



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS
LABORATORIO FARMACOGNOSIA

**Actividad antimicrobiana de la fibra del "Pochote",
Ceiba aesculifolia subsp. *parvifolia* de San Rafael, Coxcatlán,
Puebla**

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el título de
Bióloga

Presenta:

MIRIAM FRANCO BERRONES

Directora de Tesis:

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. México. 2015.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

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

Fue dirigido por la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dr. César Mateo Flores Ortiz

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

M. en C. Ángel Durán Díaz

M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla

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

UNAM PAPIIT IN211614

UNAM PAPIIT IN213713

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Aidé Avendaño por la información y ayuda para realizar esta tesis.

A los profesores: Ángel en los análisis estadísticos, Luis Barbo, por la ayuda con los análisis de cromatografía, César Flores, por las correcciones realizadas.

Maestra Margarita y Prof. Marco, gracias por todo lo que me enseñaron, sobre todo la importancia del trabajo en equipo y de lo bonito e interesante en la ciencia.

A todos los de los laboratorios de Farmacognosia e Inmunología, por lo compartido en el laboratorio y fuera de él, pláticas, congresos, seminarios, exámenes de titulación, ayuda con técnicas, información, tardes trabajando, etc. Este trabajo también es suyo: Ana, Rebe, Karlita, Marlene, Carlos, Itzel, Javier, Less, Michael, Teo, David, Juan, Karen, David Omar, Aura, Mario, Judith, Vane, Alonso, Gus, Nelly, Oscar, Fanny, Pili, Eslí.

Mary, Laurel, Rebeca, Esme y Sanch gracias por la amistad, por compartir durante estos años: risas, prácticas, trabajos, desvelos. Gracias por su ayuda. Les deseo lo mejor en lo que venga ☺.

A maestros, amigos y compañeros que conocí durante la carrera, que aunque no menciono a cada uno, fueron muy importantes durante estos años ¡Muchas gracias!

A las personas que compartieron ideas respecto a este trabajo durante los congresos.



Gracias a todos por la ayuda, por compartir acerca de lo diferente que se puede ver la vida y sobre la importancia, belleza y riqueza de este país, que se puede trabajar para intentar que las cosas sean mejores. Aprendí mucho de ustedes.

Representación del periodo Clásico maya del árbol de *Ceiba* o *Yaax che* (árbol verde), considerado el sostén del mundo.

DEDICATORIA

A Dios, por estar en la duda, en lo racional e irracional.

A mi familia:

Papás, gracias por darme lo mejor: poder aprender de la vida.

Hermanos: Silvia, Juan Pablo y Bety.

A cada uno: ¡Los quiero y gracias por su ayuda siempre!

A la persona que lo lea, espero que sea de utilidad.

“Observa como la naturaleza-árboles, flores, pasto- crece en silencio, ve las estrellas, la luna y el sol, como se mueven en silencio...” M.T.

“Sigo la naturaleza sin ser capaz de alcanzarla.” Claude Monet.

“Human all too human.” Friedrich Nietzsche.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	6
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	7
HIPOTESIS.....	7
OBJETIVOS	
Objetivo general	8
Objetivos particulares	8
MATERIALES Y MÉTODOS	
Colecta del material vegetal	9
Obtención de los extractos.....	9
Pruebas biológicas	10
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	10
Evaluación antifúngica	11
Evaluación de la actividad antioxidante.....	13
Contenido de fenoles totales (CFT)	13
Contenido de flavonoides totales	13
Fraccionamiento biodirigido	14
Análisis estadísticos	15
RESULTADOS	
Colecta del material vegetal y obtención de los extractos	16
Actividad antibacteriana	17
Actividad antifúngica.....	22
Evaluación de la actividad antioxidante.....	24
Contenido de Fenoles totales.....	25

Contenido de Flavonoides totales	26
Análisis químico del extracto metanólico	27
Fraccionamiento biodirigido	31
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	56
APÉNDICES	57
1 Descripción botánica	57
2 Zona de colecta.....	62
3 Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer	65
4 Microtécnica de dilución en caldo	68
5 Efecto del extracto sobre la curva de crecimiento bacteriano	70
6 Inhibición del crecimiento radial	71
7 Determinación de la concentración fungicida media (CF ₅₀)	72
8 Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH•)	73
9 Contenido de fenoles totales (CFT).....	75
10 Contenido de flavonoides totales.....	77
11 Cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa fina (CCF)	78
12 Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	80
13 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	81
REFERENCIAS	82

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cepas de bacterias evaluadas en la prueba cualitativa	10
Cuadro 2. Cepas de levaduras evaluadas.....	11
Cuadro 3. Cepas de hongos filamentosos evaluadas.....	12
Cuadro 4. Datos de colecta y rendimiento de los extractos de la fibra.....	16
Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM).....	19
Cuadro 6. Actividad antifúngica del extracto metanólico de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	22
Cuadro 7. CF ₅₀ de las cepas de hongos filamentosos.....	23
Cuadro 8. Resumen de la actividad antioxidante con respecto al contenido de fenoles totales y flavonoides.....	27
Cuadro 9. Compuestos mayoritarios del extracto metanólico de la fibra.....	28
Cuadro 10. Tiempos de retención y máximo de absorción en el espectro de UV de los compuestos detectados en el extracto metanólico de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	30
Cuadro 11. Fraccionamiento del extracto metanólico por CC y CCF.....	31
Cuadro 12. Actividad antibacteriana de las fracciones del extracto metanólico de la fibra sobre <i>V. cholerae</i> cc.....	33
Cuadro 13. Compuestos mayoritarios de la fracción 10.....	34
Cuadro 14. Compuestos mayoritarios de la fracción 19.....	36
Cuadro 15. Tiempo de retención y UV λ_{\max} de los compuestos de la fracción 32.....	38

Cuadro 16. Tiempo de retención y UV λ_{\max} de los compuestos de la fracción 41.....41

Cuadro 17. Tiempo de retención y UV λ_{\max} de los compuestos de la fracción 49.....44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Halos de inhibición (mm) del cloranfenicol y el extracto metanólico.....17

Figura 2. Halos de inhibición (mm) del control positivo (cloranfenicol) y del extracto, por grupo bacteriano: Gram positivas y Gram negativas.....18

Figura 3. Efecto del extracto MeOH sobre la curva de crecimiento de *E. faecalis* H.A.....20

Figura 4. Efecto del extracto MeOH sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* (cc).....21

Figura 5. Actividad antioxidante del extracto MeOH por reducción del radical DPPH.....24

Figura 6. Curva patrón de ácido gálico.....25

Figura 7. Curva patrón de quercetina.....26

Figura 8. Cromatograma de la CG-EM del extracto metanólico de la fibra de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.....28

Figura 9. Cromatograma del análisis de HPLC del extracto metanólico.....29

Figura 10. Cromatograma de la fracción 10.....34

Figura 11. CCF de la fracción 17 observadas a longitud de onda de: 366 nm y luz visible, 366 nm y 254 nm.....35

Figura 12. Cromatograma de la fracción 19.....36

Figura 13. Cromatograma de HPLC de la fracción 32.....37

Figura 14. Espectros de UV para la obtención de los máximos de absorción de los compuestos de la fracción 32.....	38
Figura 15. Cromatograma de HPLC de la fracción 41.....	41
Figura 16. Espectros de UV de los compuestos de la fracción 41.....	42
Figura 17. Cromatograma de HPLC de la fracción 49.....	44
Figura 18. Espectros de UV de los compuestos de la fracción 49.....	45
Figura 19. Árbol y fruto de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	57
Figura 20. <i>Ceiba aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	58
Figura 21. Fenotipos de los frutos de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	59
Figura 22. Distribución de <i>C. aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	60

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ATCC	American Type Culture Collection
AlCl ₃	Cloruro de aluminio
CA ₅₀	Concentración Antioxidante media
CBM	Concentración Bactericida Mínima
cc	caso clínico
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CF ₅₀	Concentración Fungicida media
CFM	Concentración Fungicida Mínima
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPPH	Radical 2,2 – Difetil-1- Picril Hidracil
eAG/g	equivalentes de Ácido Gálico por gramo
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
eQ/g	equivalentes de Quercetina por gramo
eV	electrón Volts
H. A.	Hospital Los Ángeles
Hex	hexano
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico

H ₃ PO ₄	ácido fosfórico
MeOH	metanol
µg	microgramo
M-H	Mueller Hinton
N	Normalidad
NIST	National Institute of Standards and Technology
nm	nanómetros
PDA	Agar Papa Dextrosa
subsp.	subespecie
T.R.	Tiempo de Retención
TTC	sal de tetrazolio oxidada
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta

RESUMEN

En San Rafael, poblado del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, se han registrado 374 especies vegetales, de las cuales 18% son utilizadas como plantas medicinales. *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, es una especie de la que se reportan varios usos y que presenta la mayor concentración de árboles en comunidades del Valle. Se conoce por informes orales, el uso medicinal de la fibra del fruto en su aplicación en heridas, las cuales pueden ser infectadas por hongos y bacterias, que impiden que se lleve a cabo el proceso de cicatrización. Debido a lo anterior, en el presente estudio se obtuvo el extracto metanólico de la fibra, y se evaluó su actividad antibacteriana y antifúngica.

El extracto presentó actividad sobre *E. faecalis*, *S. aureus* y *V. cholerae* (cc) de las 8 cepas evaluadas en la prueba cualitativa. Las más sensibles al extracto fueron *V. cholerae* (CMI= 8 mg/ml y CBM= 12 mg/ml) y *E. faecalis* (CMI= 2 mg/ml y CBM= 14 mg/ml), en las cuales se observó un efecto en la población, por los resultados de la curva de crecimiento bacteriano. Las cepas de hongos filamentosos más sensibles al extracto fueron: *T. mentagrophytes* y *R. lilacina* (CF₅₀= 1.52 mg/ml y CF₅₀= 2.02 mg/ml respectivamente; CFM= 6.0 mg/ml en ambas cepas), seguidas de *F. moniliforme* (CF₅₀= 1.08 mg/ml y CFM= >8mg/ml) y no presentó actividad en levaduras. La actividad antioxidante fue de CA₅₀= 36.42 µg/ml y está relacionada con el contenido de fenoles totales (74.4 mg eAG/g) y el contenido de flavonoides totales (21.982 mg (eQ)/g) del extracto.

De las 75 fracciones probadas contra *V. cholerae* cc, 13 presentaron actividad. Las fracciones con mayor actividad fueron de polaridad Hex-AcOEt (proporción 7:3), de las cuales se identificaron: campesterol, stigmasterol, ácido hexadecanoico, gama sitosterol, fenoles y alcanos de cadena larga. El extracto presentó mayor actividad que las fracciones, lo cual puede ser debido a ésteres del ácido oleico y linoléico; metil isohexadecanoato; ácido palmítico; chalconas, xantona, fenilpropanoides y fenoles (compuestos mayoritarios), que pueden estar actuando sinérgicamente con los esteroides. Por lo anterior, se proporciona por primera vez evidencia científica que corrobora el uso medicinal de la fibra.

INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional es la suma completa de conocimientos, técnicas y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales (OMS, 2008).

Las plantas han formado la base de sofisticados sistemas de medicina tradicional que han estado en existencia por miles de años y continúan proveyendo nuevos remedios a la humanidad. Las medicinas del reino vegetal, fueron descubiertas por pruebas de ensayo y error practicadas durante milenios por diferentes culturas (Gurib-Fakim, 2006).

Las plantas medicinales son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Akerle, 1993). Típicamente contienen mezclas de diferentes compuestos químicos que pueden actuar individualmente, aditivamente o en sinergia para mejorar la salud (Gurib-Fakim, 2006) y sus propiedades farmacológicas son producidas por una amplia variedad de metabolitos secundarios (Salisbury, 1992).

Cerca de 119 sustancias químicas, derivadas de 90 especies de plantas, pueden ser consideradas como drogas importantes actualmente en uso en uno o más países (Farnsworth et al., 1985), de las cuales el 74% fueron descubiertas como resultado de estudios químicos de plantas utilizadas en la medicina tradicional (Gurib-Fakim, 2006).

Actualmente el 80% de la población mundial, principalmente de los países en desarrollo, como México, dependen de medicinas derivadas de las plantas para el cuidado de la salud (OMS, 2008). De acuerdo con un inventario llevado a cabo por el Instituto Nacional Indigenista (INI), hay más de 3000 especies de plantas medicinales que son usadas en el país para el tratamiento de enfermedades comunes (Argueta y Cano, 1994; Taddei et al., 1999), las cuales en su mayoría no han estado bajo investigación química, farmacológica o

clínica y han sido ignoradas por muchas décadas. Sin embargo, las autoridades de salud mexicanas siguiendo los lineamientos de la OMS, están actualmente interesadas en el uso de éstas plantas para sanar padecimientos comunes, por lo que las investigaciones que tengan como objetivo el cultivo, estudio y procesamiento con fines terapéuticos se consideran estratégicas e importantes (Soto et al., 2002).

México es uno de los países de América con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la herbolaria medicinal (Linares et al., 1999; Hernández, 1993; Casas et al., 2001; Dávila et al., 2002a), así como una de las regiones del mundo identificada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), que requiere de especial atención para el desarrollo de actividades de investigación y protección (Davis et al., 1997), por la diversidad y endemismo identificados en doce centros de diversidad, entre ellos el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, que fue declarado como reserva de la biósfera por el Gobierno Mexicano-UNESCO en Febrero de 1998 (Dávila et al., 2002a).

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán es una región semiárida localizada entre los estados de Puebla y Oaxaca, y tiene un área aproximada de 10,000 km², la cual contiene 2,703 especies de plantas que representan entre 10–11.4 % de la flora mexicana (Dávila et al., 2002a). Además de ser un sitio con alta diversidad biológica, es una de las tres zonas semiáridas del país con mayor número de elementos endémicos (Rzedowski, 1991; Villaseñor et al., 1990; Dávila et al., 1995) y se tiene registro de ser habitada por 8 grupos étnicos: Chocholtecas, Nahuas, Popolocas, Mazatecos, Chinantecos, Cuicatecos, Ixcatecos, y Mixtecos desde hace 10,000 años (Casas et al., 2001; CONANP, 2014).

Los grupos indígenas con grandes conocimientos de la herbolaria medicinal y del ambiente donde se desarrollan estas plantas, poseen los conocimientos acumulados por muchas generaciones y constituyen la base de la biodiversidad cultural global y del uso sustentable de estos recursos (Caballero y Cortés, 2001; Canales et al., 2006). Específicamente, en el Valle de Tehuacán la diversidad cultural y la antigüedad de la ocupación han determinado la riqueza del conocimiento de las plantas y una importante experiencia tecnológica en la manipulación de sus poblaciones y comunidades (Avendaño et al., 2006).

En San Rafael, poblado localizado en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, 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), y es objeto de una línea de investigación 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 Biósfera (Dávila, 2002b; Lira, 2001).

El "pochote" (*Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*) es una especie que pertenece a la familia Bombacaceae. A nivel mundial se considera que hay entre 22 y 24 géneros con 140 a 250 especies de esta familia. Para México, Standley (1923) describe seis géneros con 14 especies; Pennington y Sarukhán (1998) refieren seis géneros con siete especies, que se desarrollan desde bosque tropical caducifolio hasta bosque tropical perennifolio (Pagaza y Fernández, 2004) y que se conocen como "ceibas" o "pochotes".

El género *Ceiba* es de gran importancia desde el punto de vista cultural, estos árboles se han venerado como árboles sagrados por los grupos indígenas de nuestro país (Pagaza y Fernández, 2004). De acuerdo con la cosmología maya, en el centro del mundo crece la ceiba (*yaax che*) "árbol verde", considerada el sostén del mundo cuyas raíces salen del inframundo y cuya copa alcanza el cielo. Los mitos lacandones narran que el mundo está sostenido por cuatro ceibas que crecen en los cuatro puntos cardinales del universo y se le asocia a la fertilidad, al nacimiento, las mujeres y la protección de los pequeños (Singer-Marion, 2000).

En el Valle de Tehuacán, *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* es manejada principalmente en comunidades vegetales naturales encontrada junto con maíz (*Zea mays* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), chile (*Capsicum annum* L.) y calabaza (*Cucurbita pepo* L.) en el registro histórico en las Cuevas de Coxcatlán (Casas et al., 2001; Avendaño et al., 2006) y presenta la mayor concentración de árboles en las comunidades de Coxcatlán, San Rafael y San José Tilapa, municipio de Coxcatlán, Puebla (Avendaño et al., 2006).

De acuerdo con estudios etnobotánicos previos, los pobladores mayores de 60 años mencionan el uso medicinal del pochote: la corteza se toma en infusiones para el dolor de riñones, tumores, gastritis, y para curar heridas (Rosas, 2003; Canales et al., 2005; Avendaño et al., 2006). La fibra, que desde el punto de vista morfológico son los tricomas cuyas células elongadas provienen de la epidermis ventral de la pared del ovario y que cubren a las semillas maduras (Marzinek y Mourão, 2003), es empleada en la elaboración de cojines con especial demanda para enfermos de asma (Orozco, 2010). Además, se conoce que la fibra es aplicada en heridas, permitiendo que se lleve a cabo la cicatrización, conocimiento aportado por informes orales y del cual no se tiene registro previo en estudios etnobotánicos.

Sin embargo, se sabe que el uso tradicional de la fibra como relleno, se ha ido perdiendo en la zona debido a que se sustituye por materiales sintéticos modernos (Avendaño et al., 2006), incluso se tiene conocimiento de la disminución de las poblaciones de ésta especie en las comunidades del Valle (Apéndice 1), por lo que los estudios que se realicen acerca de ésta especie son de especial importancia.

ANTECEDENTES

En la comunidad de San Rafael se ha realizado un trabajo sobre la flora útil (Rosas, 2003) y otro sobre la composición, manejo y uso de los vegetales de los huertos (Blanckaert et al., 2004), destacando a *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* como una de las especies de importancia económica. Además, se reportan 12 usos diferentes de partes diferentes de los árboles de pochote, entre la gente de las comunidades de San José Tilapa, San Rafael y Coxcatlán, Puebla, de las cuales destacan el uso: medicinal, comestible (raíces, semillas y flores), hábitat de una larva comestible, alimento de ganado, combustible y artesanal (Avendaño et al., 2006).

De la familia Bombacaceae se tiene el conocimiento de varios usos medicinales en diferentes países, debido a sus propiedades antipiréticas, analgésicas, antiinflamatorias, astrigentes, estimulantes diuréticas y antimicrobianas (Paula et al., 1997).

Canales et al. (2005), reportan la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* sobre: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Vibrio cholera*.

Aguilar en 2006, evaluó la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la corteza, destacando la naturaleza polar del compuesto responsable de actividad, conformado por anillos aromáticos, un grupo funcional OH y azúcares.

Orozco en el 2010, reporta que los extractos: metanólico crudo y metanólico libre de compuestos no polares de la corteza, tienen actividad en cepas de bacterias (Gram positivas y Gram negativas) y no tienen propiedades antifúngicas. Además, se identificaron: fenilpropanoides, cumarina, terpenoides e isoflavonas en las fracciones con actividad antibacteriana.

Chekuboyina et al. (2012), reportan que el aceite de las semillas de *Ceiba pentandra* tiene actividad contra bacterias, principalmente en *B. cereus*, *B. subtilis* y *S. aureus* (Gram positivas) y Gram negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), así como contra

cepas fúngicas *Aspergillus flavans*, *A. niger*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae*. La mayor actividad fue observada en cepas bacterianas comparada con las cepas fúngicas.

Con base en lo anterior, se sabe que *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* es una especie endémica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y que el conocimiento medicinal de su uso para evitar la infección de heridas, no está reportado previamente y se ha ido perdiendo en la población. Por lo anterior, se justifica ésta investigación para validar su uso medicinal con una base científica, con el fin de que este conocimiento sea rescatado, conservado y difundido.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido al uso de la fibra del "pochote", *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, en su aplicación para sanar heridas como parte de la medicina tradicional del poblado de San Rafael, Coxcatlán: ¿Será posible que el extracto metanólico presente actividad antimicrobiana, así como actividad antioxidante y compuestos responsables de actividad?

HIPOTESIS

Las plantas sintetizan metabolitos secundarios, algunos de los cuales presentan actividad antibacteriana, antifúngica, antioxidante, entre otras. Debido al uso de la fibra de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, en su aplicación en heridas, en San Rafael, Coxcatlán, es posible que esta especie sintetice metabolitos secundarios responsables de dicha actividad.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana, así como la composición química del extracto metanólico de la fibra de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

Objetivos particulares

- Obtener el extracto metanólico de la fibra de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, por medio del método de maceración.
- Evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica (levaduras) por el método de difusión en agar de Kirby-Baüer.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) por la microtécnica de dilución en caldo del extracto activo en las cepas más sensibles.
- Determinar la actividad del extracto en la curva de crecimiento bacteriano.
- Determinar la actividad cualitativa del extracto sobre cepas de hongos filamentosos por el método de inhibición del crecimiento radial.
- Determinar la concentración fungicida media (CF₅₀) y la concentración fungicida mínima (CFM) en las cepas sensibles al extracto con la técnica de inhibición del crecimiento radial.
- Determinar la actividad antioxidante del extracto activo por el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), el contenido fenoles totales (Folin-Ciocalteu) y flavonoides por el método de Dowd.
- Dilucidar la composición química del extracto metanólico por medio de una cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés).
- Realizar un fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material vegetal

Se extrajo la fibra de frutos maduros de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* (Apéndice 1), los cuales fueron colectados en San Rafael, dentro del municipio de Coxcatlán, Puebla (Apéndice 2), de poblaciones de árboles de tres altitudes. Durante 2003 a 2005 se ubicaron 30 árboles al azar en cada sitio (90 árboles en total). Se recolectaron los frutos de dos a tres ramas por individuo, obteniéndose 273 frutos: 53 para el fenotipo morado, 88 para el cenizo y 132 para el verde-rojizo (Avenidaño et al., 2008). Se determinó la especie y se depositó un ejemplar en el herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Obtención de los extractos

Los extractos de la fibra del "pochote" se obtuvieron por el método de maceración (Domínguez, 1973). La fibra obtenida de los frutos (384.4g) se puso a macerar en un matraz con hexano, después el extracto obtenido se filtró y se destiló a presión reducida en un rotavapor, colocando el extracto en un recipiente de vidrio para completar la evaporación del solvente.

