobre sus blancos bacterianos. El extracto MeOH1 de *C. procera* fue el que inhibió el crecimiento de una mayor cantidad de cepas bacterianas (Figura 9), siendo *S. lutea* la que presentó los halos de inhibición más grandes (15 mm), estos resultados coinciden con Martínez (2009) . Los resultados también concuerdan con los reportados por Canales y col. (2005) en donde encontraron que el extracto metanólico es el que presenta actividad, aunque en un menor número de bacterias y *J. adstringens* la que inhibió un mayor número de cepas bacterianas, esto concuerda con los datos obtenidos por Jaury (2009). Las diferencias encontradas en las investigaciones puede deberse a que la síntesis de uno o varios metabolitos secundarios pueden experimentar modificaciones, ya que se ven sometidos a las acciones del conjunto de factores bióticos y abióticos de un ecosistema, del que dependen directamente la cantidad de luz, la temperatura, el clima en general, el agua, la calidad y cantidad de nutrimentos a su disposición y las interacciones biológicas con otros organismos que comparten un ambiente determinado (Anaya, 2004). Sin embargo, los metabolitos secundarios también pueden modificarse al momento de la colecta, del proceso de secado del material vegetal y la forma de extracción (Trease y Evans, 1976). Aunado a lo anterior, probablemente al realizar los extractos, se hayan separado algunos compuestos que probablemente presentan sinergismo.

En la evaluación cuantitativa de la actividad antibacteriana (Cuadros 12-14) se observa que en las tres cortezas y en la mayoría de las cepas evaluadas, los extractos MeOH2

presenta valores de CMI y CBM menores que los extractos MeOH1, datos que concuerdan con lo reportado por Martínez, (2009) y Jaury (2009). En cuanto a la comparación de las concentraciones de CMI de las tres cortezas sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas (Figura 15 y 16), se observa que en la mayoría de los casos el extracto MeOH2 de *C. procera* presenta mayor sensibilidad tanto en Gram positivas como en negativas, y siendo el extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* la que presentó menor sensibilidad en bacterias tanto Gram positivas como en negativas, esto puede deberse a la gran diferencia de metabolitos secundarios encontrados en ambas especies. Por lo antes mencionado se decidió realizar las pruebas sobre la curva de crecimiento bacteriano, evaluación de antioxidantes y toxicidad general con el extracto MeOH2.

C) EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.

Los agentes antimicrobianos se pueden clasificar como bacteriostáticos o bactericidas. Los agentes bacteriostáticos suelen ser inhibidores de la síntesis de proteínas y actúan uniéndose a los ribosomas. Si disminuye la concentración del agente el antimicrobiano se libera de los ribosomas y se reanuda el crecimiento. Los agentes bactericidas se unen fuertemente a sus células diana provocando la muerte celular (Madigan et al., 2009).

Se evaluaron las cepas más susceptibles de cada extracto MeOH2 sobre su curva de crecimiento (Figuras 17-22). Siendo para *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* y *C. procera* las cepas de *S. epidermidis* (CMI: 0.75 mg/mL; CBM: 1.00 mg/mL y CMI: 0.50 mg/mL y CBM: 0.75 mg/mL respectivamente) y *V. cholerae* Tor (CMI: 0.50 mg/mL y CBM: 0.75 mg/mL en ambos casos) y para *J. adstringens*: *S. aureus* y *V. cholerae* No. 01 (CMI: 0.50 mg/mL y CBM: 0.75 mg/mL en ambos casos).

Por lo general, los estafilococos infectan piel y las heridas. La mayoría de estas infecciones son consecuencia de la transferencia de estafilococos de la flora normal desde un individuo infectado asintomático a otro susceptible. Hay dos especies importantes para el hombre *S. epidermidis*, una especie no pigmentada que es frecuente en la piel y en las membranas mucosas, y *S. aureus*, una especie con pigmentos

amarillos, relacionada muchas veces con intoxicaciones alimentarias (Brooks et al., 2008).

V. cholerae se transmite típicamente por la ingestión de agua contaminada y se asocia con el consumo de alimento, al igual que sus biotipos No O1 y Tor (Madigan et al., 2009).

Las concentraciones de CMI y CBM utilizadas para las tres cortezas fueron las mismas en todos los casos (CMI: 0.50 mg/mL; CBM: 0.75 mg/mL), menos con el extracto MeOH2 de en *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* sobre *S. epidermidis* (CMI: 0.75 mg/mL; CBM: 1.00 mg/mL). En todos los casos los extractos muestran efectos bactericidas, lo que demuestra que los extractos tienen compuestos que provocan la muerte bacteriana ya sea que actúen individualmente o por sinergismo (Madigan et al., 2009).

El efecto del extracto MeOH2 de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* sobre la curva de crecimiento bacteriano de *S. epidermidis* necesitó mayor tiempo para la muerte bacteriana (12 horas), mientras que el extracto MeOH2 de *C. procera* produce la muerte celular a las 2 horas (Figuras 17 y 19), sin embargo se produce el efecto contrario al evaluar los extractos sobre *V. cholerae* Tor, en donde se observa que el extracto de *C. procera* produce la muerte celular a las 24 horas (Figura 20) y el extracto de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* necesita 7 horas para causar la muerte bacteriana (Figura 18). Esta diferencia de tiempos puede deberse a los diferentes blancos sobre los que actúan los compuestos activos, ya que estos, pueden actuar sobre la membrana plasmática, síntesis de la pared celular, síntesis de lípidos y proteínas, elongación del RNA o sobre la DNA girasa (Madigan et al., 2009).

En cuanto a *J. adstringens*, el extracto produce muerte bacteriana a las 3 horas sobre *S. aureus* y 7 horas sobre *V. cholerae* No-01, sin embargo, sobre *S. aureus* la concentración de CMI presento efecto bactericida a las 7 horas (Figura 21 y 22). Jaury (2009) y Martínez (2009), evaluaron el efecto de los extractos metanólicos libres de compuestos no polares de *J. adstringens* y *C. procera* respectivamente sobre las curvas de crecimiento bacteriano, utilizando las mismas cepas y mismas concentraciones que en este trabajo, sin embargo todas las concentraciones mostraron actividad bacteriostática, esto se puede explicar en base a que en algunos casos las

concentraciones de CMI y CBM no son constantes, ya que pueden variar de acuerdo a las condiciones del cultivo, como es la temperatura, el pH y la aireación (Madigan et al., 2009). En cuanto a *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* este es el primer estudio en donde se evalúa el extracto MeOH2 sobre la curva de crecimiento bacteriano de *S. epidermidis* y *V. cholerae* Tor.

D) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

Las micosis con mayor incidencia, son las candidiasis y las dermatofitosis, las cuales son causadas por hongos que forman parte de la flora microbiana normal o están adaptados para sobrevivir en el huésped humano (Brooks et al., 2008). Los hongos son microorganismos que también llegan a infectar las heridas e intervienen en el mecanismo de cicatrización (Reddy et al., 2008). Por lo que con la evaluación de la actividad antifúngica de las cortezas se justifica también el uso para curar heridas.