Para la obtención del extracto metanólico se realizó el mismo procedimiento pero usando como solvente metanol, dejando macerar la fibra hasta que el solvente dejó de presentar coloración.

Finalmente se calculó el rendimiento de los extractos con respecto al peso de la fibra colectada.

Pruebas biológicas

Evaluación de la actividad antibacteriana

Se utilizaron nueve cepas bacterianas (tres Gram positivas y cinco Gram negativas) de importancia médica:

Cuadro 1. Cepas de bacterias evaluadas en la prueba cualitativa.

Tipo	Cepa	Clasificación, serotipo o donadas por:
Gram positivas	<i>Enterococcus faecalis</i>	H. A.
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
Gram negativas	<i>Salmonella typhimurium</i>	FES Cuautitlán
	<i>Enterobacter cloacae</i>	FES Cuautitlán
	<i>Proteus mirabilis</i>	Caso clínico (cc)
	<i>Vibrio cholerae</i>	Caso clínico (cc)
	<i>Vibrio cholerae</i>	CDC V 12 (El Tor)

Evaluación cualitativa

La evaluación cualitativa de la actividad antibacteriana, se llevó a cabo de acuerdo con el método de difusión en agar de Kirby-Baüer, en el cual los discos fueron impregnados con 2 mg del extracto a probar; como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloranfenicol, y como control negativo sensidiscos con 10 µl del solvente empleado para diluir el extracto a evaluar (Cole, 1994; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; Beer y Sherwood, 1945) (Apéndice 3).

Evaluación cuantitativa

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de las cepas sensibles a los extractos por la microtécnica de dilución en

caldo, con concentraciones de: 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml. Las cajas fueron inoculadas con 50 µl de cultivo bacteriano a una concentración de 1×10^5 UFC/ml durante 24 horas (Koneman et al., 1985) (Apéndice 4).

Efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriana

Se evaluó el efecto del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriana, utilizando una cepa bacteriana Gram positiva y una Gram negativa (las que presentaron los valores menores en las pruebas cuantitativas). Se monitoreó el 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 (Muroi et al., 1993) (Apéndice 5).

Evaluación antifúngica

La evaluación de la actividad se llevó a cabo en cinco cepas de levaduras (Cuadro 2) y cinco cepas de hongos filamentosos (Cuadro 3).

Levaduras

Cuadro 2. Cepas de levaduras evaluadas.

Cepa	Número ATCC o proporcionada por:
<i>Candida albicans</i>	14065
<i>C. albicans</i>	32354 CUSI
<i>C. albicans</i>	630
<i>C. tropicalis</i>	Hospital Los Ángeles
<i>Criptococcus neoformans</i>	Laboratorio de micología y parasitología. Facultad de medicina UNAM.

Evaluación cualitativa

La actividad antifúngica sobre levaduras se evaluó de acuerdo con el método de difusión en agar de Kirby-Baüer (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 3). Las levaduras fueron cultivadas en agar PDA a 35°C. Los discos fueron impregnados con 2 mg del extracto a probar. Como control positivo se utilizaron sensidiscos impregnados con Nistatina (25 µg por disco) y como controles negativos se impregnaron sensidiscos con el solvente empleado (10µl) para evitar errores en los resultados y comprobar que no tienen ningún efecto sobre los microorganismos. Todos los bioensayos se realizaron por triplicado.

Hongos filamentosos

Cuadro 3. Cepas de hongos filamentosos evaluadas.

Cepa	ATCC o proporcionada por:
<i>Aspergillus niger</i>	CDBB-H-179
<i>Aspergillus sp.</i>	Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz. UBIPRO. FES Iztacala
<i>Fusarium moniliforme</i>	CDBB-H-265
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	NRLL3299. Laboratorio Fisiología Vegetal. UBIPRO. FES Iztacala.
<i>Rhizoctonia lilacina</i>	CDBB-H-306
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	CDBB-H-1112

Evaluación cualitativa

Para el análisis cualitativo se utilizó la técnica de inhibición del crecimiento radial (Apéndice 6) usando una concentración de 2 mg por disco del extracto a probar, como control positivo se utilizó Ketoconazol (7 µg por disco) y como control negativo sensidiscos impregnados con 10 µl del solvente utilizado para disolver el problema (Wang y Bun, 2002).

Evaluación cuantitativa

Para la determinación de la concentración fungicida media (CF_{50}) y la concentración fungicida mínima (CFM), se realizó el método de inhibición del crecimiento radial reportado por Wang y Bun en 2002 (Apéndice 7). Las concentraciones empleadas para los bioensayos fueron: 8, 6, 4, 2, 1, 0.5 mg/ml del extracto. Como control negativo se utilizó Agar con DMSO (1%), como control positivo se aplicaron en el agar las siguientes concentraciones de Ketoconazol: 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 $\mu\text{g/ml}$ y como testigo se llenaron pozos solamente con agar. Cada bioensayo se realizó por triplicado.

Evaluación de la actividad antioxidante

La actividad antioxidante fue evaluada con el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Para la determinación de la Concentración Antioxidante Media (CA_{50}), se utilizaron las siguientes concentraciones: 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 ppm.

Como control positivo se utilizó quercetina a las mismas concentraciones que el compuesto problema. Se llenaron pozos con 200 μl de MeOH grado HPLC, como blanco (Okusa et al., 2007) (Apéndice 8).

Contenido de fenoles totales (CFT)

Para el CFT se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu (Apéndice 9). Se realizó una curva de calibración de ácido gálico con las concentraciones: 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$. La concentración que se utilizó para el extracto fue de 50 $\mu\text{g/ml}$ y las absorbancias se interpolaron con la curva de calibración del ácido gálico (Método modificado de Singleton et al., 1999).

Contenido de flavonoides totales

La determinación del contenido de flavonoides se llevó a cabo por el Método de Dowd (Apéndice 10) con el uso de una solución de AlCl_3 al 2%. Se realizó una curva patrón de quercetina a diferentes concentraciones (1-100 $\mu\text{g/ml}$) y una concentración del extracto de 0.2 mg/ml. Las absorbancias se determinaron a 415 nm.

Fraccionamiento biodirigido

Cromatografía en columna (CC)

Después de obtener el extracto metanólico se separaron sus componentes mediante cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa fina (CCF).

La cromatografía por adsorción en columna abierta, se realizó con 3 g del extracto metanólico (Apéndice 11). Como fase estacionaria se utilizó sílica gel de malla 70-230 μm (Sigma 5-2509) y la fase móvil consistió en mezclas de Hexano, Hex-AcOEt, AcOEt-MeOH, MeOH en orden creciente de polaridad y metanol con H_3PO_4 (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2%).

Se obtuvieron alícuotas de 20 ml, de las cuales se corrieron muestras en cromatofolios de sílica gel (Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck). Se observó el bandeo de las muestras con luz UV ($\lambda = 254$ nm onda corta; $\lambda = 360$ nm onda larga) y reveladores: vainillina al 2% y H_2SO_4 (Muñoz, 2013) y sulfato cérico, seguidas de calentamiento (aproximadamente 110°C). Se agruparon las alícuotas en fracciones, para posteriormente llevar a cabo la prueba de susceptibilidad.

A los cristales se les midió el punto de fusión con un aparato de Fisher-Johns.

Prueba biológica

Se realizó la prueba de acuerdo con la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer (Apéndice 3), con las fracciones que presentaron buen rendimiento, colocando 2 mg por sensidisco. La evaluación se realizó sobre la bacteria Gram negativa de *V. cholerae* (cc) que presentó previa sensibilidad al extracto.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se inyectó el extracto metanólico y las fracciones que presentaron actividad biológica en HPLC, para verificar su composición química, así como conocer si presentan algunos de los estándares inyectados previamente (UBIPRO).

Se empleó una columna Allsphere ODS-1, con el método estandarizado para flavonoides, a una presión de 269 bar y una temperatura de 22°C-23°C corriendo el extracto con una

mezcla de MeOH: acetonitrilo: H₂O (25:25:50), en un tiempo de 20 minutos (Apéndice 12). Para las fracciones que presentaron actividad biológica: 32, 41, 49, 74, 77 se empleó como fase móvil MeOH: acetonitrilo:H₂O:H₃PO₄ (25:25:50:0.1).

Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-EM)

Se realizó una CG-EM del extracto y de las fracciones de baja polaridad (que presentaron actividad biológica). Para ello se utilizó un Cromatógrafo de Gases Modelo 6850 acoplado a un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C VL MSD (ambos de marca Agilent Technologies). Se empleó una columna RTX, compuesta de dimetil polisiloxano (95 %) y fenil polisiloxano (5 %) y como fase móvil, helio como gas de arrastre (Apéndice 13).

La determinación de las estructuras e identificación de los compuestos, se llevó a cabo con la base de datos de la biblioteca NIST (Linstrom y Mallard, 2014).

Análisis estadísticos

Para determinar si hubo actividad antibacteriana, se realizó un análisis descriptivo de los datos obtenidos en las pruebas cualitativas. Fueron calculadas por especie, extracto y tipo bacteriano, las siguientes medidas descriptivas: mediana, media, cuartil 1 (Q₁), cuartil 3 (Q₃), mínimo y máximo, obteniendo los diagramas de caja.

Para determinar si existieron diferencias significativas se utilizó un análisis de varianza factorial (ANOVA), en el cual los factores considerados fueron: especies estudiadas, extracto y cepa bacteriana.

Los análisis fueron realizados con el paquete de cómputo estadístico: Minitab versión 16.

Para el análisis de la actividad antifúngica y antioxidante se realizaron análisis de regresión lineal y logarítmica.

RESULTADOS

Obtención de los extractos

La determinación de la subespecie se llevó a cabo por la Dra. Aidé Avendaño en el banco de semillas del Colegio de Postgraduados de la Universidad Autónoma de Chapingo. El ejemplar que se puede consultar y los datos presentados del número de colecta y registro (Cuadro 4) se encuentran en el herbario de la FES Iztacala, los cuales pertenecen a la primera colecta realizada para la zona (Blanckaert et al., 2004). Los datos en la ficha presentes en el ejemplar muestran el nombre de *C. parvifolia*, que es un sinónimo de la subespecie de acuerdo con la revisión de Gibbs y Semir (2003) de la familia Bombacaceae.

Cuadro 4. Datos de colecta y rendimiento de los extractos de la fibra.

Especie		Rendimiento			
Nombre científico	<i>Ceiba aesculifolia</i> subsp. <i>parvifolia</i>	Extracto hexánico (H)		Extracto metanólico (MeOH)	
Nombre común	Pochote	Gramos	%	Gramos	%
Familia	Bombacaceae	2.15	0.56	14.81	3.85
Gramos colectados	384.4 g				
No. de colecta	RRL146				
No. de registro	29214				

Actividad antibacteriana

Evaluación cualitativa

El extracto presentó actividad antibacteriana en las cepas: *E. faecalis* H. A., *S. aureus* 25923 y *V. cholerae* cc, con los mayores valores de mediana de inhibición (10.4, 9 y 10 mm respectivamente), comparado con las demás cepas donde no hubo inhibición (Figura 1).

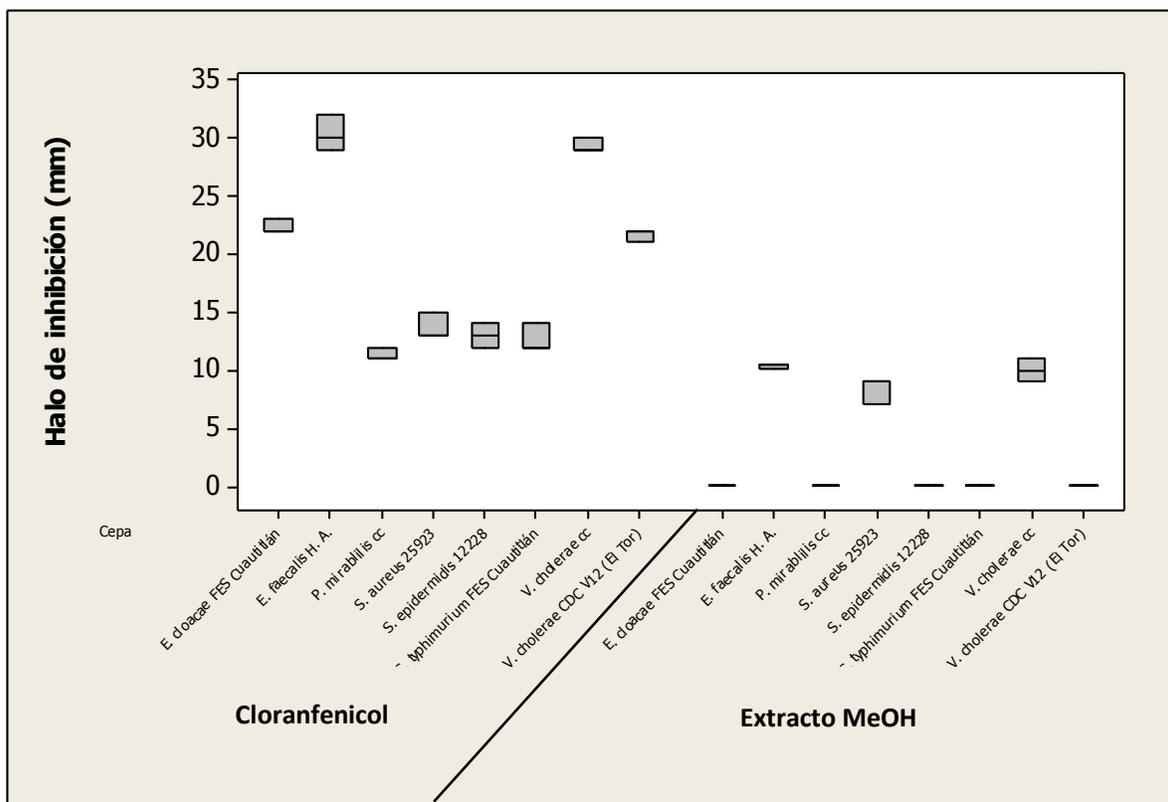


Figura 1. Halos de inhibición (mm) del cloranfenicol y el extracto metanólico.

Las cepas que mostraron los mayores halos con el cloranfenicol fueron: *E. faecalis*: 30.33 mm, *V. cholerae* (cc): 29.00 mm y *V. cholerae* CDC V12 (El Tor): 22.00 mm y *E. cloacae* FES C: 22.00 mm, las cuales son también los valores mínimos obtenidos para los halos, a excepción de *E. faecalis*, donde el 50% de los datos se encontró entre 29.00-32.00 mm (Q_1, Q_3).

El ANOVA mostró que hubo diferencias significativas entre el extracto y el cloranfenicol ($F= 4886.61$, $P= 0.00$), entre las cepas ($F= 327.66$, $P=0.00$) y existió interacción entre las cepas y la sustancia aplicada: cloranfenicol y extracto ($F= 89.88$, $P= 0.00$).

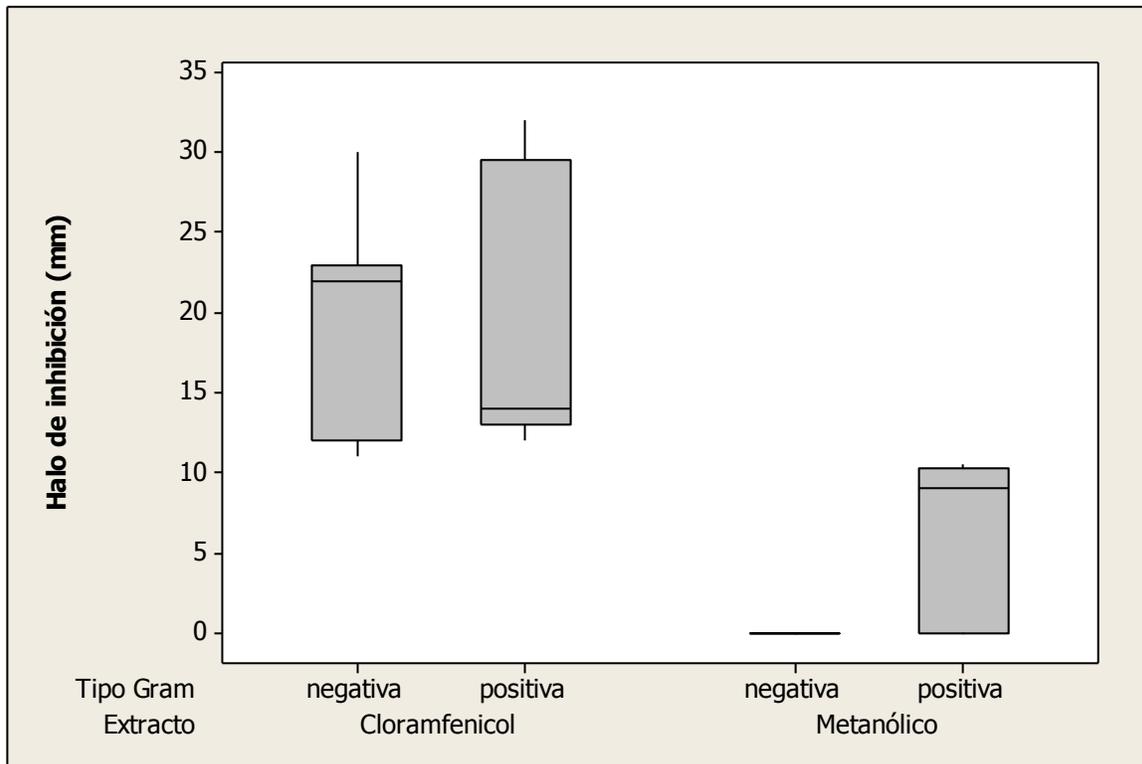


Figura 2. Halos de inhibición (mm) del control positivo (cloranfenicol) y del extracto, por grupo bacteriano.

La mediana de los valores de inhibición del cloranfenicol fue de 22 mm en bacterias Gram negativas y de 14 mm en bacterias Gram positivas (Figura 2). El extracto metanólico presentó una mediana menor en Gram positivas ($M_e= 9$ mm) comparada con la del control positivo y no hubo inhibición en las Gram negativas ($M_e= 0$ mm).

El ANOVA factorial mostró diferencias significativas entre el cloranfenicol y el extracto metanólico ($F= 67.03$, $P= 0.00$), sin embargo, no hubo diferencias significativas entre el grupo bacteriano ($F= 1.04$, $P= 0.31$) y no hubo interacción entre el cloranfenicol o el extracto y el tipo bacteriano ($F= 1.62$, $P= 0.21$).

Evaluación cuantitativa

De acuerdo con los resultados de la prueba cualitativa, se identificaron las cepas sensibles al extracto, de las cuales se determinó la concentración a cual se inhibe el crecimiento bacteriano. Los resultados de la prueba cuantitativa muestran que las cepas más sensibles al extracto fueron: *V. cholerae* y *E. faecalis*, con los menores valores de CMI y CBM (Cuadro 5).

Cuadro 5. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Grupo	Cepa Bacteriana	CMI mg/ml	CBM mg/ml
Gram positiva	<i>E. faecalis</i> H. A.	2	14
	<i>S. aureus</i> 25923	>20	>>20
Gram negativa	<i>V. cholerae</i> (cc)	8	12

Efecto del extracto en la curva de crecimiento bacteriano

Después de conocer las concentraciones a las cuales ocurre un descenso en la población bacteriana o una eliminación del 99.9% de las bacterias (CMI y CBM), se realizaron las curvas de crecimiento, con el fin de determinar el tiempo en el que ocurre un descenso drástico de la población bacteriana. Para llevar a cabo esta prueba, se seleccionaron las cepas más sensibles al extracto: *E. faecalis* y *V. cholerae*, debido a que fueron las cepas con los valores menores de CMI y CBM.

Es importante destacar que hubo un cambio morfológico muy evidente (reducción del tamaño en las UFC) en las dos cepas evaluadas, por la aplicación del extracto en comparación a lo observado en el testigo.

En la Figura 3 se observa la curva de crecimiento de *E. faecalis*. Con la concentración de 14 mg/ml, sólo hay una disminución en el crecimiento de la población por debajo del observado a las concentraciones de 2 y 1 mg/ml y del testigo. Se observa un descenso a las 4 horas de exposición al extracto, para posteriormente crecer a las 24 horas.