Mostrando que solamente los extractos MeOH1 y MeOH2 de *C. procera* y *J. adstringens* tuvieron actividad antifúngica sobre *R. solani* y *T. mentagrophytes* (Cuadro 15). Sin embargo, al obtener la CF_{50} de cada extracto sobre las cepas de hongos, se encontró que el extracto MeOH1 de *C. procera* presenta una CF_{50} de 471.30 $\mu\text{g/mL}$ sobre *T. mentagrophytes* (Figura 23), y en los demás casos, se necesitan concentraciones mayores a 2,000 $\mu\text{g/mL}$ para inhibir el 50% del crecimiento fúngico, estos resultados coinciden con Martínez (2009) y Jaury (2009). Tradicionalmente *C. procera* no se emplea para infecciones de la piel. Aguilar-Ortigoza et al., 2003 aislaron fenoles tóxicos (catecoles, resorcinoles y biflavonoides) de algunas especies de la familia Anacardiaceae, estos compuestos inhiben el crecimiento de algunos hongos patógenos como *Alternaria* y *Fusarium*, en *C. procera* y *J. adstringens* (ya que incluyen a *J. adstringens* como parte de la familia Anacardiaceae) no se presentan estos fenoles tóxicos, sin embargo esta especie puede contener otro tipo de fenoles que sean los responsables de la actividad antifúngica.

E) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y CONTEO DE FENOLES TOTALES.

Las especies reactivas de de oxígeno (ERO's) son una parte vital para el proceso de cicatrización y sirven como mensajeros celulares que llevan a cabo diversos aspectos moleculares y biológicos de las células, sin embargo las altas concentraciones de estos radicales también pueden perjudicar a la célula, los cuales pueden dañar a las células que rodean a la herida (Reddy et al., 2008).

Tradicionalmente, las plantas medicinales son utilizadas para tratar una o más enfermedades y estas pueden poseer muy alta bioactividad contra blancos en común. La propiedad antioxidante es importante ya que pueden controlar los ERO's implicados en varias enfermedades (Kumari y Kakkar, 2008).

En cuanto a la evaluación de la actividad antioxidante, se encontró que los extractos MeOH₂ de las cortezas presentan buena actividad antioxidante (Figura 25), ya que sus valores de CA₅₀ (*C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* CA₅₀ es de 6.15 µg/mL; *J. adstringens* CA₅₀ es de 5.73 µg/mL; *C. procera* CA₅₀= 4.78 µg/mL) se acercan al valor de la quercetina (CA₅₀= 4.6 µg/mL) (Figura 24). La quercetina es un flavonoide que se caracteriza principalmente por su fuerte actividad antioxidante. Los fenoles son compuestos químicos importantes por su actividad antioxidante (Rice-Evans et al., 1997), por esta razón se decidió realizar un conteo de fenoles totales de cada extracto (Cuadro 6). Se obtuvo que el extracto *C. procera* presenta 68% de fenoles totales y también presenta el menor valor de CA₅₀= 4.78 µg/mL. *J. adstringens* presenta 40% de fenoles totales y su CA₅₀ es de 5.73 µg/mL y *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* posee 28% de fenoles totales y su CA₅₀ es de 6.15 µg/mL. Se observa que la cantidad de fenoles presentes en los extractos están directamente relacionados con la actividad antioxidante. No hay estudios preliminares sobre la actividad antioxidante y contenido de fenoles totales sobre estas tres especies. Los taninos son un constituyente químico muy importante en las cortezas, y poseen propiedad antioxidante (Kumari y Kakkar, 2008; Hernes y Hedges, 2003).

F) EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD GENERAL.

La gente ha utilizado las plantas como tratamiento de muchas enfermedades, sin embargo, se sabe que muchas plantas son tóxicas. Por esta razón las investigaciones se deben enfocar en determinar la acción farmacológica y toxicidad de las plantas medicinales. La evaluación de la acción tóxica de los extractos de las plantas es indispensable para conocer un tratamiento confiable (Lagarto et al., 2001). Aunque, los compuestos bioactivos son casi siempre tóxicos en dosis altas (McLaughlin y Rogers, 1998).

En este estudio, aparte de evaluar la toxicidad de los extractos y fracciones, se pretende validar el uso etnobotánico de las tres especies, y por medio del ensayo con *A. salina* se puede hacer un estudio preliminar para evaluar la citotoxicidad, y así validar el uso contra tumores de los pobladores de San Rafael. McLaughlin y col., 1993, investigaron la utilidad de ensayo con *A. salina* como una prueba preliminar antitumoral para extractos de plantas. Se determinó una correlación positiva entre *A. salina* y la citotoxicidad contra las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano)

El ensayo con *A. salina* se ha utilizado en investigaciones con plantas medicinales de diferentes países para evaluar la toxicidad, la acción gastro-protectora y otras acciones biológicas, que en algunos casos ha sido relacionado con estudios farmacológicos con diferentes compuestos químicos. Este ensayo, también se ha considerado como bioindicador de la contaminación ambiental para detectar arsénico, cobre, zinc, cadmio, mercurio y selenio (Lagarto et al., 2001). También se ha utilizado para monitorear micotoxinas, contaminantes marinos, detergentes, productos petroleros, metales pesados y pesticidas (Sam, 1993).

Sin embargo, no puede reemplazar pruebas adicionales para obtener datos confiables, pero puede proveer pistas útiles del potencial tóxico de los compuestos evaluados (Hartl y Humpf, 2000). Puede ser utilizado como bioensayo en el laboratorio en orden de determinar toxicidad a través de la estimación de la concentración Letal Media (CL₅₀), que ha sido reportada por una serie de toxinas y extractos de plantas (Lagarto et al., 2001). Algunos autores mencionan que no hay correlación entre este bioensayo y los

efectos toxicológicos en todo un animal, sin embargo, Lagarto y col, 2001, realizaron un estudio comparativo de la toxicidad de extractos de plantas, con el ensayo de *A. salina* y en ratón, los resultados mostraron una buena correlación ($r: 0.85$ $p < 0.05$), sugiriendo que el ensayo con *A. salina* es un modelo muy útil.

El ensayo puede ser útil como una prueba rápida y sencilla para predecir la toxicidad de los extractos de las plantas y guiar su fraccionamiento fitoquímico. *A. salina* ofrece ventajas ya que posee un ciclo de vida corto, alta fecundidad, tamaño corporal pequeño y adaptabilidad a una variedad de recursos nutrimentales. Por lo tanto, las características de este organismo lo hace un modelo adecuado para el uso en toxicología, garantizando facilidad y costo beneficio (Lagarto et al., 2001; Nunes et al., 2006).

En este bioensayo se utiliza la larva nauplio de *A. salina* es un organismo autosustentable, independiente y es sensible a una variedad de sustancias. En general, el ensayo de *A. salina* es útil para la evaluación de los extractos de plantas para predecir su toxicidad (Nunes et al., 2006).