Gram positiva

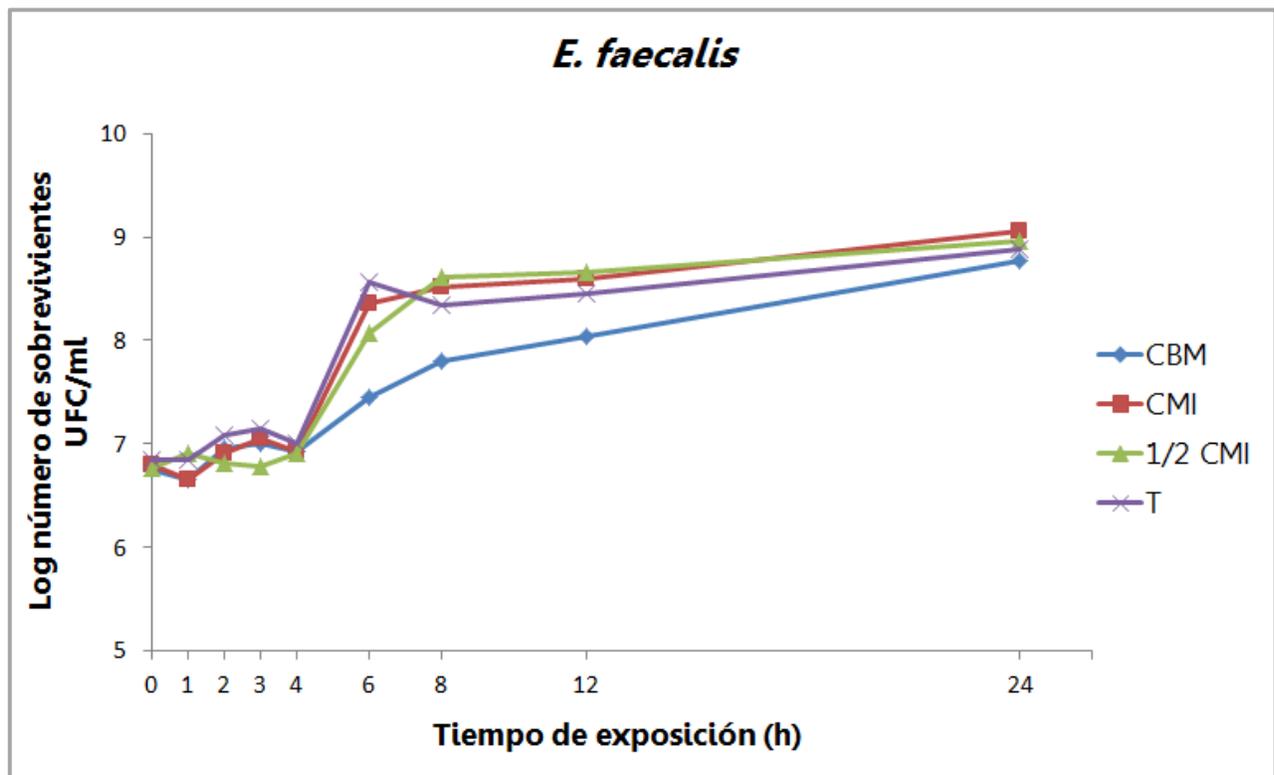


Figura 3. Efecto del extracto MeOH sobre la curva de crecimiento de *E. faecalis* H. A. $\frac{1}{2}$ CMI: 1mg/ml; CMI: 2 mg/ml; CBM: 14 mg/ml; T: testigo.

En *V. cholerae* (Figura 4) a las 4 horas disminuye el crecimiento bacteriano en las tres concentraciones ensayadas ($\frac{1}{2}$ CMI: 4 mg/ml; CMI: 8 mg/ml; CBM: 12 mg/ml), sin embargo después el cultivo crece similar que el testigo.

Gram negativa

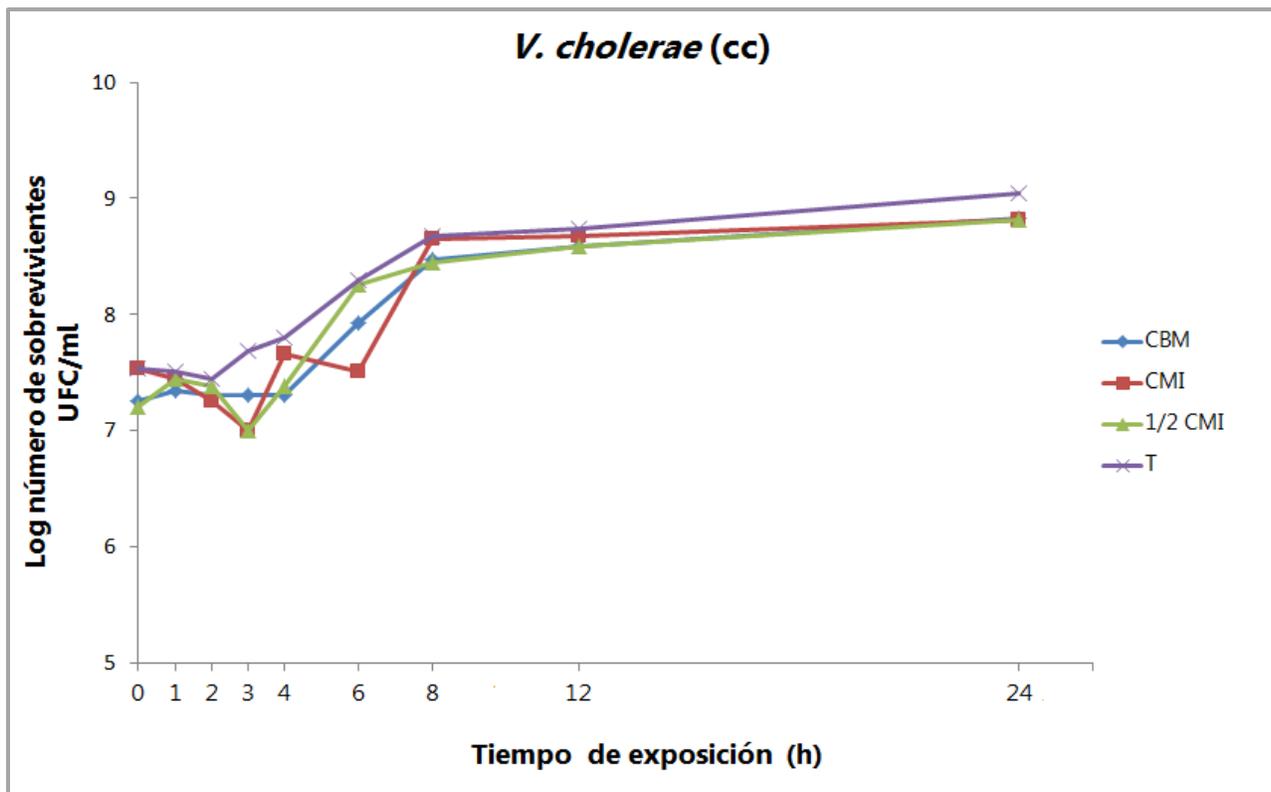


Figura 4. Efecto del extracto MeOH sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* (cc).
 $\frac{1}{2}$ CMI: 4 mg/ml; CMI: 8 mg/ml; CBM: 12 mg/ml; T: testigo.

Actividad antifúngica

Evaluación cualitativa

Por los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana del extracto, se procedió a probar su actividad en cepas de levaduras y de hongos filamentosos de importancia médica y económica.

De acuerdo con el método de difusión en agar, el extracto metanólico no presentó actividad sobre levaduras.

En el Cuadro 6 se muestran los resultados de la prueba cualitativa en hongos filamentosos. Es importante destacar la disminución de esporas en las cepas del género *Aspergillus*, así como el crecimiento del micelio de forma vertical, creciendo sobre el micelio muerto y no de manera horizontal (sobre el agar con el extracto), diferente a lo observado en el control.

Cuadro 6. Actividad antifúngica del extracto metanólico de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

		Extracto metanólico	Control Ketoconazol
Cepa	<i>A. niger</i>	√	√
	<i>Aspergillus sp.</i>	√	√
	<i>F. moniliforme</i>	√	√
	<i>F. sporotrichoides</i>	√	√
	<i>R. lilacina</i>	√	√√
	<i>T. mentagrophytes</i>	√	√√

Resultados obtenidos a partir de tres repeticiones. √√: mayor inhibición √: inhibición

Evaluación cuantitativa

Después de conocer que el extracto presenta actividad contra los hongos filamentosos, se llevó a cabo la evaluación cuantitativa, para conocer la concentración a la cual se inhibe el crecimiento. Todas las cepas fueron sensibles a Ketoconazol y las cepas más sensibles al extracto fueron *T. mentagrophytes* y *R. lilacina*, con una CF₅₀ de 1.52 mg/ml y 2.02 mg/ml respectivamente y una CFM de 6.0 mg/ml en ambas cepas, seguida de *F. moniliforme* con una CF₅₀ de 1.08 mg/ml y una CFM mayor a 8 mg/ml (Cuadro 7).

Las cepas con mayores valores de CF₅₀ fueron del género *Aspergillus* con 6.48 y 7.70 mg/ml, sin alcanzar la CFM.

Cuadro 7. CF₅₀ de las cepas de hongos filamentosos.

Cepa	Extracto		Control positivo
	CF ₅₀ (mg/ml)	CFM (mg/ml)	Ketoconazol CF ₅₀ (µg/ml)
<i>Aspergillus niger</i>	6.48	>8	15.29
<i>Aspergillus sp.</i>	7.70	>8	9.75
<i>Fusarium moniliforme</i>	1.08	>8	7.55
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	3.78	>8	3.90
<i>Rhizoctonia lilacina</i>	2.02	6	21.56
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1.52	6	1.16

Se muestran en **negritas** las cepas que obtuvieron los valores menores de CF₅₀ del extracto.

Evaluación de la actividad antioxidante

Las plantas son un recurso potencial de antioxidantes naturales (Ramamoorthy y Bono, 2007), que actúan contra los radicales libres, disminuyendo su capacidad de daño. Éstos radicales se producen al generarse una herida para impedir el crecimiento de microorganismos, pero pueden afectar también las células humanas. Debido a lo anterior, es importante saber si el extracto tiene capacidad antioxidante.

El extracto mostró una CA_{50} de 36.42 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 5), comparada con la quercetina (control positivo) con una $CA_{50}=4.6 \mu\text{g/ml}$.

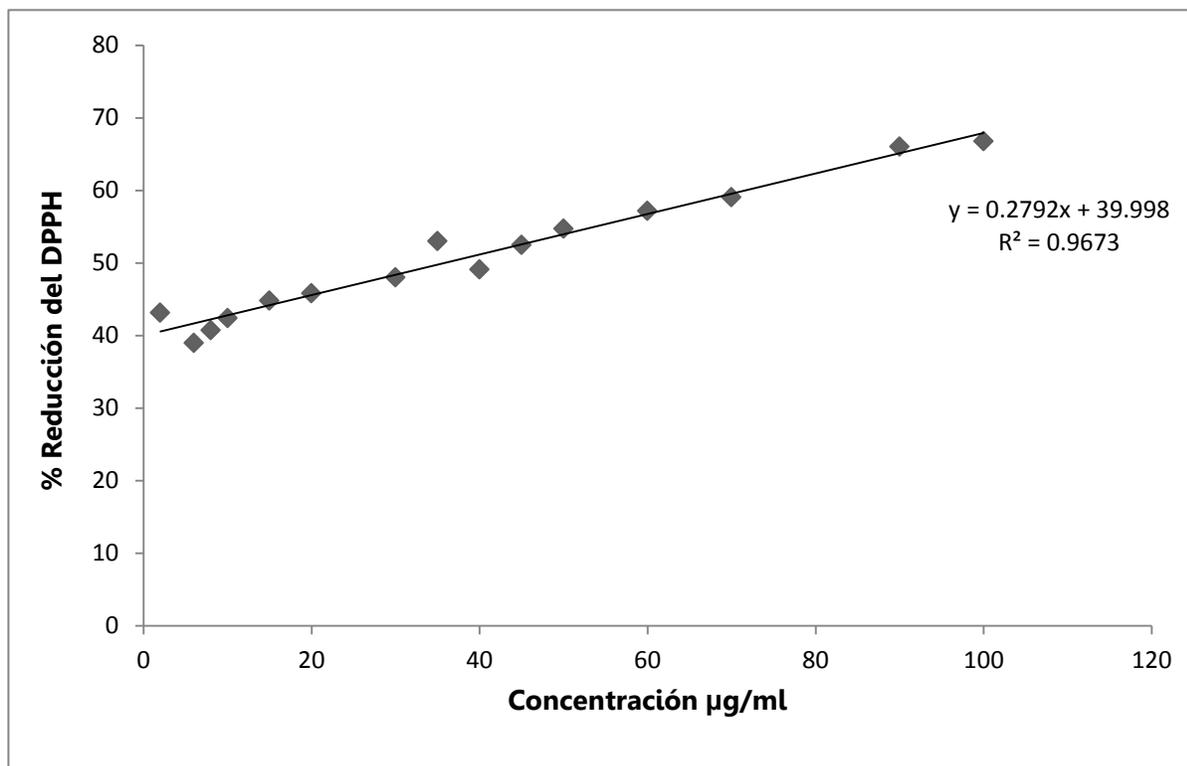


Figura 5. Actividad antioxidante del extracto MeOH por reducción del radical DPPH.

Los principales compuestos a los cuales se les atribuye actividad antioxidante son: fenoles y fenilpropanoides. De éstos, los flavonoides son los componentes fenólicos principales con capacidad antioxidante (Kalita et al., 2013). A continuación se muestran los resultados del contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto. En el Cuadro 8 se muestran los

resultados de la actividad antioxidante, relacionados con el contenido de fenoles totales y de flavonoides.

Contenido de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales del extracto fue de 74.4 mg eAG/g, que representa el 0.5% del extracto obtenido. La curva patrón de ácido gálico para la obtención del contenido de fenoles totales del extracto se muestra en la Figura 6.

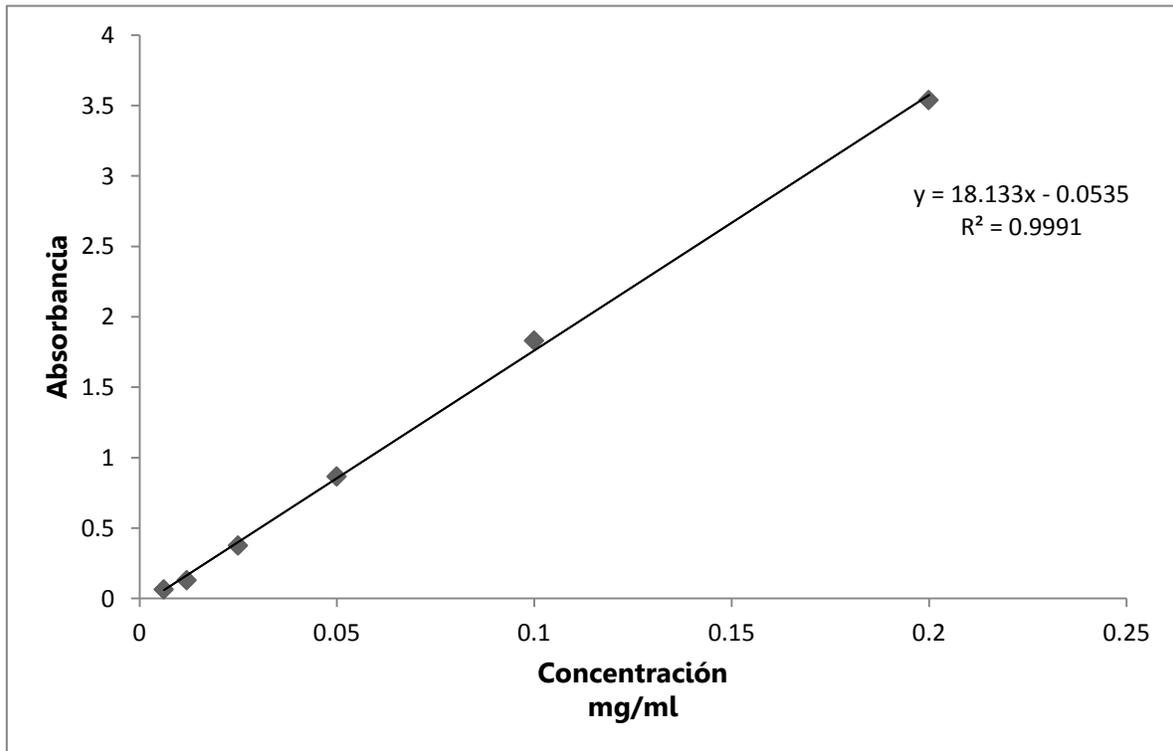


Figura 6. Curva patrón de ácido gálico.

Contenido de Flavonoides Totales

El resultado se obtuvo a partir de una curva patrón de quercetina (Figura 7) y fue de 21982.76 μg (eQ)/g, que representa el 0.022% de flavonoides totales por gramo de extracto.

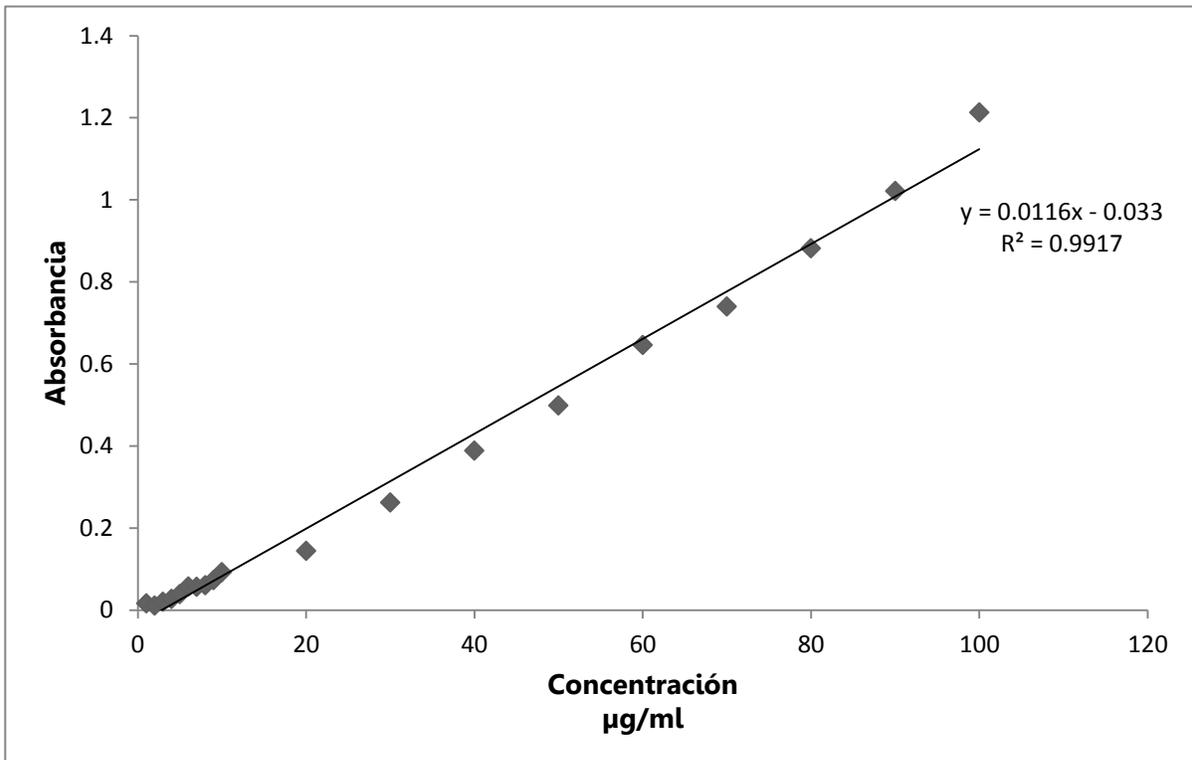


Figura 7. Curva patrón de quercetina.

Cuadro 8. Resumen de la actividad antioxidante con respecto al contenido de fenoles y flavonoides totales.

Prueba	Metodología	Resultado	% en 1 g de extracto	% del extracto (14.81 g)
Actividad antioxidante	Okusa et al., 2007.	CA ₅₀ = 36.42 µg/ml		
Contenido de fenoles totales	Singleton et al., 1999.	74.4 mg GA/g	7.44	0.50
Contenido de flavonoides totales	Método de Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007).	21982.76 µg (eQ)/g	0.022	0.15

Análisis químico del extracto metanólico

Después de comprobar la actividad biológica del extracto contra cepas de bacterias y hongos, fue necesario realizar el análisis químico del extracto mediante CG-EM y HPLC, con el fin de determinar los compuestos responsables de la actividad. En el caso de las muestras analizadas por HPLC (extracto y fracciones), se interpretaron los cromatogramas de acuerdo con los picos de absorción, los espectros de UV y su comparación con la literatura (Harborne y Dey, 1989).

Gases masas (CG-EM)

Se presenta el cromatograma del análisis por CG-EM del extracto en la Figura 8, donde los ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos fueron los compuestos mayoritarios que se identificaron en el extracto (Cuadro 9), principalmente ácido palmítico.