Se evaluaron los extractos MeOH₂ de las tres cortezas sobre *A. salina* y todas presentaron actividad tóxica fuerte según los criterios de McLaughlin, 1991. Rodríguez-López y col., 2006 reportaron la alta actividad tóxica sobre *A. salina* de los extractos hexánico, cloroformico y acetona de la corteza de *C. procera* siendo las CL₅₀ de 0.21, 2.31 y 22.75 µg/mL, este trabajo mostró que el extracto metanólico causa el 100% de muerte de *A. salina* desde concentraciones de 2.0 µg/mL, estos datos concuerdan con Martínez (2009). En cuanto a *J. adstringens*, Déciga-Campos y col., 2006 reportan que el extracto metanol-diclorometano (1:1) de la corteza de *J. adstringens* no presenta actividad toxica sobre *A. salina* ya que su valor de CL₅₀ es mayor a 1000 µg/mL. Sin embargo en el presente trabajo se obtuvo una CL₅₀ de 74.08 µg/mL del extracto MeOH₂ de *J. adstringens* (Figura 26), dato que coincide con Jaury (2009), esta diferencia de resultados puede deberse al lugar de colecta, ya que Déciga-Campos y col., 2006, colectaron la corteza de *J. adstringens* en el estado de Colima y como ya se había mencionado anteriormente, los metabolitos secundarios se ven afectados por diversos factores fisiológicos y ambientales. En cuanto a los extractos de *C. parvifolia* subsp.

parvifolia no se tenían reportes sobre su actividad tóxica ($CL_{50} = 2.82 \mu\text{g/mL}$) sobre *A. salina* (Figura 26).

G) FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO.

Cabe aclarar que el fraccionamiento biodirigido se basó en la actividad antibacteriana.

-*Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

De las 16 fracciones obtenidas en la cc, 5 fueron activas sobre *V. cholerae* Tor, siendo las fracciones de la 4 a la 8, por lo que se podría suponer que tienen en común uno o varios compuestos activos. No se tienen antecedentes de compuestos aislados del Pochote, en el presente estudio se lograron identificar compuestos como fenilpropanoides, cumarina, isoflavonas y terpenos (Cuadro 20). Ngounou y col., en el 2000, identificaron isoflavonas de *Ceiba pentandra* sin embargo, no se tienen reporte de actividad antimicrobiana de estas isoflavonas. Cowan en 1999, reporta que compuestos como cumarinas, isoflavonas y terpenos poseen actividad antimicrobiana. Estos compuestos tienen diversos mecanismos de acción. Las cumarinas pueden actuar a nivel de ADN o síntesis de proteínas y para los terpenos se especula que el mecanismo de acción de los terpenos involucra el rompimiento de la membrana por los compuestos lipofílicos (Cowan, 1999).

En cuanto a la curva de crecimiento bacteriano de la Fracción 6, presentó actividad bacteriostática por lo que probablemente existe un sinergismo en el caso del extracto MeOH₂ de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

Para esta especie se decidió trabajar con la Fracción 6, debido a su actividad antibacteriana y su rendimiento (2.4698 gr) para evaluar la actividad antioxidante y el CFT. Los compuestos fenólicos, como en este caso los fenilpropanoides y las isoflavonas también pueden ser las responsables de la actividad antioxidante de las fracciones, ya que son buenos acarreadores de radicales libres (Minussi et al., 2003), ya que la CA_{50} de la Fracción 6 fue buena ($3.57 \mu\text{g/mL}$).

-Cyrtoarpa procera.

Se obtuvieron 35 fracciones, de las cuales 23 mostraron actividad antibacteriana sobre *S. epidermidis*, las fracciones activas se pueden agrupar en tres grupos: de la 5 a la 17, de la 19 a la 24 y la 31 y 32. Esto nos indica que hay tres compuestos distintos en cada grupo, o que en las fracciones en donde no se presentó actividad el compuesto estaba en menor cantidad y solo sea uno o varios compuestos con haciendo sinergismo los que sean los responsables de la actividad antibacteriana de los extractos de *C. procera*.

Las Fracciones 5, 6 y 7 de la Chupandilla fueron las que presentaron mayor actividad antibacteriana, en los cromatogramas por HPLC se observan que en las Fracciones 6 y 7 presentan ácido gálico (Cuadro 23), el cual según Chanwitheesuk y col. en 2007 demuestran la actividad antibacteriana del ácido gálico aislado del extracto etanólico de *Caesalpinia mimosoides* sobre *S. typhi* y *S. aureus* con valores de CMI de 2500 y 1250 µg/mL respectivamente.

El ácido gálico, es un fenol con propiedades antioxidantes muy fuertes, esto es comprobado por Yen y col., 2002 en donde además comprueban propiedades citotóxicas de este compuesto. Esto puede explicar la alta toxicidad y capacidad antioxidante del extracto MeOH₂ y Fracción 6.

La Fracción 5 presenta catecol y catequina (Cuadro 23), los cuales son flavonoides tienen altas propiedades antioxidantes y antibacterianas (Minussi et al., 2003), y también se les ha reportado con actividad antimicrobiana (Cowan, 1999). El catecol y la catequina tienen mecanismos de acción muy similares, ya que la cantidad de grupos –OH que tengan en la molécula es relativo a la toxicidad que causan en los microorganismos, afectando la inhibición enzimática de algunas vías por la oxidación de los compuestos (Cowan, 1999).

-Juliania adstringens.

Se obtuvieron 61 fracciones, y 17 presentaron actividad sobre *V. cholerae* No-01, siendo las fracciones activas de la 1 a la 17, observándose que probablemente compartan el mismo o los mismos compuestos activos.

Se han aislado varios compuestos del Cuachalalate, entre los que se incluyen: ácidos masticadienoico, α -hidromasticadienoico y la mezcla masticadienóico/isomasticadienoico (Olivera et al., 1999, Oviedo-Chávez et al., 2004, Castillo-Juárez et al., 2007); triterpenos tipo tirucallane (Makino et al., 2004); y ácidos anacárdicos los cuales según Castillo-Juárez y col., 2007 poseen propiedades bactericidas, y los cuales pueden ser los responsables de la actividad antibacteriana de los extractos y Fracciones de *J. adstringens*. Sin embargo, en este estudio solamente se pudieron identificar los grupos de compuestos que se muestran en los cromatogramas por HPLC, encontrándose principalmente fenilpropanoides (Cuadro 26). Los cuales, por ser un grupo muy diverso, presentan diferentes mecanismos de acción.

La actividad antioxidante también puede explicarse con este tipo de compuestos ya que la mayoría tiene estructuras cíclicas y pueden ser buenos acarreadores de radicales libres.