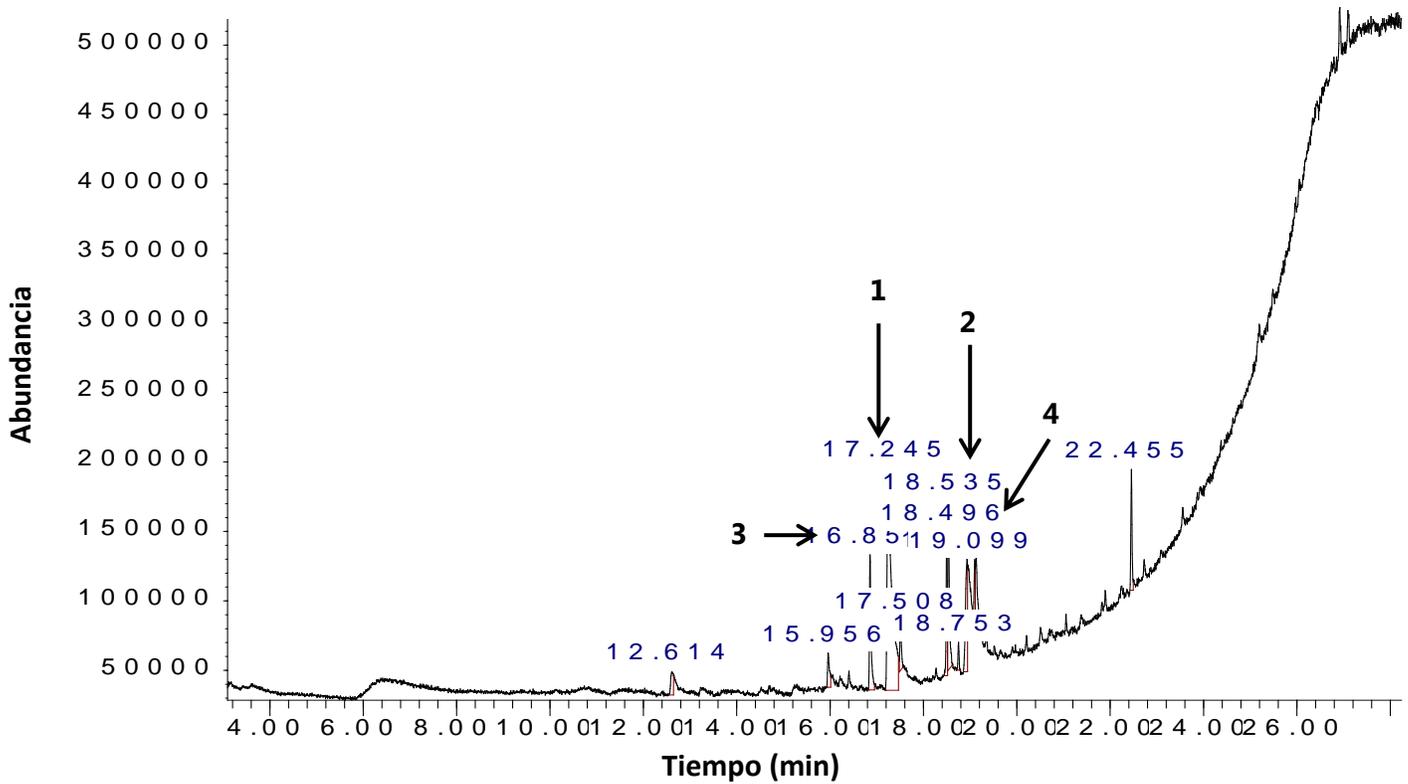


Figura 8. Cromatograma de la CG-EM del extracto metanólico de la fibra de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

Cuadro 9. Compuestos mayoritarios del extracto metanólico de la fibra.

Pico	T. R. (min)	% área	Compuesto	Estructura
1	17.245	45.021	Ácido palmítico	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
2	18.535	10.04	Ácido oleico, metil éster	<chem>CCCCCCCC=CCCCCCCC(=O)OC</chem>
3	16.854	9.33	Metil isohexadecanoato	<chem>CCCCCCCC(C)CCCCCCCC(=O)OC</chem>
4	18.496	7.42	Ácido linoléico, metil éster	<chem>CCCC=CCCC=CCCCCCCC(=O)OC</chem>

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

De acuerdo con los resultados del HPLC, con base a los tiempos de retención y el espectro de absorción bajo luz UV, el extracto presentó compuestos como: chalcona, flavonoides y fenoles. En la Figura 9, se muestra el cromatograma de HPLC y en el Cuadro 10 se muestran los tiempos de retención y los máximos de absorción en el espectro de UV, de los compuestos identificados para cada pico.

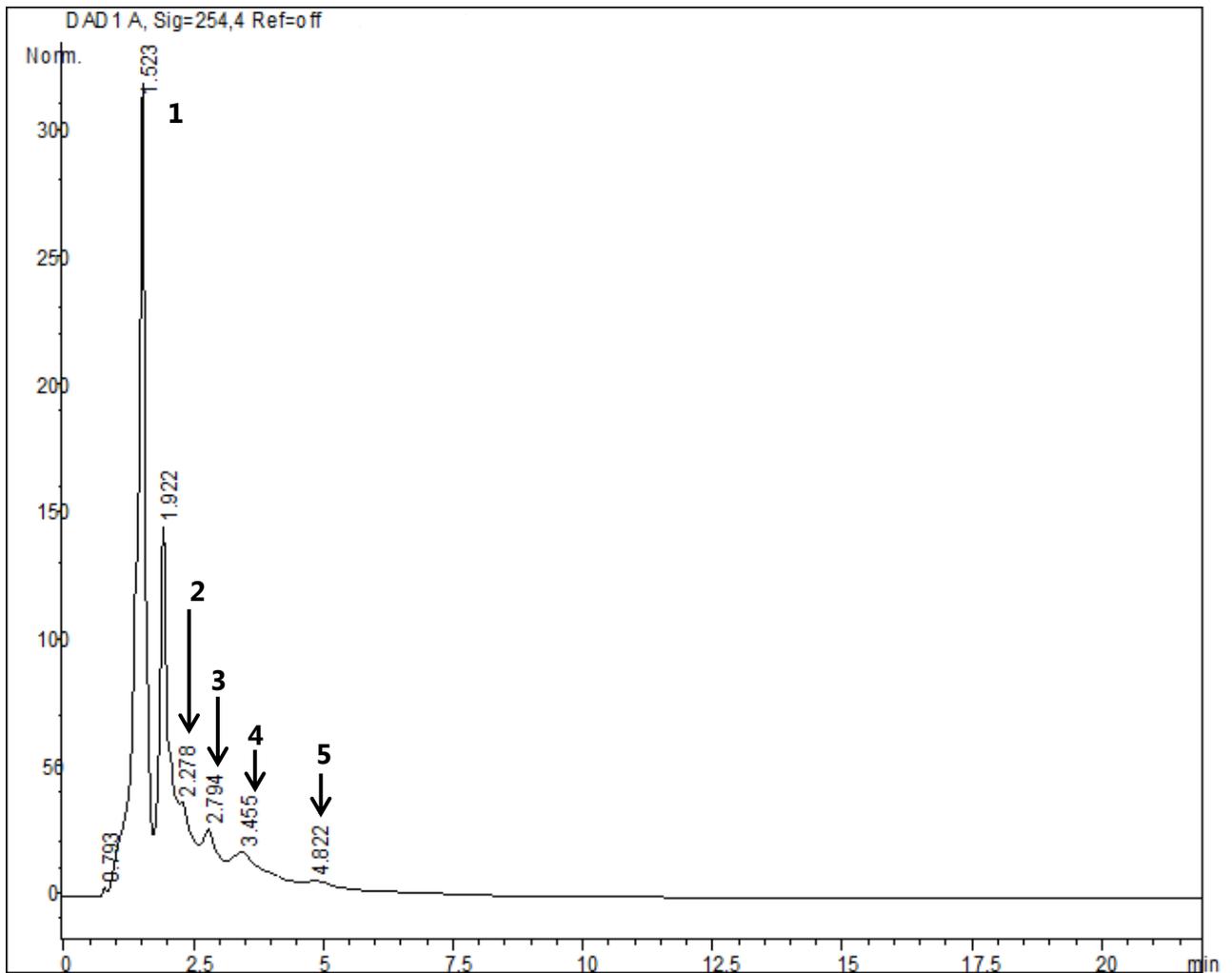
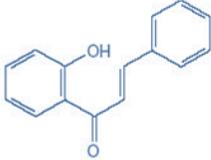
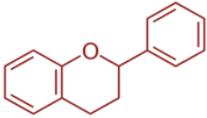
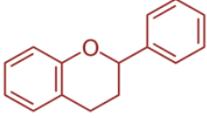
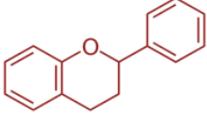
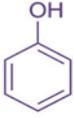


Figura 9. Cromatograma del análisis de HPLC del extracto metanólico.

Cuadro 10. Tiempos de retención y máximo de absorción en el espectro de UV de los compuestos detectados en el extracto metanólico de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

Pico	T. R. (min)	UV λ_{\max} (nm)	Tipo de compuesto	Estructura
1	1.502	288	Chalcona	
2	1.909	250		
3	2.269	230, 278, 310	Flavonoide	
4	2.789	228, 282, 310	Flavonoide	
5	3.449	228, 282, 318	Flavonoide	
6	4.822	226, 280	Fenol	

Longitudes de onda comparadas con lo reportado por Harborne y Dey, 1989.

Fraccionamiento biodirigido

A partir de 3 g de extracto se obtuvieron 353 alícuotas de 20 ml, agrupadas en 88 fracciones, de las cuales se probaron 75 en el ensayo biológico y 13 tuvieron actividad contra *V. cholerae* cc (Cuadro 11).

Cuadro 11. Fraccionamiento del extracto metanólico por CC y CCF.

Solvente extracción	Proporción (100%)	Alícuotas	Fracción	Rendimiento (g)	Características	Punto de fusión °C	Actividad biológica	
Hex		1-5	1	0.07				
		6	2	0.06				
		7-9	3	0.05				
Hex-AcOEt	8:2	10-13	4	0.011				
		14-15	5	0.16	cristales	50		
		16	6	0.13		37-42		
		17-18	7	0.14			√	
		19	8	0.026	cristales	50-100		
		20	9	0.04	cristales	115		
		21-24	10	0.05			√	
		25-28	11	0.0043			√√	
	7:3	29-30	12	0.029			√√	
		31-33	13	0.081				
		34-38	14	0.0018			√	
		39	15	0.0037			√√	
		40	16	0.031			√	
		41-45	17	0.02	Cristales, Pigmento	110-115	√√	
		46-52	18	0.0069				
		53-62	19	0.0445			√	
	Hex-AcOEt	6:4	63-66	20	0.01			
			67-69	21	0.0007			
			70 y 73	22	0.0057			√√
71 y 72			23	0.011				
		74-77	24	0.0095				
5:5		78-82	25	0.0033				
		83-95	26	0.0301				
4:6		96-97	27	0.005				
		98-99	28	0.0015				
		100	29	0.0008				
		101-102	30	0.0019				
		103-104	31	0.0039				
3:7		105-112	32	0.0385			√√	
		113-117	33	0.0069				
	118-119	34	0.079					
2:8	120-133	35	0.013			√		
	134-135	36	0.0008					
1:9	136-147	37	0.0087		290	√		
AcOEt		148-149	38	0.0083				
		150-160	39	0.017				
		161-165	40	0.0009				

Se marcan las fracciones empleadas en la prueba biológica en **negritas**. √: actividad √√: mayor actividad

Cuadro 11. Continuación

AcOEt-MeOH	9:1	166-172	41	0.027		
		173-183	42	0.0463		
		184-190	43	0.0424		
		191-197	44	0.0194		
	8:2	198-202	45	0.1036		
		203-208	46	0.0035		
		209-214	47	0.0274		
	7:3	215-220	48	0.0627		
		221	49	0.0121	cristales	
		222	50	0.013	cristales	
		223	51	0.004		
		224-229	52	0.0998		
	6:4	230-233	53	0.0373		
		234-237	54	0.0517		
		238-239	55	0.0416		
		240-245	56	0.0468		
		246	57	0.0153		
		247.250-253	58	0.2319		
		248-255	59	0.11	cristales	>300
		256-259	60	0.112		
5:5	260-264	61	0.0526			
4:6	265-268	62	0.1701			
	269	63	0.011			
	270-273	64	0.0403			
	271.275-280	65	0.0629			
	274	66	0.0022			
3:7	281-286	67	0.0456			
2:8	287-289	68	0.023			
	290-293	69	0.0128			
1:9	294-295	70	0.0016			
	296-300	71	0.0098			
MeOH	301-307	72	0.0096			
MeOH H₃PO₄	0.1	308	73	0.0037		
		309-311	74	0.02		
		312	75	0.012		
		313-315	76	0.17		
		316	77	0.09		
		317-318	78	0.0244		
		319-320	79	0.0233		
	0.2	321	80	0.04		
		322-328	81	0.03		
		329	82	0.059		
		330-331	83	0.008		
	0.5	332.337-338	84	0.009		
		339-344	85	0.0286		
1	345-350	86	0.039			
2	351-352	87	0.036			
	353	88	0.0182			
Total			3.3762		13	

Por el rendimiento obtenido de cada fracción, se probó la actividad biológica de 75 fracciones (Total: 88), de las cuáles se muestran los halos de inhibición de las 13 fracciones que presentaron actividad con respecto a la polaridad con la que se extrajeron (Cuadro 12).

Cuadro 12. Actividad antibacteriana de las fracciones del extracto metanólico de la fibra sobre *V. cholerae* cc.

Solvente extracción	Proporción	Fracción	Halo de inhibición (mm)*	Tipo de análisis Cromatográfico
Hex-AcOEt	8:2	7	7	CG-EM
		10	7	
		11	8	
	7:3	12	7.5	CCF CG-EM
		14	7	
		15	8.1	
		16	8	
		17	8.5	
		19	7.9	
		22	8	
	3:7	32	8	HPLC
	2:8	35	7	
	1:9	37	7	

*Mediciones con respecto a una repetición. **Negritas:** Mayor halo de inhibición.

Se observa que la mayor actividad de las fracciones pertenece a la polaridad de Hex-AcOEt, principalmente en la proporción 7:3, donde las muestras (12, 14, 16, 19) presentaron gránulos blancos con punto de fusión de 60°C a excepción de la fracción 17 donde los cristales mostraron un punto de fusión en el rango de 110-115°C.

Los resultados del análisis en CG-EM de las fracciones que mostraron actividad, se muestran a continuación:

- En la figura 10 y Cuadro 13 se muestra el análisis de la fracción 10. Se puede observar que la mayoría de los compuestos fueron triterpenos.

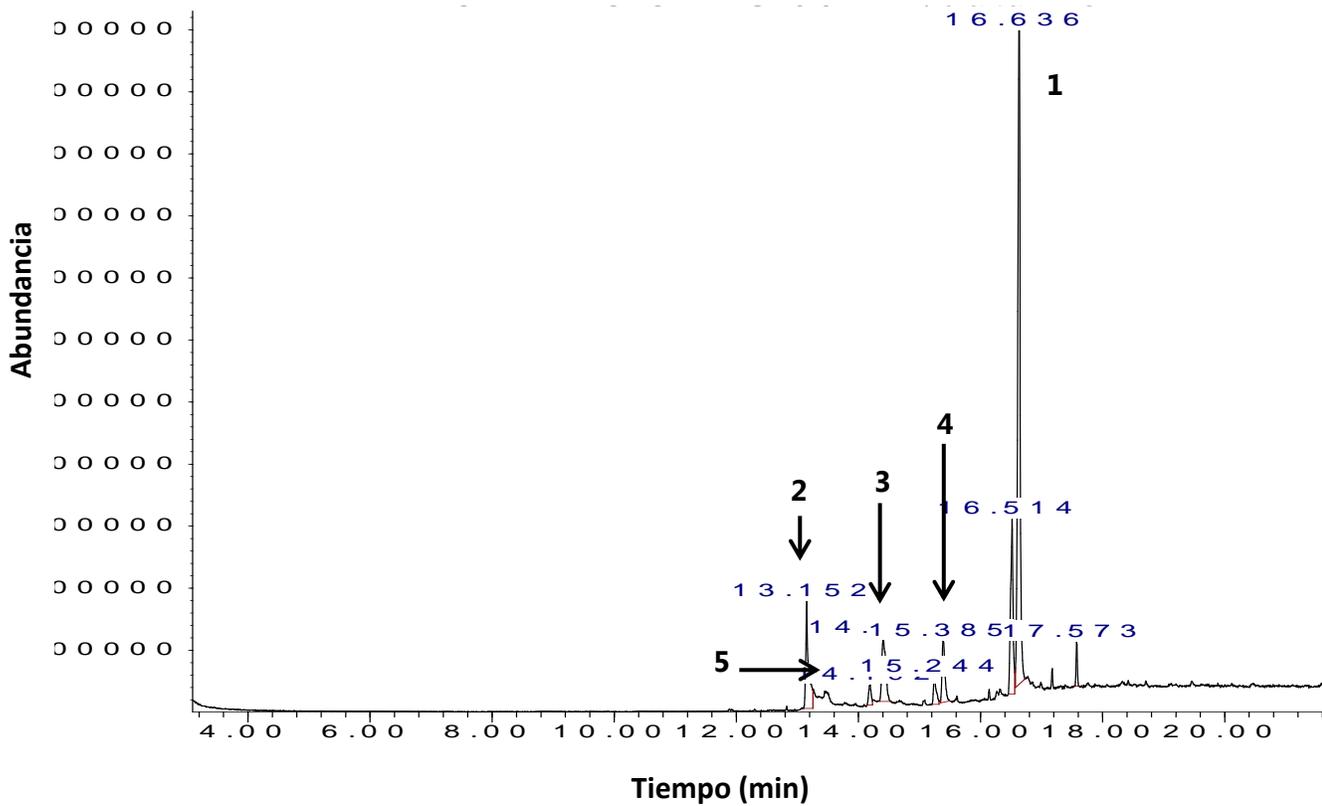
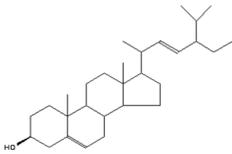
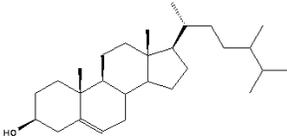


Figura 10. Cromatograma de la fracción 10.

Cuadro 13. Compuestos mayoritarios de la fracción 10.

Pico	T.R. (min)	Porcentaje %	Compuesto	Estructura
1	16.636	68.3	Gamma sitosterol	
2	13.152	10.54	Ácido n-hexadecanoico	
3	14.403	8.54	Campesterol	

Cuadro 13. Continuación.

Pico	T.R. (min)	Porcentaje %	Compuesto	Estructura
4	15.385	6.14	Estigmasterol	
5	14.192	1.83	Ergost-5-en-3-ol (3beta)	

- De la fracción 17, la cual presentó el diámetro mayor del halo de inhibición (8.5 mm), no se lograron identificar compuestos en CG-EM, sin embargo de acuerdo con las cromatografías en capa fina realizadas, es probable que haya presencia de compuestos aromáticos, probablemente fenoles (Figura 11), ya que presentan fluorescencia a longitud de onda de 366 nm.

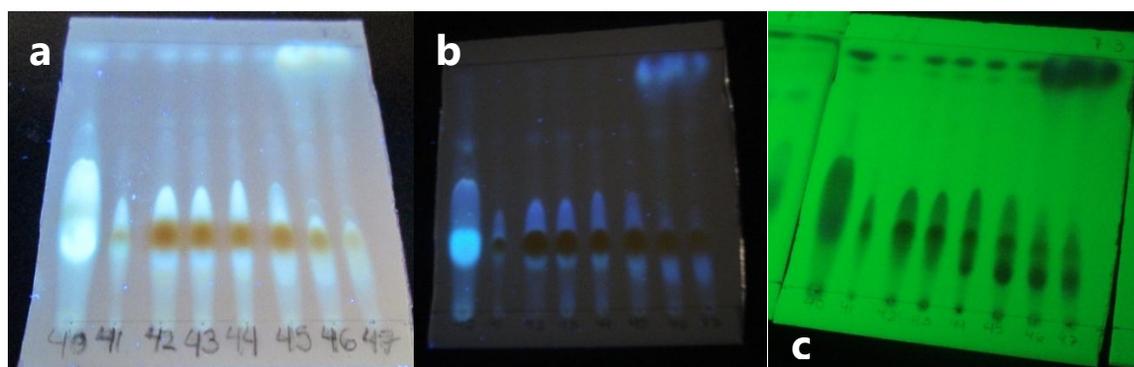


Figura 11. CCF de la fracción 17 observadas a longitud de onda de: a) 366 nm y luz visible; b) 366 nm y c) 254 nm.

- Los compuestos mayoritarios de la fracción 19, de acuerdo con el análisis de CG-EM son: alcanos de cadena larga (Figura 12 y Cuadro 14).

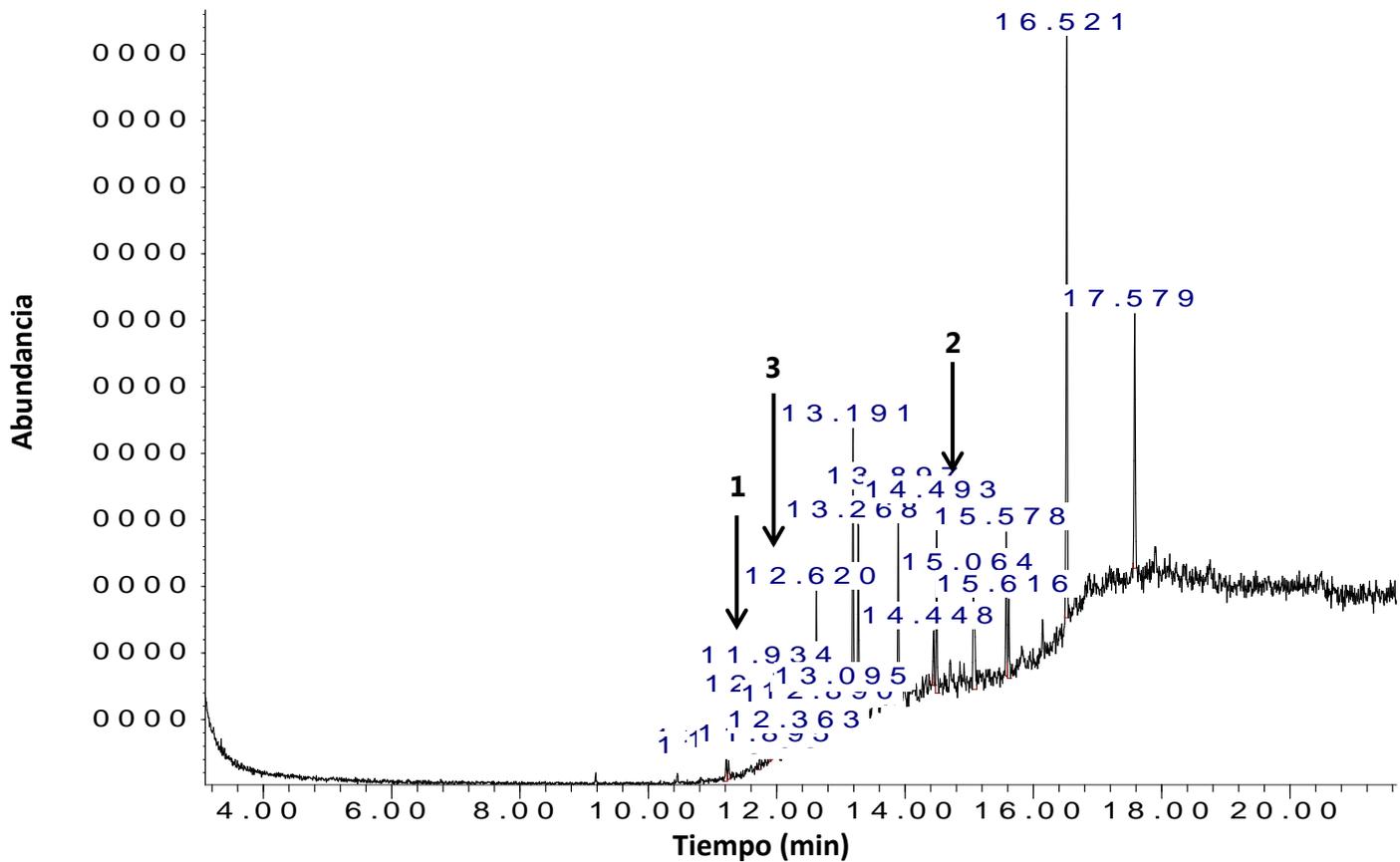


Figura 12. Cromatograma de la fracción 19.

Cuadro 14. Compuestos mayoritarios de la fracción 19.

Pico	Porcentaje %	T.R. (min)	Compuesto	Estructura
1	11.934	10.11	Hexatriacontano	 C ₃₆ H ₇₄
2	14.493	6.27	Hentriacontano	 C ₃₁ H ₆₄
3	12.620	5.51	Tetratetracontano	 C ₄₄ H ₉₀

Las fracciones 32, 41, 49 y 74 fueron inyectadas al HPLC y se compararon con estándares de flavonoides (kaempferol, catequina, pinocembrina, baicaleína, naringenina, naringina, catecol, quercetina, luteolina, genisteína, cafeína, apigenina, miricetina, crisina, acaacetina), sin embargo las muestras no resultaron positivas para estos compuestos.

A continuación se muestran los cromatogramas de HPLC de algunas fracciones con actividad y de los cristales analizados, así como los cuadros correspondientes con los tiempos de retención y las longitudes de absorción máximas en el espectro de UV de cada pico del cromatograma. Después de cada cuadro se muestran los espectros de donde se obtuvieron las longitudes de absorción máximas. En cada espectro se observa en la parte superior izquierda: el tipo de detector utilizado (DAD), tiempo de retención, las unidades de absorbancia de masa (mAU) y nombre del archivo.

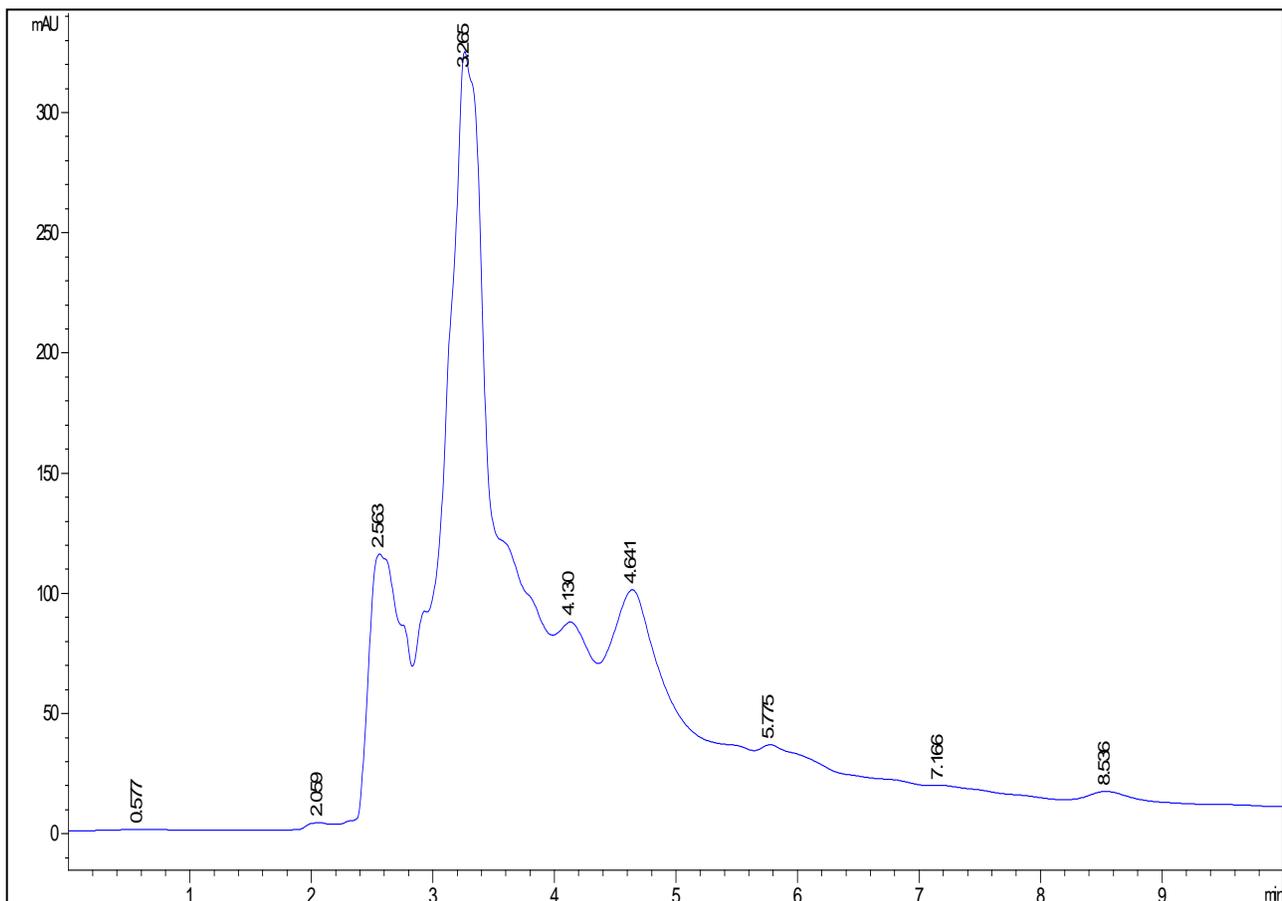


Figura 13. Cromatograma de HPLC de la fracción 32.

Cuadro 15. Tiempo de retención y UV λ_{max} de los compuestos de la fracción 32.

Tipo de compuesto	T.R.	UV λ_{max} (nm)	Figura 14
Fenilpropanoide	2.567	264, 286	a
Fenilpropanoide	3.287	266, 294	b
Fenol	3.614	288	c
Fenol	3.820	284	d
Fenilpropanoide	4.134	286, 316	e
Fenol	4.647	284	f
Fenol	5.774	282	g
Fenilpropanoide	7.160	288, 324	h
Xantona	8.547	225, 288, 320, 360	i

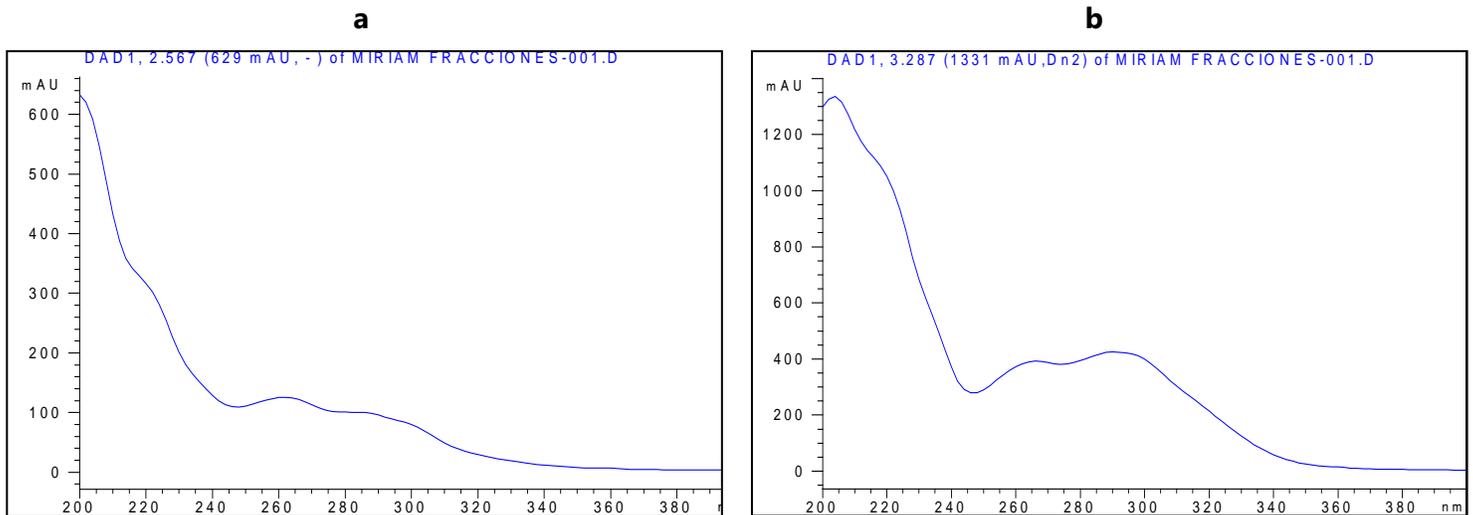
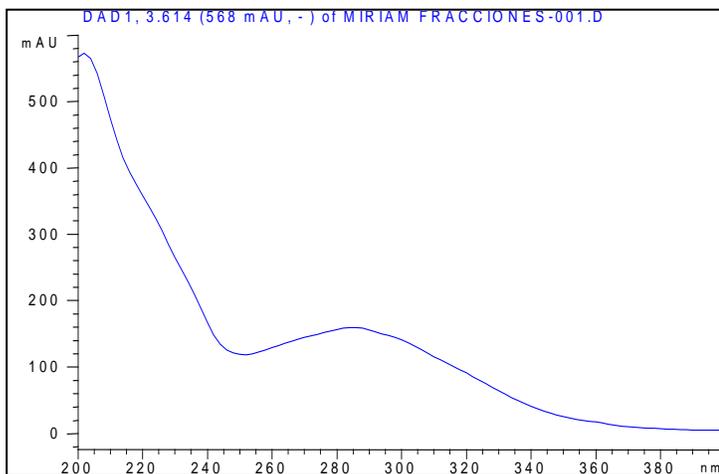
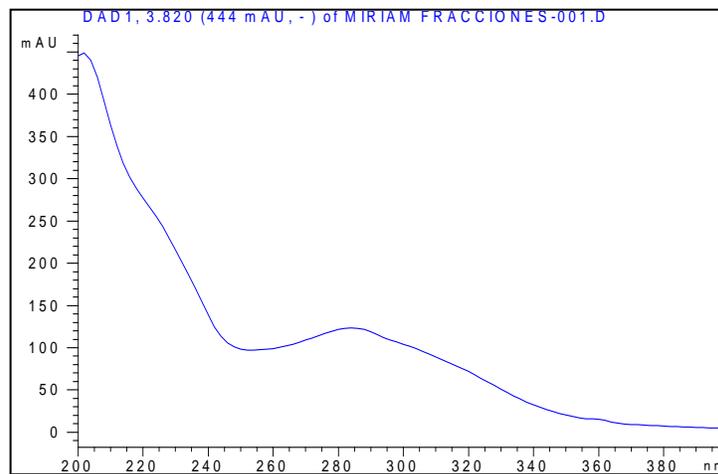


Figura 14. Espectros de UV para la obtención de los máximos de absorción de los compuestos de la fracción 32.

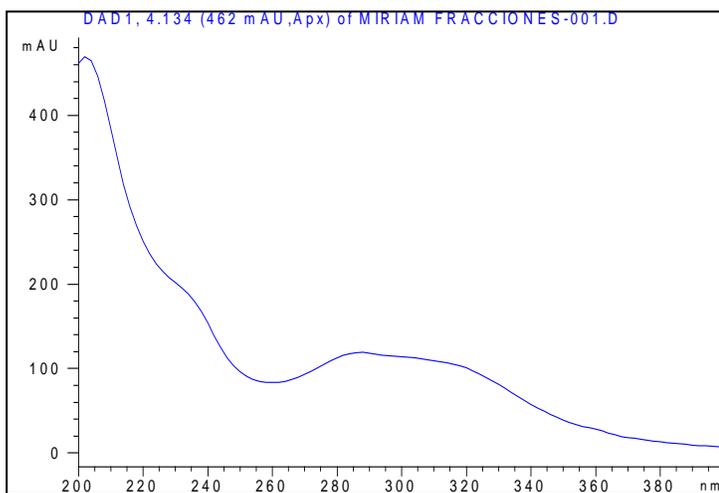
c



d



e



f

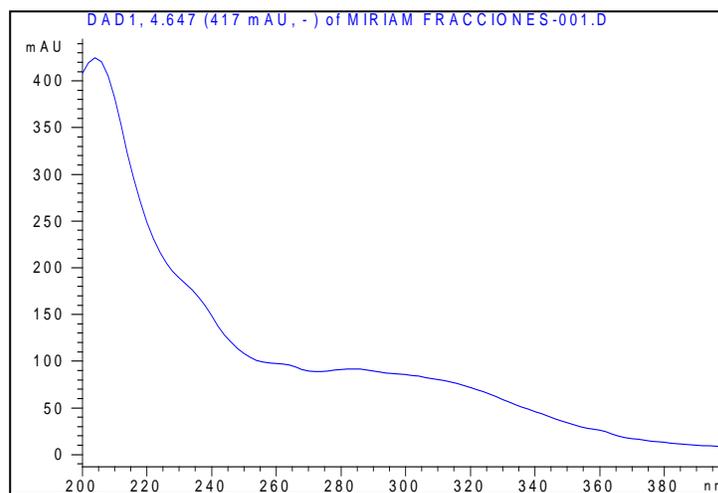
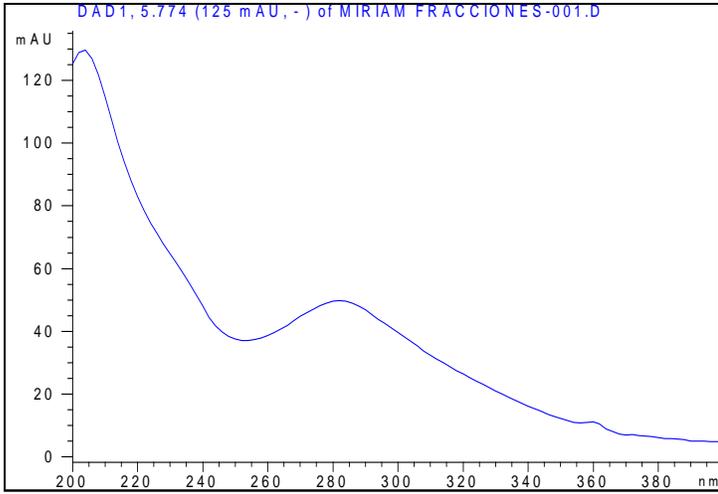
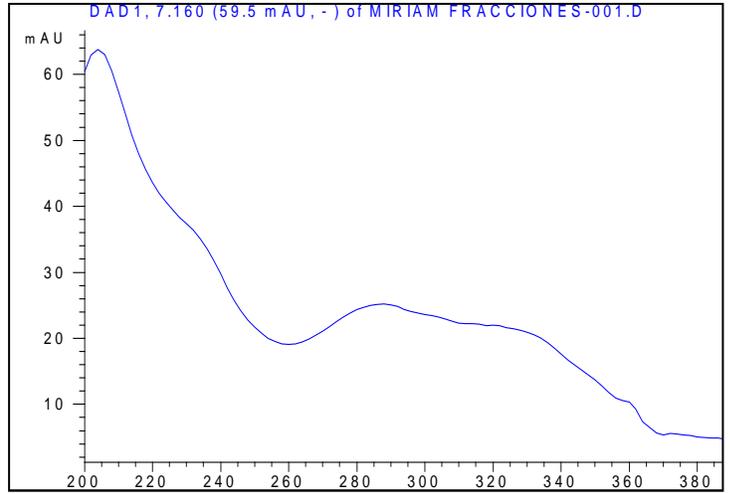


Figura 14 continuación. Espectros de UV para la obtención de los máximos de absorción de los compuestos de la fracción 32.

g



h



i

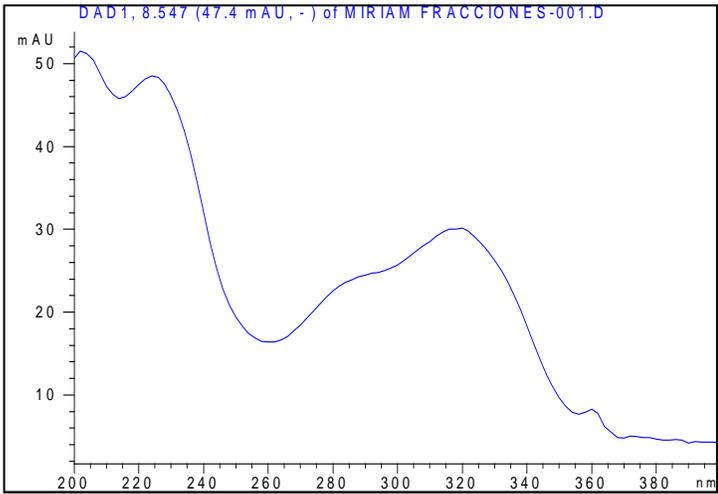


Figura 14. Continuación.

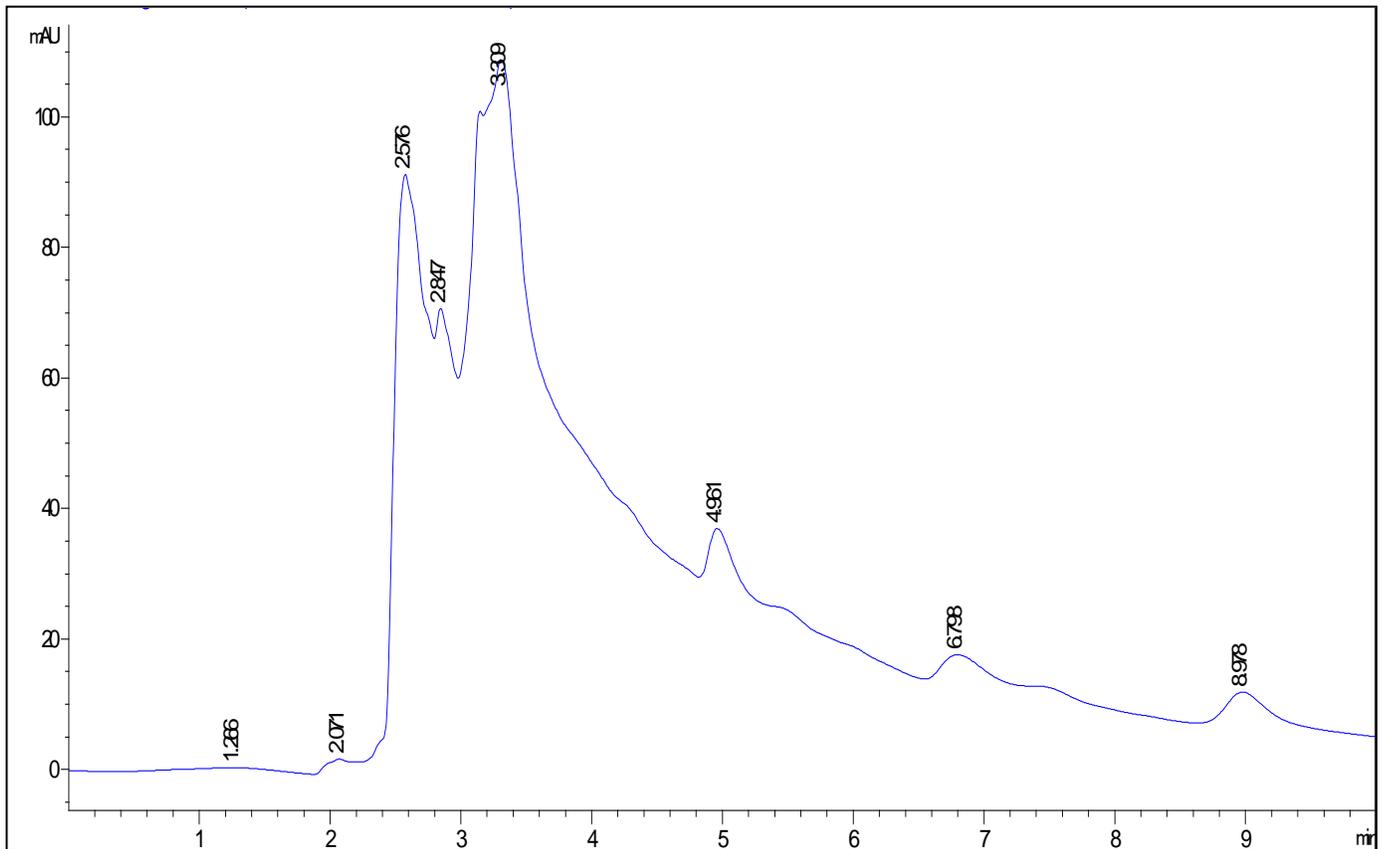


Figura 15. Cromatograma de HPLC de la fracción 41.