Cabe destacar, que en el caso de *C. aesulifolia* subsp. *parvifolia* y *C. procera*, este es el primer trabajo en donde se dan a conocer los principales grupos de metabolitos secundarios presentes en las fracciones de los extractos MeOH₂ de estas especies, ya que no se cuentan con antecedentes tanto de su actividad biológica como de su composición química.

La importancia de realizar estudios etnobotánicos previos a elegir las especies para realizar estudios fitoquímicos, es de gran importancia, ya que gracias al estudio realizado por Canales y col. en 2005, se pudieron elegir estas tres cortezas y realizar los estudios biológicos correspondientes para validar el conocimiento etnomedicinal que se les da.

Con los resultados obtenidos, se valida el uso medicinal que se les da a *C. aesulifolia* subsp. *parvifolia*, *C. procera* y *J.adstringens* en el poblado de San Rafael, Puebla. Sin

embargo, aun faltan por realizar estudios para asilar los compuestos activos y probarlos en modelos *in vivo*.

CONCLUSIONES

- Los extractos MeOH1 y MeOH2 de las tres cortezas presentan actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Los extractos MeOH1 y MeOH2 de *C. procera* y *J. adstringens* presentan actividad antifúngica sobre *T. mentagrophytes* y *R. solani*.
- Los extractos MeOH2 de las tres cortezas presentan actividad antioxidante.
- Los extractos MeOH2 de las tres cortezas presentan toxicidad alta sobre *A. salina*.
- Se identificó en las fracciones activas de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* la presencia de fenilpropanoides, cumarina, terpenos e isoflavonas.
- En las fracciones activas de *C. procera* se identificó la presencia de ácido gálico, catecol, catequina y algunos fenilpropanoides.
- En las fracciones activas de *J. adstringens* se identificó la presencia de fenilpropanoides.
- Se valida el uso de las cortezas en la medicina tradicional de San Rafael, Coxcatlán, Puebla.
- Los extractos MeOH de *C. procera* presentaron mejor actividad biológica que los extractos de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* y *J. adstringens*.
- Los extractos MeOH de *J. adstringens* presentaron mejor actividad biológica que los extractos de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR O DE KIRBY-BAÜER

(Cole, 1994; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; Beer y Sherwood, 1945).

Utilizando esta técnica, se evalúan cualitativamente la actividad antibacteriana de los compuestos de un extracto o un compuesto puro, los cuales difunden a través del agar. Si hay compuestos activos, el crecimiento de la bacteria se detiene y se forman halos alrededor del disco.

Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los compuestos 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 disolución del compuesto hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición.

Con un asa de siembra se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo Muller-Hinton (Bioxon 260), se enjuaga bien en el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa, el tubo de cultivo se incuba a 37°C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N^o0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 UFC/ml. El estándar 0.5 de MacFarland se prepara añadiendo 0.5 mL de sulfato de bario a 99.5 mL de H₂SO₄ 0.36N. La comparación de la turbidez entre el estándar y el caldo con el organismo en estudio se puede efectuar con un espectrofotómetro a 640 nm.

Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión de bacteria, 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 con agar de Müller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente. 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.

Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman N^o5. Se utilizan 2 mg de los extractos disueltos en 10 mL del disolvente correspondiente a cada extracto. Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a

evaluar se colocarán en la superficie del agar utilizando una pinza estéril y deben colocarse por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración de cada extracto a evaluar.

Para el control negativo se preparan sensidiscos a los que se les agrega 10 μ L del disolvente empleado para disolver el problema. Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos impregnados con 25 μ g de cloramfenicol. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo.

Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 36°C, sin mayor tensión de CO₂. Es preciso evitar presión de CO₂ debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso de pH. El desarrollo de algunos microorganismos es debido al pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona 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.

En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto como activo. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio.

APÉNDICE 2

MICROTÉCNICA DE DILUCIÓN EN CALDO

(Koneman, 1985)

Con este método se evalúa cuantitativamente la actividad antibacteriana de los extractos o compuesto puro, estos se incorporan al agar a diferentes concentraciones. Se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM).

La susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica con 96 concavidades (placa de ELISA). La placa se prepara colocando 50 μ L de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) con la concentración del extracto probado en las concavidades apropiadas (0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5 y 2.0 mg).

Se prepara 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 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 μ L de esta suspensión diluida.

Como control negativo se colocan 50 μ L de caldo Müller-Hinton con 10 μ L del solvente empleado para disolver el problema. El grupo testigo se prepara colocando 50 μ L de caldo Müller-Hinton en las concavidades y 50 μ L de la suspensión bacteriana (10^5 UFC/mL)

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 incuban a 35°C durante 24 horas.

Después del tiempo de incubación se añade a cada concavidad 50 μ L de una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada (DTT). La placa se incuba 30 min.

El uso de sales de tetrazolio provee de métodos alternos indirectos para medir la actividad respiratoria, en este caso en bacterias. La reducción de una sal de tetrazolio causa la formación de un precipitado insoluble de coloración rojiza conocido como formazán. Por lo que, en las concavidades donde se desarrolle organismos, 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.

La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la concentración que produce una inhibición completa del desarrollo representa la Concentración Bactericida Mínima (CBM). En todos los casos, esta prueba se hace por triplicado.

APÉNDICE 3

EFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

(Kubo, et al., 1993, citado en Ávila, 1996)

Este método se emplea para determinar el efecto que tiene el extracto sobre el crecimiento bacteriano, basándose en las CMI y CBM obtenidas. Y así determinar los impactos necesarios para que se produzca la muerte bacteriana.

Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton. El medio se coloca en cajas septadas. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm.

Se prepara el inóculo con aproximadamente 1×10^8 bacterias/mL en un tubo de ensayo con 10mL de caldo Müller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación).

Con ayuda de una micropipeta, se inoculan 0.1mL de la suspensión de bacterias en los tubos que contienen los extractos a evaluar. La concentración final es de aproximadamente de 1×10^5 bacterias/ mL de caldo en cada tubo. Se incubará en una estufa a 35°C sin presión de CO₂.

Los extractos o compuestos a evaluar, se prepara en tubos con 10mL de caldo Müller-Hinton con las concentraciones de CMI y su múltiplo medio; esto es, la mitad del CMI ($\frac{1}{2}$ CMI) y CBM. Se muestrea cada hora durante los primeros 4 tiempos: T₀-0, T₁-1, T₂-2, T₃-3, T₄-4 (tiempo-horas transcurridas), después 2 muestreos cada dos horas, un muestreo a las 12 hrs y finalmente a las 24 hrs. En cada tiempo se realizan diluciones en tubos con solución salina para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo. Como testigo se prepara un tubo sin extracto.

Las cajas se incuban durante 24 hrs a 35°C. Se cuentan las colonias de cada concentración y dilución. Se grafica el Log del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación bacteriana, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

APÉNDICE 4

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL POR DIFUSIÓN EN AGAR

(Wang y Bun, 2002).