Cuadro 16. Tiempo de retención y UV λ_{\max} de los compuestos de la fracción 41.

Tipo de compuesto	T.R.	UV λ_{\max} (nm)	Figura 16
Fenol	2.567	266	a
Fenol	2.841	264	b
Fenol	3.307	272	c
Fenilpropanoide	4.267	280	d
Fenol	4.961	268	e
*	6.807	234, 266	f
Xantona	8.981	240, 250, 280, 340	g

* UV λ_{\max} no encontradas en la literatura.

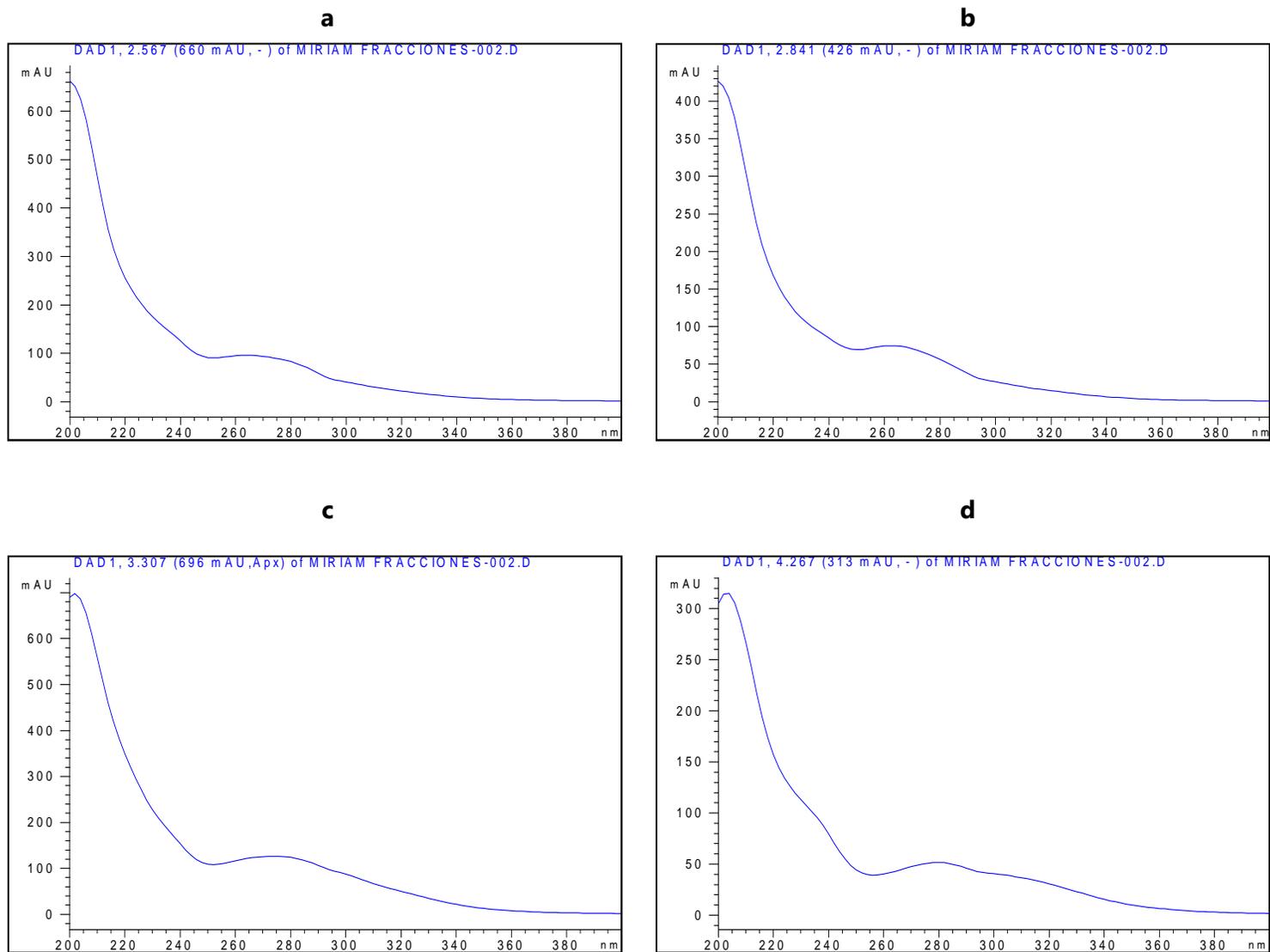
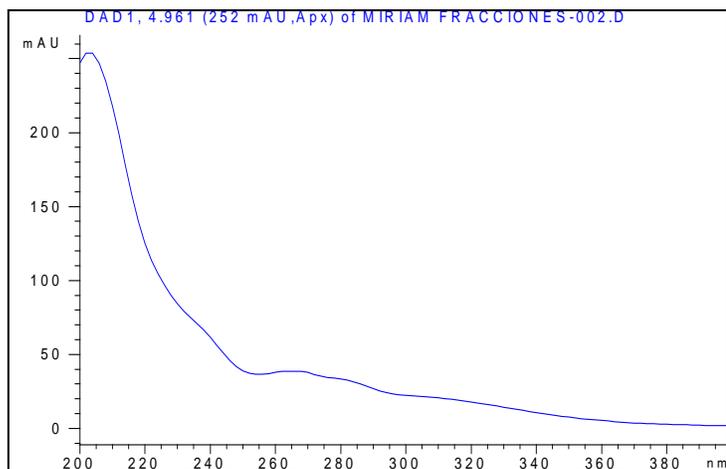
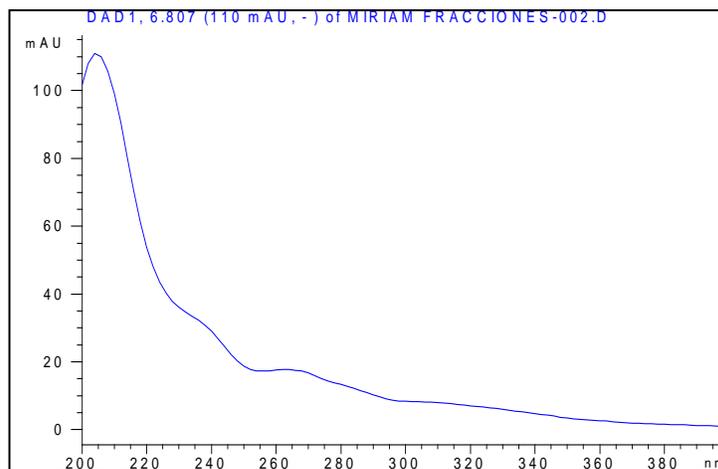


Figura 16. Espectros de UV de los compuestos de la fracción 41.

e



f



g

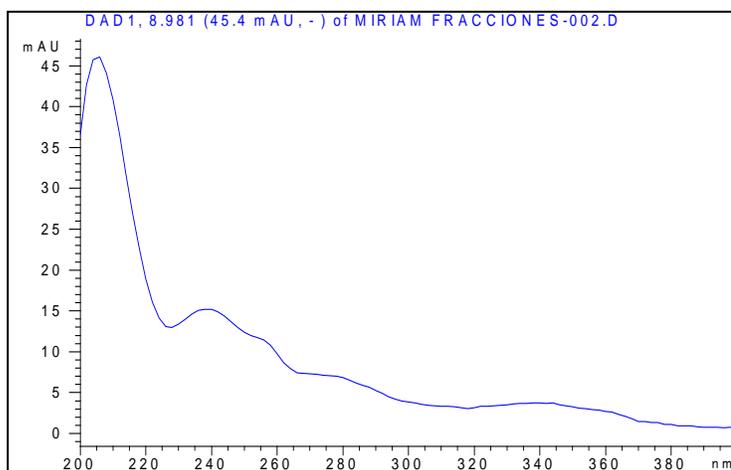


Figura 16. Espectros de UV de los compuestos de la fracción 41.

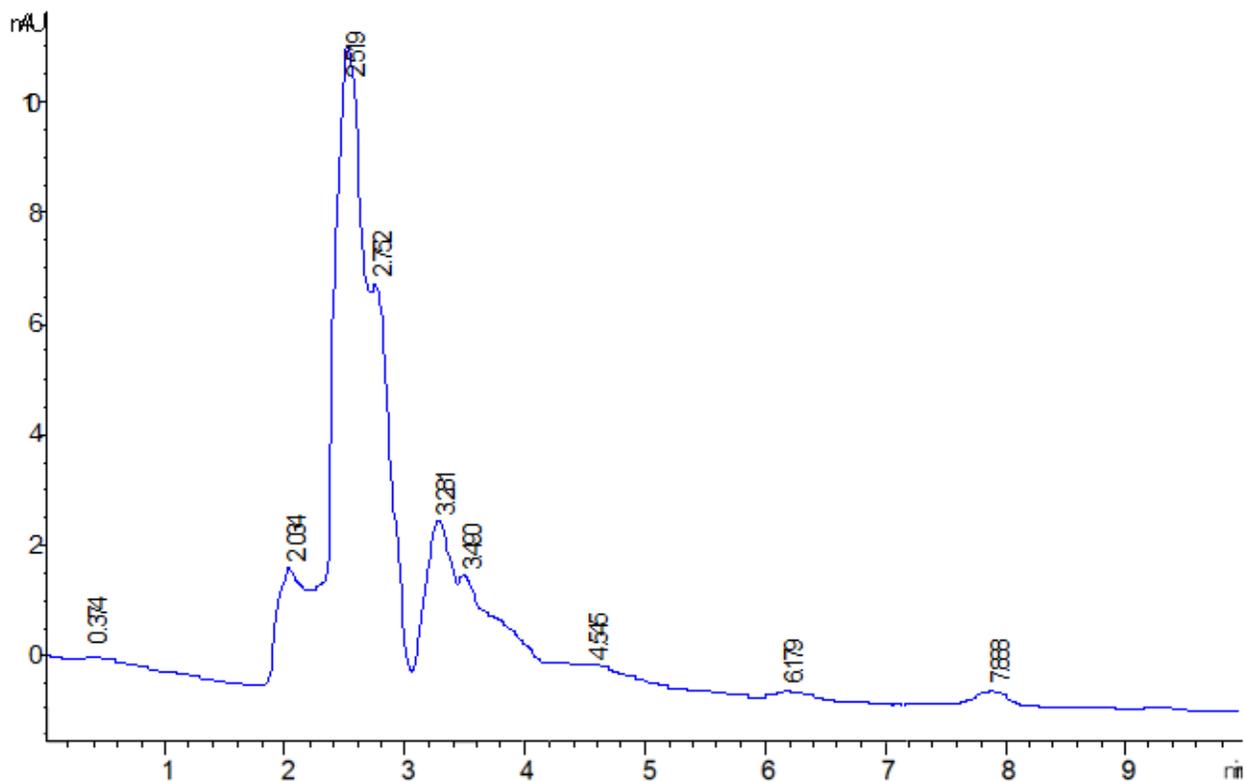


Figura 17. Cromatograma de HPLC de la fracción 49.

Cuadro 17. Tiempo de retención y UV λ_{\max} de los compuestos de la fracción 49.

Tipo de compuesto	T.R.	UV λ_{\max} (nm)	Figura 18
Fenol	2.518	278	a
Fenilpropanoide	2.758	280	b
*	3.285	214, 252, 290	c
*	3.491	218, 250, 290	d
*	4.558	258	e
Ácido fenólico	6.185	206, 232, 300	f
Ácido fenólico	7.891	232, 300	g

* UV λ_{\max} no encontradas en la literatura.

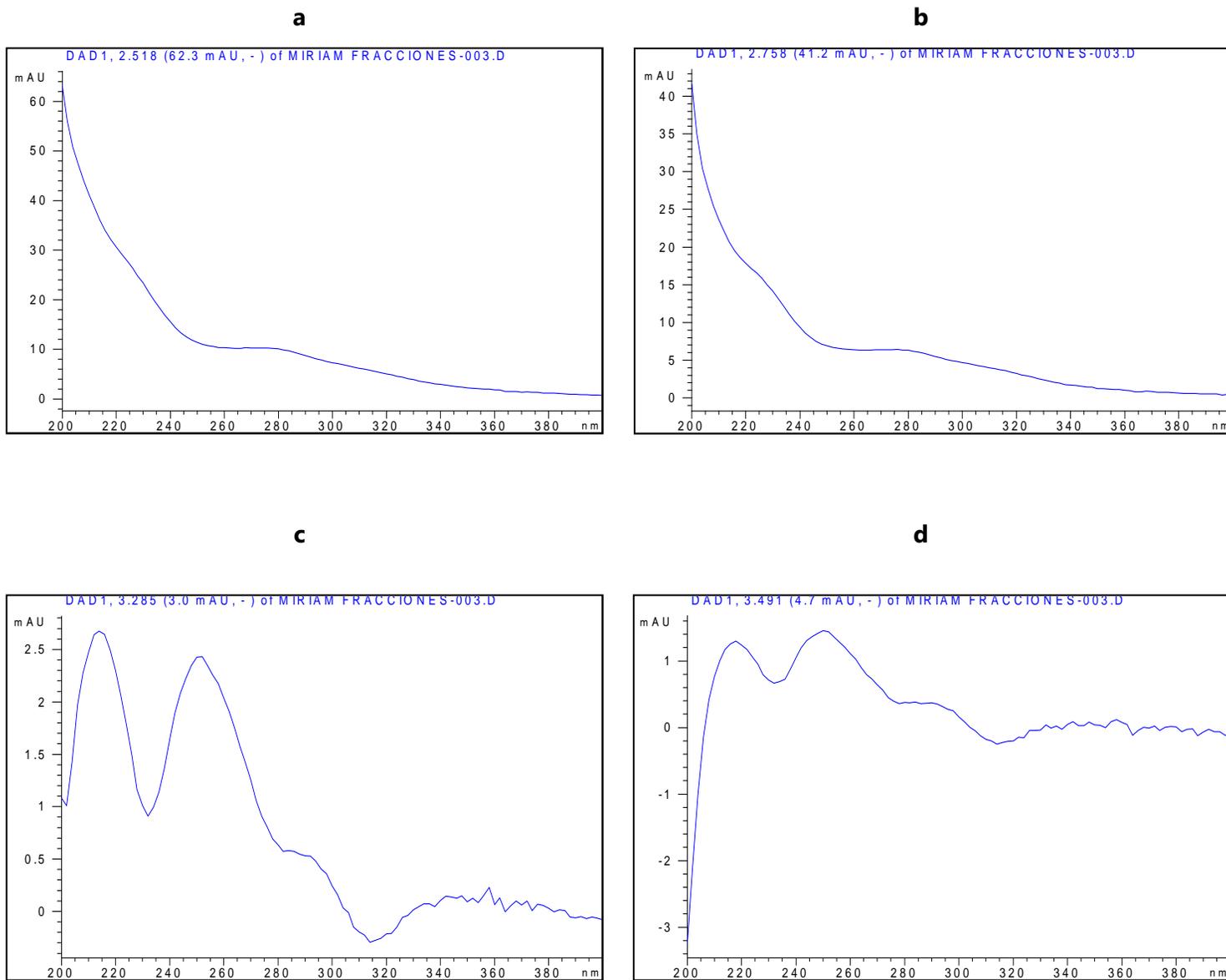
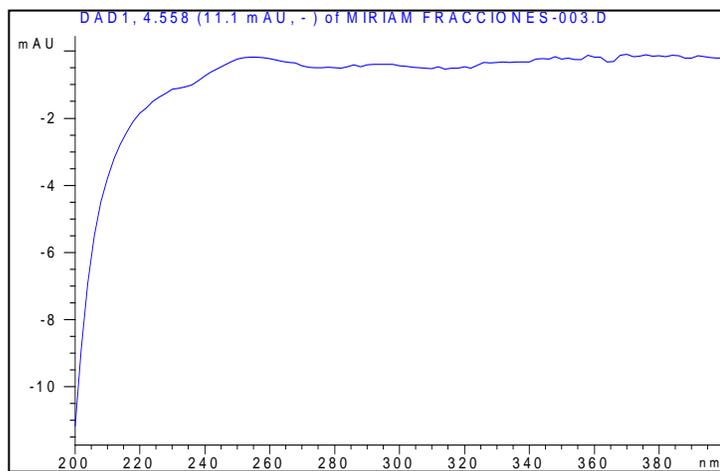
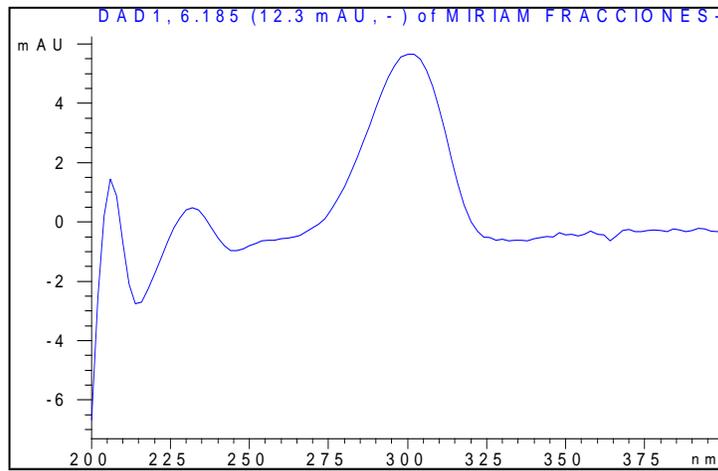


Figura 18. Espectros de UV de los compuestos de la fracción 49.

e



f



g

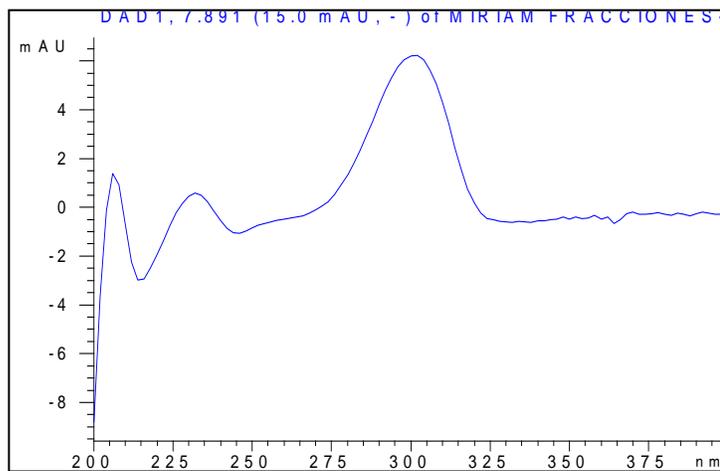


Figura 18. Espectros de UV de los compuestos de la fracción 49.

DISCUSIÓN

La especie, *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*, se encuentra dentro de las 10 especies con mayor importancia ecológica de San Rafael, Coxcatlán y algunas personas reportan que puede tener hasta 8 usos distintos siendo de los más importantes: el uso como alimento de las semillas, las cuales además son comercializadas en mercados regionales y locales del valle de Tehuacán; y el uso medicinal, ocupando el 12% de importancia de un total de 39 especies utilizadas (Rosas, 2003).

En estudios etnobotánicos previos en la zona sólo se registra el uso medicinal de la corteza, la cual es aplicada para el tratamiento de diabetes, dolor de riñones, tumores, gastritis y heridas (Canales et al., 2005). Se conoce también el uso de la fibra del fruto en su aplicación en heridas, permitiendo que se lleve a cabo el proceso de cicatrización y del cual no se tiene un registro previo, por lo que en este estudio se evaluó la actividad antimicrobiana y antioxidante, con el fin de validar su uso científicamente.

La obtención de los extractos a partir de la fibra de frutos de diferentes fenotipos, así como de diferentes altitudes en un periodo de colecta de dos años permite conocer la gama de metabolitos secundarios. Los metabolitos constitutivos: con propiedades antimicrobianas como parte de la estructura de los tejidos; y los inducidos: que se producen como defensa ante el estrés causado por factores bióticos y abióticos cambiantes los cuales desencadenan la producción de enzimas del metabolismo secundario (Montes, 2009; Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

En cuanto al rendimiento obtenido en los dos extractos, la concentración de varios metabolitos secundarios es fuertemente dependiente de las condiciones de crecimiento y su producción es frecuentemente baja (menos del 1% del peso seco), ya que depende del estado fisiológico y de desarrollo de la planta (Rao y Ravishankar, 2002), así como de las condiciones ambientales, las cuales también pueden determinar la cantidad y tipo de metabolitos secundarios presentes en las plantas (Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Anaya, 2004).

Es importante mencionar que no existen estudios previos sobre la fibra de frutos de especies del género y solo hay estudios fitoquímicos de las semillas, corteza, hojas y raíces. En estudios de semillas y frutos de *Ceiba* y *Chorisia*, géneros pertenecientes a la familia Bombacaceae, se conoce la presencia de ácidos grasos y esteroides (Refaat et al., 2012), por lo que se decidió obtener primero el extracto hexánico. De acuerdo con los resultados obtenidos de rendimiento y contrario a lo esperado, el extracto metanólico presentó el mejor rendimiento (3.85%), por lo que presenta más compuestos polares y probablemente los fitoesteroides identificados en la fibra fueron extraídos debido a la presencia del grupo -OH en la molécula y al exceso de solvente.

Se tiene el conocimiento del uso de la fibra en su aplicación sobre heridas, lo cual permite que se lleve a cabo el proceso de cicatrización. Este proceso puede ser impedido por infección microbiana o por una gran producción de radicales libres, generados en el sitio de la herida, debido a que además de actuar como defensa contra las bacterias pueden dañar las células que rodean la herida (Reddy et al., 2008). Por lo anterior, es importante conocer si el extracto además de tener actividad antimicrobiana, tiene actividad antioxidante y podría ser un buen agente terapéutico para la aceleración del proceso de cicatrización.

Por los resultados obtenidos (Figura 5), el extracto tiene una $CA_{50} = 36.42 \mu\text{g/ml}$, menor a la de la quercetina con una $CA_{50} = 4.6 \mu\text{g/ml}$, esto puede ser debido a la ausencia o menor cantidad de grupos OH que puedan donar hidrógenos al radical DPPH•, comparado con la quercetina que al ser un compuesto puro, puede reducir mayor cantidad de moléculas del DPPH• por una de quercetina (Molyneux, 2004).

Es importante mencionar que hay pocos estudios de actividad antioxidante, contenido de fenoles y flavonoides, en frutos de la familia Bombacaceae. Sin embargo, en un estudio de frutos de *C. pentandra*, la capacidad antioxidante del extracto metanólico fue de 82.95%, cercano al 92.91% de actividad del ácido ascórbico (control positivo), valor mayor al obtenido por el extracto metanólico de la fibra del "pochote". Probablemente la capacidad antioxidante fue mayor porque en ese estudio emplearon frutos inmaduros con semillas, mesocarpio y epicarpio para la elaboración del extracto (Nagamani et al., 2012), ya que se conoce la presencia de diversos ácidos grasos con actividad antioxidante en las semillas y

la producción de compuestos fenólicos aumenta durante la diferenciación celular en las primeras etapas de su desarrollo en frutos inmaduros (Marzinek y Mourão, 2003; Nagamani et al., 2012). Además, el contenido de fenoles totales en plantas está asociado con la actividad antioxidante, ya que actúan como agentes reductores, donadores de hidrógeno y captadores de oxígeno singlete (Fook y Kheng, 2009), por lo cual se asume que la capacidad antioxidante del extracto está relacionada con el contenido de fenoles totales (7.44% eAG/g de extracto).

Dentro de los compuestos fenólicos, los flavonoides son uno de los más grandes grupos de metabolitos secundarios y juegan un papel importante en las plantas como defensa y señalización en la reproducción, patogénesis y simbiosis (Rijke et al., 2006). Contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Martínez et al., 2002). En el extracto éstos compuestos representan el 2.20% por gramo de extracto, los cuales participan en la actividad antioxidante (Cuadro 8).

De acuerdo con las cromatografías realizadas, la actividad antioxidante probablemente también está relacionada con la presencia de esteroides como: campesterol y stigmaterol, ya que se ha sugerido que los fitosteroides pueden tener propiedades antioxidantes de acuerdo con estudios *in vitro* e *in vivo* (Madawala et al., 2012).

Los bioensayos son cruciales en la verificación de la actividad farmacológica de una planta y sus usos etnomedicinales, basada en aspectos científicos, económicos y éticos (Gurib-Fakim, 2006). Además, nuevas fuentes de productos antimicrobianos necesitan ser identificados debido a la existencia y constante evolución de microorganismos y fenotipos resistentes, la aparición de nuevas enfermedades y la toxicidad de algunos antimicrobianos (Simões et al., 2009).

La capacidad de una bacteria para adquirir y transmitir determinantes genéticos de resistencia es una estrategia evolutiva conservada que ha exacerbado el problema de resistencia a nivel mundial y es considerado por la OMS como la mayor amenaza en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Se ha demostrado que los metabolitos

secundarios de plantas tienen potencial antibacteriano al ser usados solos y como sinergistas o potenciadores de otros agentes antibacterianos (Abreu et al., 2012).

Por el conocimiento medicinal de la fibra del "pochote" en su uso para sanar heridas, se sabe que cuando se produce una herida, esta puede estar expuesta al ambiente externo y es más propensa a ser atacada por microbios, que pueden invadir la piel y retardar el proceso natural de cicatrización (Reddy et al., 2008). Tanto bacterias Gram positivas como Gram negativas están implicadas en la infección de heridas. Por lo anterior se decidió evaluar la actividad antibacteriana del extracto.

De acuerdo con los resultados de la técnica de Kirby-Baüer, en la cual los halos de inhibición representan la disminución de la población bacteriana por la acción de las sustancias del extracto que difunden en el agar, todas las cepas fueron sensibles al cloranfenicol y las más sensibles al extracto de la fibra del "pochote" fueron: *E. faecalis* H. A., *S. aureus* 25923 y *V. cholerae* cc.

Dentro de las bacterias Gram positivas, *E. faecalis* fue la que presentó el valor mayor de inhibición. Este resultado es importante, ya que esta especie se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal y está asociado en la infección de heridas en pacientes inmunocomprometidos. *S. aureus* es una especie con pigmentos amarillos y *S. epidermidis*, es una especie no pigmentada, las cuales forman parte de la flora normal de la piel y están implicadas en infecciones cutáneas (Brooks et al., 2008).

De las bacterias Gram negativas, *V. cholerae* cc fue la única que presentó actividad ante el extracto, lo cual es importante, ya que cerca de la tercera parte de las especies del género *Vibrio* son patógenas para el humano y la enfermedad es por lo general, el resultado de la ingestión de agua o alimentos contaminados o por la exposición de heridas a ambientes acuáticos donde las especies de *Vibrio* están presentes (Fernández y Alonso, 2009).

Por los resultados, no se encontraron diferencias significativas en el tipo de bacteria (Gram positiva o Gram negativa), lo cual puede deberse a que se realizó la comparación entre el tipo de bacteria y el efecto del extracto y del cloranfenicol, ya que de acuerdo con el

análisis descriptivo la mediana de las bacterias Gram positivas es mayor. Esto es importante y se puede explicar porque la resistencia de las bacterias Gram negativas a los agentes antibacterianos, es debida a la complicada naturaleza de su pared celular comparada con la de las bacterias Gram positivas (Oyedeki et al., 2011).

Probablemente la diferencia en la actividad reside en las diferencias estructurales de la pared celular de las bacterias. Los péptido glucanos en las bacterias Gram positivas se encuentran dentro de una matriz compuesta de ácidos teicoicos, teicurónicos y lipoteicos, confiriéndole a la pared celular una carga negativa neta, necesaria para que la célula asimile cationes divalentes; esta característica la hace más sensible a los compuestos polares del extracto, a diferencia de la membrana resistente a disolventes orgánicos y menos permeable a las moléculas de carácter hidrofóbico de las bacterias Gram negativas (Fook y Kheng, 2009). A su vez, el extracto puede estar permitiendo la fluidez de la membrana por los ácidos grasos que contiene (Madigan et al., 2009) en la membrana de las bacterias Gram positivas.

Cabe destacar que de los pocos estudios sobre actividad antimicrobiana de frutos de la familia Bombacaceae, Chekuboyina y colaboradores en 2012, reportan la actividad del aceite de las semillas de *C. pentandra* contra *S. aureus* y los compuestos responsables de actividad son ácidos grasos insaturados, carotenoides, flavonoides, taninos y compuestos fenólicos.

Es importante mencionar que 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 antimicrobiano se libera de los ribosomas y se reanuda el crecimiento de las bacterias. Por el contrario, los agentes bactericidas se unen fuertemente a sus células diana provocando la muerte celular (Madigan et al., 2009).

Por los resultados obtenidos de la prueba cuantitativa bacteriana preliminar, *E. faecalis* y *V. cholerae* (cc) presentaron CBM (14 y 12 mg/ml) y de CMI: 2 y 8 mg/ml respectivamente, sin embargo, al llevar a cabo la curva de crecimiento bacteriana, el extracto afectó a las

bacterias en alguna ruta metabólica, ya que se observó que el tamaño de las colonias era muy pequeño en comparación con las del testigo, sin alcanzarse un efecto bactericida o bacteriostático, en las dos cepas. El cambio morfológico observado en ambas cepas por la aplicación de las respectivas CBM, se puede considerar como la Concentración Antibacteriana Mínima (MAC por sus siglas en inglés), que es la menor concentración que resulta en un descenso de la población del 90% (un \log_{10}) comparada con el testigo. Las concentraciones por debajo de aquellas que causan la muerte bacteriana como la MAC, afectan la virulencia de las bacterias de diferentes maneras: cambios en la capacidad para la adhesión a células epiteliales, alteraciones en la sensibilidad a mecanismos de defensa del huésped como la fagocitosis y cambios en la producción de toxinas o enzimas (Zhan et al., 1992), lo cual permite suponer que con la aplicación de otra dosis a las 4 horas en ambas cepas (Figura 3 y 4), pueda existir una disminución en el crecimiento, permitiendo que el sistema inmune actúe y elimine a los microorganismos patógenos una vez que se ha tomado el antibiótico (Madigan et al., 2009).

Entre las micosis con mayor incidencia se encuentran las candidiasis y las dermatofitosis, las cuales son causadas por hongos que forman parte de la flora microbiana normal o están adaptadas a sobrevivir en el huésped humano (Brooks et al., 2008). Además, los hongos son microorganismos que también llegan a infectar heridas e intervienen en el mecanismo de cicatrización (Reddy et al., 2008), por lo que se evaluó la actividad sobre cepas de levaduras y hongos filamentosos.

Entre los patógenos más frecuentes se encuentran levaduras del género *Candida*, principalmente *C. albicans* y *Cryptococcus*, así como hongos filamentosos: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., y hongos dermatofitos como *Trichophyton* sp., *Microsporum* sp. y *Epidermophyton* sp. (Vila et al., 2013). Sin embargo, es también relevante la evaluación en cepas de hongos fitopatógenos debido a que son causantes de graves pérdidas económicas (Madigan et al., 2009).

Por los resultados de la prueba cualitativa en levaduras, el extracto no presentó actividad, lo cual puede deberse principalmente a las proteínas que componen la pared celular, que representan del 30-50% del peso seco, comparada con la de los hongos filamentosos (20-

30% del peso seco), además de que cepas de *Candida* están mejor adaptadas a sobrevivir en ambientes con compuestos lipofílicos, los cuales están presentes en el extracto (Pontón, 2008; Sikkema et al., 1995).

Ocurre lo contrario en hongos filamentosos. Por los resultados obtenidos, todas las cepas mostraron sensibilidad al extracto. Probablemente la actividad se deba a los antifúngicos constitutivos de las plantas de los cuales el extracto presentó: ácidos grasos, alcanos de cadena larga, fenoles y flavonoides (Montes, 2009), los cuales pueden estar actuando en blancos fúngicos como: interferencia en la síntesis de la pared celular, alteración de la permeabilidad celular, interferencia en el transporte de electrones, en la absorción de nutrientes, en la adenosina trifosfatasa y otros procesos metabólicos celulares, desactivación de enzimas celulares y/o desnaturalización de proteínas celulares (Cowan, 1999; Feng y Zheng, 2007).

El hongo *F. moniliforme*, obtuvo el menor valor de $CF_{50} = 1.08$ mg/ml, con actividad fungistática debido a que no se alcanza a inhibir por completo el crecimiento del hongo. Esto es importante, ya que es un hongo de distribución cosmopolita y posee un amplio ámbito de hospedantes, además de ser el agente causal de enfermedades de mayor importancia económica que producen pudrición de la mazorca y la germinación prematura del maíz en los estados de Tlaxcala, Puebla y México (Márquez 1985; García y Martínez, 2010).

Los hongos *T. mentagrophytes* y *R. lilacina*, presentaron los valores menores de CF_{50} (1.52 mg/ml y 2.02 mg/ml) y el extracto tiene una actividad fungicida en estos casos, ya que se alcanza la inhibición del 100% con una concentración de 6.0 mg/ml para ambas cepas. Estudios reportan la sensibilidad de *T. mentagrophytes* ante mezclas de ácidos grasos, los cuales desplazan a los fosfolípidos de la membrana celular, afectando su permeabilidad (Vila et al., 2013).

En cuanto a las cepas del género *Aspergillus* éstas presentan los valores mayores de CF_{50} , con 6.48 y 7.70 mg/ml, sin alcanzar la CFM. Es importante destacar la reducción en la producción de esporas. De acuerdo con estudios bioquímicos la formación de esporas

puede estar estrechamente relacionada con la inhibición de la respiración celular en hongos filamentosos (Inouye et al., 1998).

Se conoce que los metabolitos secundarios son importantes para las plantas en su interacción con el ambiente para su adaptación y defensa y son sintetizados a partir de metabolitos primarios contra herbívoros y patógenos (Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

Avendaño et al., en 2008 reportan un hongo perteneciente a una especie relacionada con los géneros *Moniliophthora* y *Crinipellis* que afecta árboles de "pochote" en San Rafael y otras localidades cercanas, produciendo proliferación, pudrición y deformación de frutos, además de que los árboles son hospederos de una larva de *Arsenura polyodonta* Jordan, llamada "pochocuil", que es específica del "pochote" y es colectada para su consumo y comercialización (Avendaño et al., 2006), por lo que los compuestos que presenta la fibra pueden deberse a que la especie desarrolla mecanismos como defensa, con el fin de asegurar la viabilidad de las semillas (Freeman y Beattie, 2008).

De acuerdo con los resultados de las cromatografías, el extracto presenta esteroides, que se asocian a ser producidos como defensa contra patógenos y los cuales resultaron con actividad ante cepas de hongos y bacterias (Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

Se conoce que los metabolitos secundarios generalmente están presentes como mezclas de compuestos y los parásitos y patógenos pueden ser afectados diferencialmente por los compuestos individuales o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones en la planta (Montes, 2009), por lo que es importante dilucidar el tipo de metabolitos que sirven a la planta para su defensa y que pueden tener un efecto benéfico al ser evaluadas contra cepas patógenas para el hombre.

Por los análisis de cromatografía del extracto, probablemente la actividad biológica anteriormente demostrada en hongos filamentosos, se asocia con la presencia de ácido palmítico (con el mayor porcentaje de área), y los ésteres del ácido oleico y linoléico, así como metil isohexadecanoato (Pohl et al., 2011). Además de presentar mayor porcentaje de chalconas de acuerdo con los resultados del HPLC, flavonoides y fenoles, de los cuales se tiene conocimiento de su actividad antimicrobiana (Araujo y Salas, 2008; Ramírez et al., 2012).

De acuerdo a los datos disponibles en la literatura, no hay estudios fitoquímicos sobre la fibra de otros frutos, sin embargo en una revisión fitoquímica realizada en 2012 de la familia Bombacaceae, se reportan el ácido palmítico en las semillas de *Adansonia*, *Chorisia* y *Ceiba*; el ácido oleico y ácido linoléico en semillas de frutos del género *Adansonia*, además de que las semillas de géneros como *Adansonia*, *Chorisia* y *Ceiba*, contienen gran cantidad de campesterol, colesterol, stigmaterol y alcanos de C₁₂-C₃₅, compuestos similares a lo encontrado en la fibra que está asociada a las semillas (Refaat et al., 2012), aunque también se reportan quercetina y epicatequina en las semillas, los cuales no están presentes en el extracto de la fibra. A pesar de lo antes mencionado, es difícil establecer una relación quimiotaxonómica, ya que no hay relación aparente desde el punto de vista fitoquímico principalmente entre especies del mismo género porque sólo pocas han sido estudiadas (Paula et al., 1997; Refaat et al., 2012).

De acuerdo con los resultados del fraccionamiento biodirigido, de las 75 fracciones probadas solo 13 tuvieron actividad en *V. cholerae* cc. Los halos de inhibición fueron mayores en la prueba con el extracto (10 mm) que en las fracciones, cuyo valor mayor de inhibición fue de 8.5 mm (fracción 17), de la cual se identificaron compuestos aromáticos, que probablemente sean fenoles de los cuales se tienen reportes de actividad antibacteriana (Araujo y Salas, 2008).

La mayor actividad del extracto puede deberse a que los compuestos actúan sinérgicamente y al ser separados estos reducen su actividad (Abreu et al., 2012). Además, compuestos como el ácido palmítico y los alcanos de cadena larga pueden estar actuando sinérgicamente, ya que se conocen efectos bacteriostáticos sobre bacterias Gram positivas, de alcanos de cadena larga saturados junto con ácido láurico (Davidson et al., 2005).

Incluso debido al fraccionamiento se pudieron identificar xantonas por HPLC, de las cuales se tiene conocimiento de actividad antifúngica, por inhibición de la síntesis de ergosterol (Pinto et al., 2011). Se recomienda el análisis de las fracciones para la determinación de su estructura, por las amplias propiedades medicinales reportadas y debido a que solo se reportan estos compuestos en hojas de *Bombax ceiba* (Negi et al., 2013; Refaat et al., 2012).

Finalmente, por lo anterior se valida el uso de la fibra en su aplicación en heridas y se proporciona información útil para el manejo y conservación de la especie.

CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de la fibra de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia* presenta actividad en cepas de bacterias Gram negativas y positivas.
- El extracto tiene efecto sobre el crecimiento de *V. cholerae* cc y *E. faecalis*.
- Se destaca la mayor actividad antifúngica del extracto frente a cepas de hongos filamentosos y no presenta actividad en levaduras.
- El extracto posee actividad antioxidante, fenoles y flavonoides.
- Los compuestos responsables de actividad son: esteroides, flavonoides, fenoles, ácidos grasos y sus ésteres.
- Se respalda el conocimiento tradicional del uso medicinal de la fibra, con una base científica.

APÉNDICES

Apéndice 1

Descripción botánica

***Ceiba aesculifolia* (H.B. & K.) Britten & Baker F. subsp. *parvifolia* (Rose) P. E. Gibbs & Semir (Bombacaceae).**

Clasificación

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malvales

Familia: Bombacaceae

Género: *Ceiba*

Especie: *Ceiba aesculifolia*

Subespecie: *Ceiba aesculifolia parvifolia*

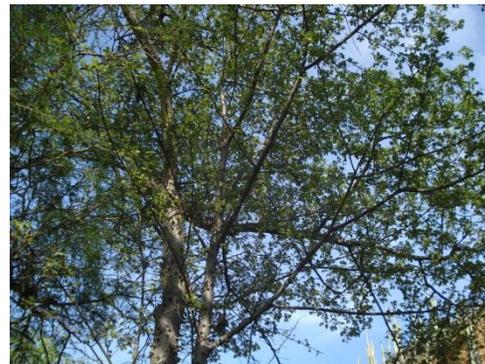


Figura 19. Árbol y fruto de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

En algunos estudios se incluye Bombacaceae como subfamilia de Malvaceae, sin embargo aunque se considera que las familias Bombacaceae y Malvaceae están muy relacionadas, éstas se deben tratar como familias separadas debido a las diferencias en las características del polen, liso en Bombacaceae y espinoso en Malvaceae (Diego-Pérez y Gómez-Campos, 2013), por lo que en esta descripción y de acuerdo con la mayoría de los

trabajos taxonómicos recientes Bombacaceae ha sido tratado como una familia independiente del orden Malvales.

Nombre común: Pochote, pochotl, pochote de secas (Reyes et al., 2004; Canales et al., 2005 y Avendaño et al., 2006).

Descripción taxonómica

Arbustos o árboles de 2 a 6 m de alto.

Tallos y ramas con acúleos pareados y solitarios, de 2 a 2.5 cm de largo.

Hojas con 5 a 7 folíolos, pecíolos de 1.5 a 4.5cm largo; pecíolulos centrales de mayor tamaño que los laterales, con pulvínulos y espinas. Láminas de los folíolos obovadas a obovado elípticas, que distinguen a la subespecie por tener de 2.8 a 4.5 cm largo y de 1.5 a 2.5 cm de ancho, con ápice redondeado o ligeramente emarginado, mucronado. Presentan margen entero o escasamente aserrado, base cuneada, con tricomas estrellados en la vena principal; glabras en la madurez, venas muy marcadas en el envés.