Este ensayo evalúa cualitativamente la actividad antifúngica sobre hongos filamentosos de un extracto o un compuesto puro. Los compuestos difunden a través del agar y si estos son activos, el crecimiento del hongo es más lento o se detiene, resultando la deformación de la colonia.

El método se lleva a cabo en cajas petri que contienen 20 mL de agar papa-dextrosa (PDA), en el cual se inocula el micelio del hongo activamente en crecimiento.

Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro de papel Whatman No. 5. Se impregnan con 2 mg del extracto o compuesto puro, disueltos en 10 μ L del disolvente. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo, para dejar que el disolvente se evapore por completo. Los discos se colocan a una distancia de 5 mm del límite micelial, utilizando una pinza estéril. Los sensidiscos se presionan suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar.

Como control negativo se colocan sensidiscos a los que se les agrega 10 μ L de disolvente, y como control positivo se usaron sensidiscos con 7 μ g de ketoconazol, en ambos casos se dejan evaporar durante 24 horas (al igual que los experimentales). Se realizan tres repeticiones.

Las cajas se incuban a 28°C durante 72 h o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

En el caso de existir alguna deformación en el crecimiento del hongo, se reporta el extracto como activo, ya que en condiciones normales, el crecimiento del hongo es circular y éste debe crecer encima de los sensidiscos con control negativo, también cualquier signo de diferencia de color, esporulación o morfología indican actividad antifúngica.

APÉNDICE 5

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN FUNGICIDA MEDIA (CF₅₀)

(Método modificado de Wang & Bun, 2002)

El ensayo mide el efecto antifúngico sobre hongos filamentosos de un extracto o compuesto puro. Se utilizan cajas de 24 pozos y se preparan con el compuesto a evaluar incorporándolo en el agar a determinadas concentraciones. Se coloca en cada pozo 1.5 mL de agar papa-dextrosa (PDA), con las siguientes concentraciones del compuesto a evaluar: 2.00, 1.50, 1.00, 0.75, 0.50 y 0.25 mg/mL. Posteriormente se coloca una pequeña cantidad de micelio en el centro de cada pozo. Por triplicado.

Para el control negativo se le agrega al agar el mayor volumen de disolvente usado en los grupos experimentales y se emplea un grupo testigo para comparar la velocidad de crecimiento.

Las placas son incubadas a 28°C durante 72 horas o hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

Se mide el crecimiento del hongo y se realiza una grafica dosis-respuesta, en la que la respuesta es el porcentaje de inhibición, tomando en cuenta que el grupo testigo es el 0% de inhibición.

La concentración que representa el 100% de inhibición es aquella en la que ya no se observa crecimiento, la cual corresponde a la Concentración Fungicida Mínima (CFM); mientras que la concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la Concentración Fungicida Media (CF₅₀).

APÉNDICE 6

MÉTODO DE REDUCCIÓN DEL RADICAL 2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRACIL (DPPH)

(Okusa et al., 2007)

La actividad antioxidante se evalúa midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-30 $\mu\text{g/mL}$), por medio de espectrometría UV-VIS.

Se prepara una solución STOCK con 10 mg del extracto o fracción a evaluar y 10 mL de MeOH grado HPLC. Las concentraciones a evaluar son las siguientes: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ppm, las cuales se preparan siguiendo Cuadro 28.

La solución de DPPH se prepara en un matr az aforado pesando 0.00197 (0.002 gr) y agregando 50 mL de MeOH grado HPLC.

En una placa de ELISA se adicionan 50 μL de la solución problema a diferentes concentraciones (2-100 $\mu\text{g/mL}$) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionan 150 μL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final es de 100 μM ; inmediatamente se protege de la luz y se mantiene en agitación constante durante 30 min a 37 C. Una vez transcurrido el tiempo se determina la absorbancia a 517 nm en un lector de ELISA.

Como control negativo se llenan pozos con 200 μl de metanol. Y para control positivo se utiliza quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Cuadro 28. Concentraciones para preparar las soluciones problema para evaluar la actividad antioxidante.

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

Los resultados se reportan obteniendo el porcentaje de reducción y se calcula con la siguiente fórmula:

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

En donde:

C= Absorbancia del control positivo

E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPPH + compuesto problema

APÉNDICE 7

CONTENIDO DE FENOLES TOTALES (CFT)

(Método modificado de Singleton et al., 1999)

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría en base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla), en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación 6^+ . La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación de molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre 5^+ y 6^+ , formando una solución azul.

Se prepara una curva de calibración con ácido gálico, el cual es una pequeña molécula que por su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo -OH. Se utiliza para evaluar la cuantificación de fenoles totales (Aguilar, 1999).

Se utiliza una solución estándar ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL.

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se prepara una solución estándar (0.2 mg/mL), se toma una alícuota de 250 μ L de esta y se agregan 750 μ L de agua destilada, para obtener un volumen final de 1 mL a una concentración de 0.05 mg/mL.

Se toma 1 mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transfiere a un tubo de ensayo con 6 mL de agua destilada a continuación se adicionan 500 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añaden 1.5 mL de una solución de Na_2CO_3 (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL.

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se determina por triplicado.

Finalmente se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

APÉNDICE 8

TOXICIDAD GENERAL SOBRE *Artemia salina*

(McLaughlin, 1991; McLaughlin y Rogers, 1998)

Los compuestos que se van a utilizar en medicina, deben poseer efectos terapéuticos y ser inocuas. Los compuestos bioactivos generalmente son tóxicos a dosis altas. La toxicología es la ciencia que se ocupa de los efectos adversos que ejercen las sustancias químicas en los organismos vivos. Evaluar la letalidad en un organismo simple como lo es *Artemia salina*, es un estudio preliminar para la evaluación de la citotoxicidad, ya que existe una correlación positiva entre este invertebrado y el humano.

Este ensayo se realiza para evaluar la toxicidad de los extractos, fracciones o compuestos puros sobre larvas nauplio II de *Artemia salina* (Leach) y se obtiene la concentración letal media (CL₅₀).

Los quistes se ponen a crecer en 2 L de agua de mar (38 gr de NaCl por litro de agua), bajo luz blanca y a 25°C, después de 24-48 hrs las larvas nauplio emergen.

Se prepara una solución de 20 mg del compuesto a evaluar en 2 mL de dimetil sulfóxido (DMSO). Se preparan viales con 10 mL de agua de mar con las concentraciones a evaluar: 1000, 100 y 10 µg/ml, como se muestra en la Figura 42; realizando cada concentración por triplicado y posteriormente se colocan 10 larvas por frasco.

Como control negativo se utiliza DMSO en las concentraciones evaluadas. Y como control positivo se evalúa el ácido gálico. También se coloca un grupo testigo.

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

Se cuentan el número de larvas sobrevivientes, las cuales deberán desplazarse de la misma manera que las del grupo testigo.

La concentración letal 50 (CL₅₀) se determinará para cada compuesto, interpolándolo en gráficas de porcentaje de mortalidad contra la concentración en mg/mL y a través de análisis de regresión lineal.

La actividad tóxica general se considera débil cuando la CL_{50} se encuentra entre 500 y 1000 $\mu\text{g/ml}$, moderada cuando se encuentra entre 100 y 500 $\mu\text{g/ml}$, y fuerte entre 0 y 100 $\mu\text{g/ml}$.

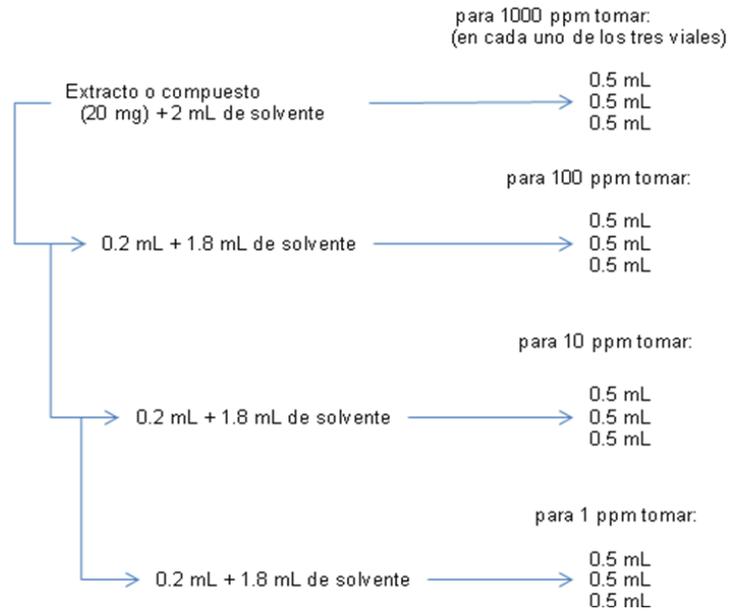


Figura 42. Diluciones para evaluar toxicidad general sobre *A. salina*

APÉNDICE 9

TECNICAS CROMATOGRÁFICAS

(Gros et al., 1985; Mathews et al., 2002)

La cromatografía es la distribución de los componentes de una muestra entre dos fases, una móvil (gas o líquido) u una fija o estacionaria (líquido o sólido). Los métodos cromatográficos son los procedimientos separativos más utilizados.

-Cromatografía en capa fina (CCF).

Se utiliza una placa recubierta con fase estacionaria manteniendo un pequeño espesor constante a lo largo de la placa. El eluyente ascenderá, por capilaridad, por la placa y arrastrará los componentes a lo largo de ésta produciendo “manchas” de los componentes.

Se usan láminas de vidrio como soporte del adsorbente, plástico (acetato) ó metálicos (aluminio). Los adsorbentes más comunes son: sílica gel, celulosa y poliamidas

Hay placas que contienen un indicador de fluorescencia, para facilitar la identificación de las muestras. Si no se usa indicador y los componentes no son coloridos se requerirán técnicas de revelado.

Los eluyentes más comunes son: éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo, cloroformo, acetona, etanol, metanol y ácido acético.

Las manchas de color son, por supuesto, inmediatamente visibles; las incoloras pueden revelarse mediante: luz UV si la sustancia absorbe luz ultravioleta, se puede usar una fase estacionaria impregnada con un indicador fluorescente (254 ó 366), el número, la introducción de la placa en vapores de yodo y el rocío con una solución de agua/H₂SO₄ 1:1.

-Cromatografía en columna (CC).

La cromatografía en columna es la más usada en la separación de productos naturales. Se emplean adsorbentes como gel sílice, alúmina, celulosa, florisil, poliamida, Sephadex y resinas de intercambio iónico.

Todas las cromatografías denominadas en columna se caracterizan por tener una fase estacionaria que se encuentra dentro de una columna de vidrio de 5 a 30 mm de diámetro por la que se hace pasar una fase móvil líquida o gaseosa que estará en permanente movimiento. Según la afinidad de las moléculas por la fase móvil o la estacionaria, éstas se separarán.

Después de cada cromatografía podremos sacar información del cromatograma tanto cualitativa (para identificar los distintos compuestos de la mezcla) como cuantitativa (para poder obtener la cantidad y composición de las sustancias separadas).

Cromatografía de adsorción: se basa principalmente en las diferencias en la afinidad relativa de los compuestos por el sólido utilizado como fase estacionaria. Las separaciones obtenidas se determinan casi exclusivamente por interacciones polares, siendo la fase estacionaria más polar que la fase móvil.

-Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Es un tipo de cromatografía en columna, se utiliza para separar componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y a columna cromatográfica. Es muy común en análisis químicos para la separación, identificación, purificación y cuantificación de componentes.

Los elementos que participan en la interacción en un HPLC son: fase móvil, fase estacionaria y la muestra. En el HPLC el compuesto (muestra) pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria. Normalmente un cilindro con pequeñas partículas rodeadas con ciertas características químicas en su superficie, mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase

estacionaria a medida que adelantan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluído de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad característica que identifica a un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria. La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce así su difusión dentro de la misma mejorando la resolución de la cromatografía.

APÉNDICE 10

MÉTODOS CUALITATIVOS

- Alcaloides: Reactivo Dragendorff y Mayer (Wagner, 2001).

Los alcaloides son compuestos nitrogenados, estando en la mayoría de los casos el nitrógeno formando parte de un heterociclo.

Por la gran heterogeneidad de los alcaloides aparecen numerosas pruebas coloridas o de precipitación que sólo son positivas con ciertos grupos de alcaloides, por lo que se han propuesto, para clasificaciones parciales; aunque no son suficientes para una identificación definitiva.

Reactivos para la identificación general de alcaloides:

- Reactivo de Mayer: Se disuelven 1.36 g de HgCl_2 en 60 mL de agua y 5 g de KI en 10 mL de agua. Se juntan las dos disoluciones y se aforan a 100 mL. El reactivo sólo debe añadirse a disoluciones previamente aciduladas con HCl o H_2SO_4 diluidos. La disolución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Sólo deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.

-Reactivo de Dragendorff. Se disuelven 8.0 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de HNO_3 (dens 1.18, al 30 %) y 27.2 g de KI en 50 mL de agua. Se mezclan las dos disoluciones y se dejan reposar 24 horas. Se decanta la disolución y se afora con agua a 100 mL. Se usa sobre disoluciones aciduladas. Se puede recoger el precipitado anaranjado-marrón, liberar los alcaloides con solución de carbonato de sodio y extraerse con éter etílico o un disolvente similar.

Las anteriores disoluciones, preparadas en condiciones específicas, forman parte de los llamados reactivos de alcaloides, aunque los precipitados también pueden ser causados por proteínas, purinas, betaínas, cumarinas y algunos polifenoles. Como la ausencia de precipitados es indicativa de que no hay alcaloides, se usan estos reactivos como prueba presuntiva de su presencia.

- Fenoles: Cloruro Férrico (FeCl_3) (Dey y Harborne, 1989).

Los fenoles son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a al menos un grupo funcional hidroxilo. Es un grupo característico de flavonoides y fenilpropanoides.

La prueba del cloruro férrico es una prueba cualitativa para determinar la presencia de fenoles.

Se utiliza una disolución al 1% de cloruro de hierro (III) la cual es neutralizada con hidróxido sódico hasta formar un ligero precipitado de $\text{FeO}(\text{OH})$. [4], que debe ser filtrada antes de usarla. La muestra del extracto se disuelve en agua, metanol o etanol según su solubilidad. Luego se añade la disolución neutra de cloruro férrico: una coloración transitoria o permanente (normalmente púrpura, verde o azul) indica la presencia de un fenol o enol.

LITERATURA CONSULTADA

- Aguilar-Ortigoza, C. J., Sosa, V., Aguilar-Ortigoza, M. 2003. **Toxic phenols in various Anacardiaceae species**. Economic Botany. 57(3): 354-364.
- Alanís, G. J., Velazco, C. G., Foroughbakhch, P. R., Valdez, T. V., Alvarado, V. M. A., 2004. **Diversidad florística de Nuevo León: Especies en categoría de riesgo**. Ciencia UANL. 11(2): 209-218.
- Anaya, L. 2004. **Ecología Química**. Ed. Plaza y Valdéz S.A y C.V. UNAM. pp. 95-111.
- Argueta, V. A., Cano, A. J. 1994. **Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana**. Instituto Nacional Indigenista. México. pp.1193.
- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castillo, C., Navarrete, A. 2003. **Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *Amphipterygium adstringens*; role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin-sensitive neurons**. Planta medica. 69 (10): 905-909.
- Avendaño, A., Casas, A., Dávila, P., Lira, R. 2006. **Use forms, management and comercialization of “pochote” *Ceiba aescualifolia* (H. B. & K.) BRITTEN & Baker f. subsp. *parvifolia* (Rose) P. E. Gibas & Semir (Bombacaceae) in Tehuacan Valley, Central Mexico**. Journal of Arid Environments. 67: 15-35.
- Ávila, J. G. 1996. **Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha**. Tesis de maestría. FES-Cuatitlán. UNAM. México.
- Beer, E. J., Sherwood, M. B. 1945. **The paper-disc agar-plate method for the assay of antibiotic substances**. The welcome research laboratories. 459- 467.
- Blanckaert, I., Swennen, R. L., Paredes, F. M., Rosas, L. R., Lira, S. R. 2004. **Floristic composition, plant uses and management practices in homegardens of San Rafael Coxcatlán, Valley of Tehuacán-Cuicatlán, Mexico**. Journal of Arid Environments. 57: 39-62.

- Books, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. 2008. **Microbiología medica de Jawetz, Melnick y Adalberg**. 19^a ed. Manual moderno. pp. 207, 237, 335.
- Butler, M. S. 2004. **The role of natural product chemistry in drug discovery**. Journal of Natural Products. 67: 2141-2153.
- Canales, M. M., Hernández, D.T., Caballero, N. J. Romo de Vivar, R. A., Durán, D A., Lira, S. R. 2006. **Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México**. Acta Botánica Mexicana. 75: 21-43.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A. 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.
- Casas, A., Valiente-Banuet, A., Viveros, J. L., Caballero, J., Cortés, L., Dávila, P., Lira, R., Rodríguez, I. 2001. **Plant resources of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México**. Economic Botany. 55(1): 129-166.
- Castillo-Juárez, I., Rivero-Cruz, F., Celis, H., Romero, I. 2007. **Anti-*Helicobacter pylori* activity of anacardic acids from *Amphipterygium adstringens***. Journal of Ethnopharmacology. 114: 72-77.
- Castillo-Juárez, I., González, V., Jaime-Aguilar, H., Martínez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I. 2009. **Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders**. Journal of Ethnopharmacology 122: 402-405.
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., Kilburn, J. D., Rakariyatham, N. 2007. **Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk**. Food chemistry. 100: 1044-1048.

- Cole, M. D. 1994. **Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays –a critical review**. *Biochemical Systematic and Ecology*. 22(8): 837-856.
- Cowan, M. M. 1999. **Plant products as antimicrobial agents**. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4): 564-582.
- Dávila, P., Del Coro A. M., Valiente-Banuet, A., Villaseñor J. L., Casas, A., Lira R. 2002. **Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México**. *Biodiversity and Conservation*. 11: 421-442.
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G. E., Navarrete, A., Mata, R. 2006. **Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine**. *Journal of Ethnopharmacology*. 110: 334-342.
- Dey, P. M. and Harbone, J. B. 1989. **Methods in plant biochemistry**. Volume 1. Academic Press Limited. pp. 552.
- Domínguez, X. A. 1979. **Métodos de la Investigación Fitoquímica**. Ed. Limusa. México. pp. 45-47.
- 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. Facultad de Ciencias. UNAM. pp 15-23.
- González, M. F. 1998. **La vegetación de México y su historia**. *Ciencias*. 52: 58-65.
- Gonzalez, E. E., Delgado, J. 1962. **Anticancer Activity of the *Amphipterygium adstringens***. *Journal Pharmacology Science*. 51: 901-905.
- Gurib-Fakim, A. 2006. **Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow**. *Molecular Aspects of Medicine*. 27: 1-93.

- Gros, E. G., Pomilio, A. B., Seldes, A. M., Burton, G. 1985. **Introducción al estudio de los productos naturales**. Secretaria general de la organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C. pp 25-31.
- Harbone, J. B. 1977. **Introduction to ecological biochemistry**. Academic Press. N.Y.
- Harkin, J. M. y Rowe, J. W. 1971. **Bark and its possible uses**. Research note. U.S.D.A. Forest service. Madison, Wisconsin. pp. 3-5.
- Hartl, M., y Humpf, H. U. 2000. **Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay**. Food and Chemical Toxicology. 38: 1097-1102.
- Heinrich, M. 2000. **Ethnobotany and its role in drug development**. Phytotherapy research. 14: 479-488.
- Hernes, P. J., Hedges, J. I. 2003. **Tannin signatures of barks, needles, leaves, cones, and wood at the molecular level**. Geochimica et cosmochimica acta. 6: 1293-1307.
- Jaury, C. A. 2009. **Estudio Preliminar de la Actividad Antimicrobiana de *Juliania adstringens* (Schidl.) Schidl (Cuachalalate)**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 13-26 pp.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Summers, H. M. 1985. **Diagnóstico microbiológico**. Ed. Médica Panamericana. México. pp. 909.
- Kumari, A., Kakkar, P. 2008. **Screening of antioxidant potential of selected barks of indian medicinal plants by multiple in vitro assays**. Biomedical and Environmental Sciences. 21: 24-29.
- Lagarto, P. A., Silva, Y. R, Guerra, S. I., Iglesias, B. L. 2001. **Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀)**

value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 8(5): 395-400.

- Lira, R. 2001. **Los recursos vegetales del Valle de Tehuacán-Cuicatlán desde una perspectiva etnobotánica**. Informe técnico. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 9.
- Makino, M., Motegi, T., Fujimoto, Y. 2004. **Tirucallane-type triterpenes from *Juliania adstringens***. *Phytochemistry*. 65: 891-896.
- Mandingan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. 2009. **Brock Biología de los microorganismos**. Pearson Addison Wesley. 12a ed. pp 873-906.
- Mata, R., Calzada, F., Navarrete, A. 1991. **Long-chain phenols from the bark of *Amphipterygium adstringens***. *Journal of Ethnopharmacology*. 34: 147-154.
- Mathews, C. K., Holde, K. E., Ahern, K. G. 2002. **Bioquímica**. 3a ed. Addison Wesley. España. pp 166-170.
- Martínez, E. K. S. 2009. **Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Cyrtocarpa procera* KUNTH (Chupandilla)**. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. pp 12- 24.
- McLaughlin, J. L. 1991. **Crown Gall Tumours on Potato Disc and Brine Shrimp Lethality: Two Simple Bioassays for Higher Plant Screening and Fractionation**. In: Dey, P. M., Harbone, J. B., Hostettman, K. (Ed.). *Methods in plant Biochemistry Assays for Bioactivity*. Vol. 6. Academic Press, U.S.A. pp. 1-32.
- McLaughlin, J. L., Chang, C., Smith, D. L. 1993. **Simple bench-top bioassays (brine shrimp and potato discs) for the discovery of plant antitumor compounds**. In: *Human Medicinal Agents from plants*, ed. A. D. Kinghorn y M. F. Balandrin, ACS Symposium 534, American Chemical Society, Washington, DC. pp. 112-137.

- McLaughlin, J. L., y Rogers, L. L. 1998. **The use of biological assays to evaluate botanicals**. Drug information Journal, 32: 513-524.
- Medina, J., 2000. **Determinación del vigor y el estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) a lo largo de una cronosecuencia edáfica en un abanico aluvial en Coxcatlán, Valle de Tehuacán**. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. pp. 48.
- Minussi, R. C. Rossi, M., Bologna, L., Cordi, L., Rotilio, D., Pastore, G. M., Durán, N. 2003. **Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines**. Food Chemistry. 82: 409-416.
- Navarrete, A., Martínez-Urbe, Reyes, B. 1998. **Gastroprotective Activity of the Stem Bark of *Amphipterygium adstringens* in Rats**. Phytotherapy Research. 12: 1-4.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. 2007. **Natural Products as sources of new drugs over the last 25 years**. Journal of natural products. 70: 461-477.
- Ngounou, F. N., Meli, A. L., Lontsi, D., Sondengam, B. L., Atta-Ur-Rahman., Choudhary, M. I., Malik, S., Akhtar, F. 2000. **New isoflavones from *Ceiba pentandra***. Phytochemistry. 54: 107-110.
- Nunes, B. S., Carvalho, F. D., Guilhermino, L. M., Stappen, G. V. 2006. **Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing**. Environmental Pollution. 144: 453-462.
- 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.
- Olivera, O. A. G., Soto, H. M., Martínez, V. M., Terrazas, S. T., Solares, A. F. 1999. **Phytochemical study of cuachalalate (*Amphipterygium adstringens* Schiede ex Schlecht)**. Journal of Ethnopharmacology. 68: 109-113.

- Oviedo, C. I., Ramirez, A. T., Martínez-Vázquez, M. 2005. **Cytotoxic activity and effect on nitric oxide production of tirucallane-type triterpenes.** Journal of pharmacy and pharmacology. 57(9): 1087-1091.
- Oviedo-Chávez, I., Ramírez-Apan, T., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M. 2004. **Principle of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianiaceae) with anti-inflammatory activity.** Phytomedicine. 11: 436-445.
- Pagaza, E. M. C., Fernández, N. R. 2004. **La familia Bombacaceae en la cuenca del río Balsas.** México. Polibotánica. 17: 71-102.
- Pichersky, E., Gang, D. R. 2000. **Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective.** Trends in plant science perspectives. 5(10): 439-445.
- Reddy, B. S., Reddy, R. K. K., Naidu, V. G. M., Madhusudhana, K., Agwane, S. B., Ramakrishna, S., Diwan, P. V. 2008. **Evaluation of antimicrobial, antioxidant and wound-healing potenciales of *Holoptera integrifolia*.** Journal of Ethnopharmacology. 115: 249-256.
- Reyes, S. J., Brachet, I. C., Pérez, C. J., Gutiérrez, R. A. 2004. **Cactáceas y otras plantas nativas de la cañada Cuicatlán, Oaxaca.** Ed. UNAM. México. México. pp 193.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. 1997. **Antioxidant properties of phenolic compounds.** Trends in Plant Science. 2: 152-159.
- Rodríguez-López, V., Aguirre-Crespo, F., Salazar, L., Estrada-Soto, S. 2006. **Identification of fatty acid esters and hydrocarbon derivatives from *Cyrtocarpa procera* Kunth by GC-MS.** Natural Products Research. 20(1): 1-7.
- Rodríguez-López V., Salazar L., Estrada S. 2003. **Spasmolytic activity of several extracts obtained from some mexican medicinal plants.** Fitoterapia. 74: 725-728.

- Rosas, L. R. 2003. **Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán**. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 95.
- Rosas, A. H., Domínguez, R. M., Díaz, B. A. S., Soto, H. M., Martínez, V. M., Terrazas, T., Valencia del Toro, G. 2006. **Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood**. Mutation Research. 609: 43-46.
- Rzedowski, J., 1978. **Vegetación de México**. Ed. Limusa. México. pp. 432.
- Salisbury, R. 1992. **Plant physiology**. Ed. Hardcover. 4a ed. USA. pp. 119-121.
- Sam, T.W., 1993. **Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina***. Bioactive Natural Products, 441–457.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Reventós, R. 1999. **Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent**. Methods in Enzymology, Vol., 299. pp.152-178.
- Trease, G. E. y Evans, W., C. 1976. **Farmacognosia**. Compañía Editorial Continental. México.
- Vander Berghe, D. A. y Vlietinck, A. J. 1991. **Screening methods for antibacterial agents from higher plants**. In: Hostrttman, K. (Ed). Methods in plant Biochemistry. Assay for bioactivity. Vol. 6. Academic Press. London. pp. 47-69.
- Wagner, H. 2001. **Plant drug analyses**. Second edition. Springer. Germany. pp. 15-29.
- Waldstein, A. 2006. **Mexican migrante ethnopharmacology: Pharmacopeia, classification of medicines and explanations of efficacy**. Journal of Ethnopharmacology. 108: 299-310.
- Wang, H., Bun, T. N. 2002. **Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits**. Phytochemistry. 61: 1-6.

- Yen, G. C., Duh, P. D., Tsai, H. L. 2002. **Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid.** Food chemistry. 79: 307-313.

.