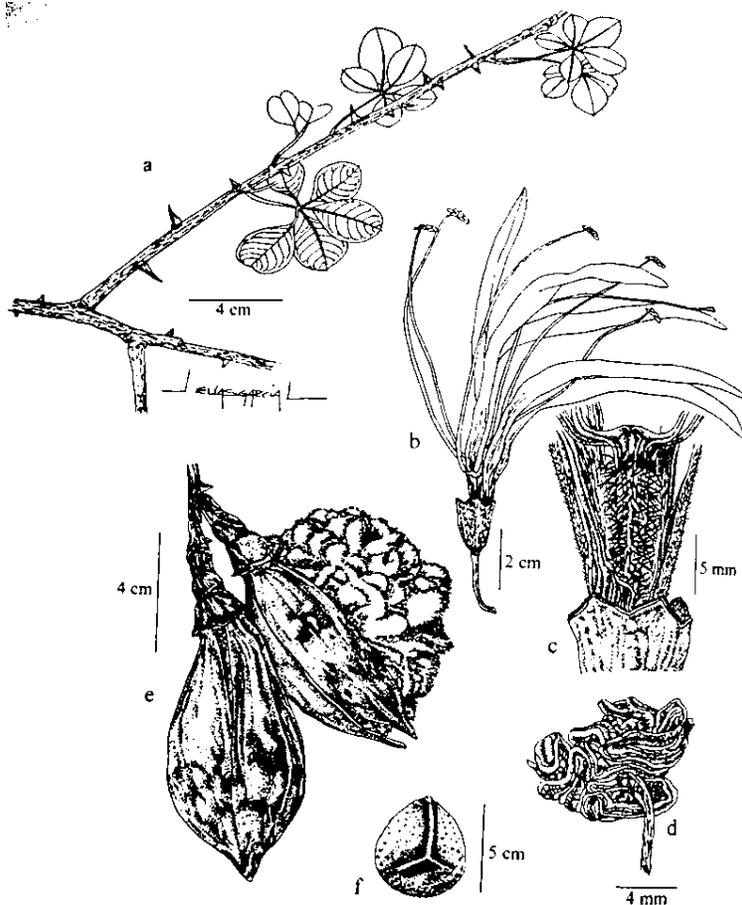


Figura 20. *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*. a) Ramas con hojas y acúleos. b) Flor. c) Base de la columna estaminal. d) Anteras connadas. e) Frutos dehiscentes. f) Detalle de semilla.

Flores solitarias; cáliz verde con tintes rojizos, campanulado, de 1.5 a 2.4 cm de largo, carnoso, con lóbulos obtusos, glabros en el exterior, seríceos, pardo amarillentos en el interior; pétalos blanco amarillentos angostamente oblongos a obovados, de 8 a 13 cm de largo, 0.9 a 1 cm de ancho, con el indumento velutino, de tricomas amarillos, estrellados, hasta de 1 mm de largo, más densos en la parte abaxial que la adaxial; columna estaminal blanca cremosa, hasta 3.5 cm de largo, serícea en el ápice y glabra en la base, con 5 apéndices escamosos en la base, falanges de 5 a 11 cm de largo, anteras sinuosas, amarillas de 4 a 5 mm de largo; estilo de 10 a 12 cm de largo.

Frutos pardos claro, elipsoidales a obovoides, de 3.5 a 8 cm de largo que caracterizan a la subespecie, y de 2 a 3.5 cm de ancho, cartáceos, glabros; pedicelos del fruto de 1.5 a 2 cm de largo; cáliz persistente en el fruto. Semillas pardo oscuras a negras, subglobosas, de 5 a 6 mm de largo rodeadas por fibras blancas o grisáceas (Diego-Pérez y Gómez-Campos, 2013). De acuerdo con Avendaño et al. (2008), se conocen tres fenotipos del fruto (Figura 20) para las comunidades de Coxcatlán, San Rafael y San José Tilapa, en el municipio de Coxcatlán, Puebla.

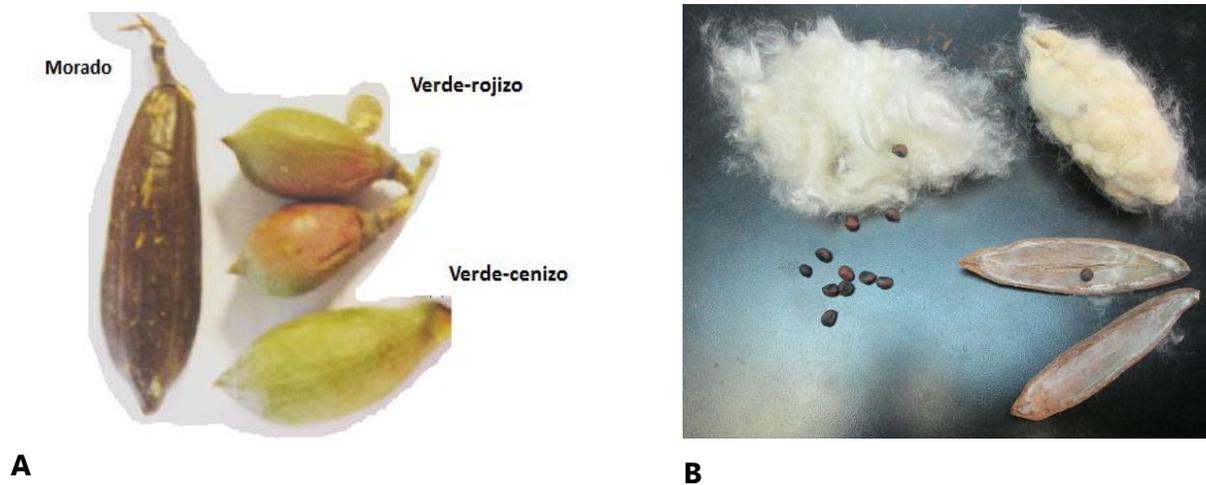


Figura 21. A) Fenotipos de los frutos de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*. (Foto de: Avendaño et al., 2008). B) Fibra, semillas y fruto con fibra.

Altitud: 20 a 1,400 m.

Tipos de vegetación: bosque tropical caducifolio, bosque de galería y manglar (Diego-Pérez y Gómez-Campos, 2013), matorral xerófilo (Rzedowski, 1978).

Fenología

Florece de noviembre a enero. Las flores tienen pétalos carnosos, antesis nocturna y olor poco agradable, por lo que son principalmente polinizadas por murciélagos (Osorno, 2001) de los cuales se han registrado más de 36 tipos para la reserva de Tehuacán-Cuicatlán (CONANP, 2014). Fructificación de diciembre a febrero (Rosas, 2003).

Distribución

Esta especie se distribuye en la República Mexicana en los estados de Chiapas, Guerrero, Morelos, Oaxaca, Puebla (Diego-Pérez y Gómez-Campos, 2013; Gibbs y Semir, 2003).



Figura 22. Distribución de *C. aesculifolia* subsp. *parvifolia*.

Etnobotánica

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 (Orozco, 2010). Pobladores del estado hacen referencia al uso de la fibra para cubrir heridas, del cual no se tiene registro en estudios previos.

Las flores, raíces y semillas se consumen como alimento. Las semillas se consumen hervidas o tostadas y son muy apreciadas por su ligero sabor dulce, además proporcionan aceite que puede usarse en la fabricación de jabón (Avendaño et al., 2006). En San Rafael, Coxcatlán, Puebla, la corteza es usada en infusiones para tratar diabetes, dolor de riñones, tumores, gastritis y es pulverizada y colocada sobre heridas (Canales et al., 2005).

Historia

Se reporta el uso de las raíces y semillas de "pochote" por la gente del Valle de Tehuacán-Cuicatlán desde hace aproximadamente 8,500 años. Este registro se tiene debido a la presencia de los restos en coprolitos, los cuales presentaron el doble de abundancia, al igual que el maíz y fueron 20 veces más abundantes que el frijol (Callen, 1967), lo que sugiere la intensa y especializada colecta durante las fases arqueológicas de El Riego (5000-6500 a.C) y Coxcatlán (3500-5000 a.C) (MacNeish, 1967).

Conservación

La densidad de la población de "pochote" es de 125 individuos por hectárea (Osorno, 2001) en asociaciones de plantas que de acuerdo con la clasificación de Valiente-Banuet et al. (2000), es de bosque tropical caducifolio. De acuerdo con Rosas (2003), esta especie se consideraba entre las 10 especies con mayor valor de dominancia, sin embargo Avendaño et al. (2006), reportan la disminución o ausencia de árboles de "pochote", debido a que el 17.5%, 10% y 0% de la gente entrevistada en Coxcatlán, San José Tilapa y San Rafael, respectivamente, mencionaron la presencia de estos árboles en sus huertos. Actualmente, de acuerdo con un estudio para el manejo sustentable de la especie a través de análisis poblacionales en San Rafael, San José Tilapa y Teotitlán de Flores Magón, se conoce el riesgo de extinción a 30 años de las poblaciones de la especie, cercanas a la cueva del maíz y de San Rafael (Romero, 2014).

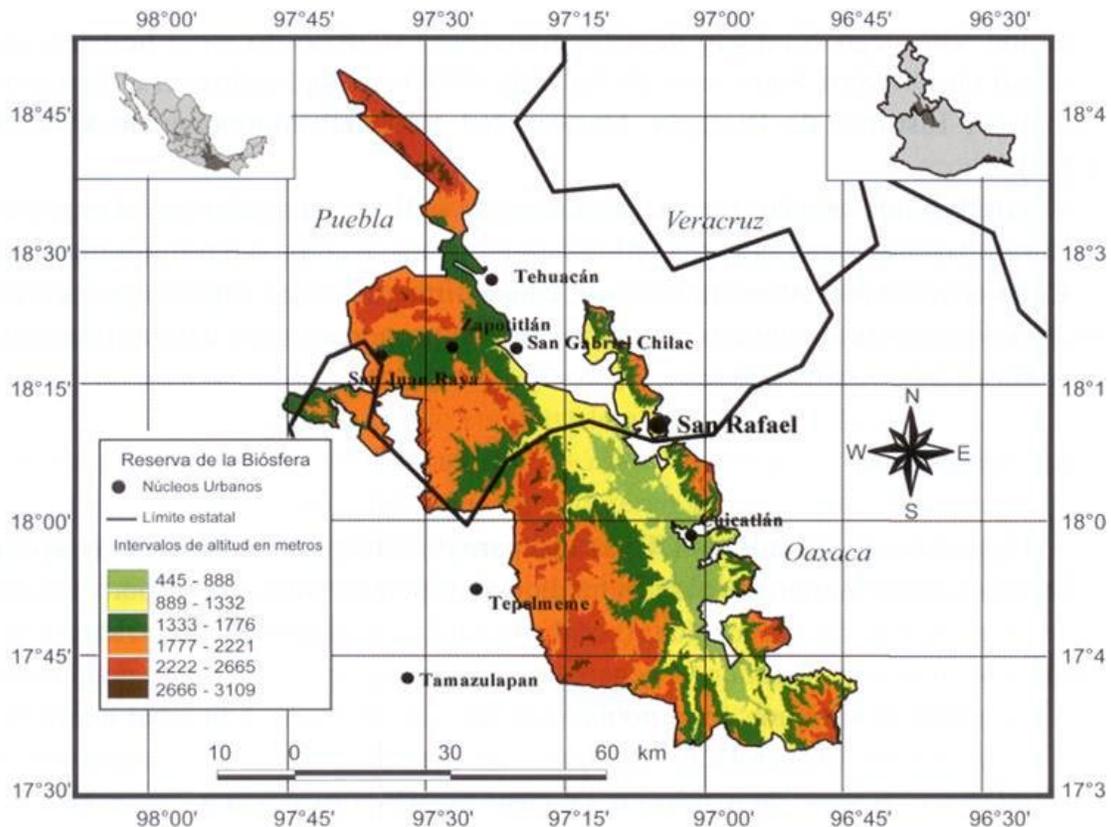
Apéndice 2

Zona de colecta

Los frutos de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia* se colectaron en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, al sureste de Tehuacán en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m (Canales et al., 2006).

La población de San Rafael es de poco más de 300 personas, quienes habitan en 63 hogares; la mayoría de las unidades familiares se dedica principalmente al cultivo de la caña y diversas especies en huertos y, en menor escala, al cultivo de maíz, melón y sandía, además de que recolectan diversos productos en su entorno natural (Medina, 2000; Rosas, 2003; Blanckaert et al., 2004; Lira et al., 2008).

Ubicación geográfica del poblado de San Rafael



Clima

El clima es de tipo $Bs_1(h')w''(w)$ de acuerdo con la clasificación de Koeppen, modificado por García (1981), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22 °C, variando entre 25 °C en abril y mayo, y 18 °C en enero (Medina, 2000). Valiente (1991) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación casi duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

Hidrografía

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

Edafología

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

Vegetación

La vegetación predominante es un bosque tropical caducifolio, donde *Escontria chiotilla* (F. A. C. Weber) Rose y *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg son particularmente abundantes (Valiente-Banuet et al., 2000). Fernández (1999), reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael:

- Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).

- Chiotillal de *Escontria chiotilla*, en el nivel próximo al cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal de esta región, con una alta densidad arbustiva.
- Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* (Ramírez), *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouqueiria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fructicosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.
- Fouqueria con especies dominantes como: *Fouqueria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Senna wisliseni* (DC), *Mimosa luisiana* (Brandege) y *Sanvitalia fructicosa*. Localizada en el nivel más alto, de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal. La densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fructicosa*.

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

Población

La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) (Secretaría de Salud, 2001). La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importante es la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines. Esta comunidad únicamente cuenta con una casa de salud, donde una enfermera ofrece servicios muy básicos y vigila el crecimiento de los niños menores de tres años, además de coordinar las campañas de vacunación (Rosas, 2003).

Apéndice 3

Método de difusión en agar o de Kirby-Baüer (Cole, 1994; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; Beer y Sherwood, 1945).

Esta técnica es empleada para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana y antifúngica (levaduras), de un extracto puro o de los compuestos de un extracto, los cuales se difunden a través del agar desde el disco de papel. El crecimiento del microorganismo comienza y los compuestos se alejan del disco de acuerdo a un gradiente de dilución, de modo que a mayor distancia del disco menor concentración, formándose un halo de inhibición circular donde la sustancia no alcanza a inhibir el crecimiento y cuyo diámetro es proporcional a la potencia de la sustancia frente al microorganismo.

Medio: para el ensayo con bacterias se prepara medio de cultivo Mueller-Hinton ya que promueve el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos clínicamente significativos y agar Papa Dextrosa (PDA) para levaduras. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los antibióticos tienden a difundir más en dirección lateral aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; un agar de más de 4 mm de espesor produce una mayor disolución del antibiótico hacia abajo, con tendencia a estrechar artificialmente las zonas de inhibición. Se debe dejar incubar las cajas 24 horas previas a realizar la prueba de susceptibilidad para verificar la ausencia de contaminación del agar.

Inóculo: Con un asa de siembra se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müller-Hinton para el ensayo en bacterias y en caldo Sabouraud para levaduras, 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 18 a 24 horas para bacterias y 48 hrs. para levaduras, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar N° 0.5 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 (BaSO_4) a 99.5 ml de H_2SO_4 (0.36 N). La comparación de la turbidez

entre el estándar y el caldo con el organismo en estudio se puede efectuar con un espectrofotómetro a 660 nm.

Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión de bacterias o levaduras, 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 para bacterias y con agar Papa Dextrosa (PDA) para levaduras. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente; es aconsejable mantener la tapa entreabierta para permitir la evaporación de cualquier exceso de humedad de la superficie de agar. Finalmente, se siembra mediante estría en por lo menos tres direcciones, dando vueltas a la placa en ángulos de aproximadamente 60° luego de cada estría.

Preparación de sensidiscos

Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5, para posteriormente aplicar la sustancia a evaluar en la prueba de susceptibilidad (extracto o fracción).

Extracto o fracciones activas: se hacen diluciones necesarias utilizando como vehículo metanol, para que los sensidiscos lleven 2 mg de la sustancia por sensidisco.

Control negativo: se preparan sensidiscos a los que se les agregan 10 µl del solvente empleado para disolver el problema.

Control positivo: se evalúa la sensibilidad de las cepas bacterianas experimentales con sensidiscos impregnados con 25 µg de cloranfenicol y con 25 µg/ml de Nistatina para levaduras. Posteriormente se deja evaporar el solvente de los discos impregnados durante 12 horas.

Prueba de susceptibilidad

Los discos impregnados con las sustancias a ser evaluadas se colocan manualmente sobre la superficie del agar, utilizando una pinza estéril.

Una vez preparadas 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.

Interpretación de resultados

En el caso de existir zonas de inhibición se reporta el extracto o fracción como activa. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración en milímetros. La prueba se hace por triplicado y se reportan los valores promedio.

Apéndice 4

Microtécnica de dilución en caldo (Koneman et al., 1985)

La microtécnica de dilución en caldo se utiliza para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y de la concentración bactericida mínima (CBM). Esta técnica sigue el mismo principio que el método de macrodilución en agar, excepto que la susceptibilidad de los microorganismos (bacterias y levaduras) a los antimicrobianos se determina en fase líquida, en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica con 96 concavidades (placa de ELISA). La placa se prepara colocando 50 µl de caldo Mueller-Hinton (Bioxon 260) o Sabouraud para levaduras con la concentración del extracto probado en las concavidades apropiadas: 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/ml.

Se prepara un inóculo de acuerdo con lo descrito anteriormente (Apéndice 3: Inóculo), hasta alcanzar el estándar N° 0.5 de McFarland. De esta suspensión se toman 100 µl y se le adicionan 99.9 ml de solución salina al 0.9% obteniendo así una concentración de 10^5 organismos/ml. En cada una de las 96 concavidades se colocan 50 µl de esta suspensión diluida.

Control negativo: se coloca 50 µl de caldo Mueller-Hinton con el solvente empleado para disolver el problema.

Testigo: se prepara colocando 50 µl de caldo Mueller-Hinton en las concavidades más 50 µl del cultivo bacteriano.

Incubación: una vez cargada la placa con la suspensión bacteriana, se cubre con una tapa para evitar el desecamiento. Todas las placas se incuban a 35°C durante 24 horas.

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

En las concavidades donde se desarrollen organismos, el colorante es reducido a formazán, produciéndose una coloración rojiza-violácea, en el fondo de la concavidad de lo contrario significa que no hay desarrollo bacteriano y la solución permanece clara. Es muy importante mantener protegida la placa de la luz, debido a que esto puede alterar los resultados.

Interpretación de resultados

La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la 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 para obtener resultados estadísticamente significativos.

Apéndice 5

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

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

Medio de cultivo: se coloca agar Muller-Hinton en cajas septadas. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm.

Inóculo: se prepara una suspensión con aproximadamente 1×10^8 bacterias/ml en un tubo de ensayo con 10 ml de caldo Mueller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación). Con ayuda de una micropipeta, se inoculan 0.1 ml 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.

Tubos con extracto: se prepara en tubos con 10 ml de caldo Mueller-Hinton con las concentraciones de CMI y sus múltiplos medios; 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 horas a 35°C.

Interpretación de resultados: se cuentan las colonias de cada concentración y dilución. Se grafica el log₁₀ del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

Apéndice 6

Inhibición del crecimiento radial (Wang y Bun, 2002)

El ensayo contra hongos filamentosos se llevó a cabo en cajas Petri (100 X 15 mm) con 20 ml de agar de papa-dextrosa (PDA), en el cual se inocula un botón de 5 mm de diámetro del micelio del hongo. Después que el micelio se desarrolló, se colocan discos previamente impregnados con 2 mg del extracto disueltos en 10 μ l del disolvente. La preparación de los discos se realiza 24 horas antes del bioensayo para dejar que el disolvente se evapore por completo. Los discos son colocados a una distancia de 30 mm del límite micelial utilizando una pinza estéril.

Control negativo: se colocan sensidiscos a los que se les agrega 10 μ l de disolvente.

Control positivo: se usan sensidiscos con 7 μ g/disco de Ketoconazol.

En todos los casos se deja evaporar el solvente de los sensidiscos durante 24 horas. Se realizan tres repeticiones.

Incubación: las placas se incuban a 28 °C durante 72 horas, hasta que el crecimiento micelial se haya desarrollado.

Interpretación de resultados

Si existen zonas de inhibición, se reporta el extracto como activo, ya que en condiciones normales, el crecimiento del hongo es circular debe crecer encima de los sensidiscos como el control negativo. Cualquier signo de diferencia de color, esporulación o morfología indican actividad antifúngica.

Apéndice 7

Determinación de la concentración fungicida media (CF₅₀) (Método modificado de Wang y Bun, 2002)

El ensayo mide el efecto antifúngico sobre hongos filamentosos de un extracto o compuesto puro. Se utilizan cajas de cultivo de 24 pozos, cada pozo con 1.5 ml de agar papa-dextrosa (PDA), con las siguientes concentraciones del extracto a probar: 8.0, 6.0, 4.0, 2.0, 1.0, 0.50 mg/ml, posteriormente se coloca un botón de micelio de 1 mm de diámetro en el centro de cada pozo. Las pruebas se realizan por triplicado.

Controles negativos: se llenan pozos con Agar+480 µl de DMSO (para que quede a una concentración de 1%).

Controles positivos: para evaluar la sensibilidad de las cepas experimentales se aplican en el agar las siguientes concentraciones de Ketoconazol: 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg/ml.

Testigos: pozos solamente con agar (1.5 ml) para observar el crecimiento normal del micelio del hongo.

Incubación: Las placas son incubadas a 23°C durante 72 horas hasta que se presente el crecimiento micelial.

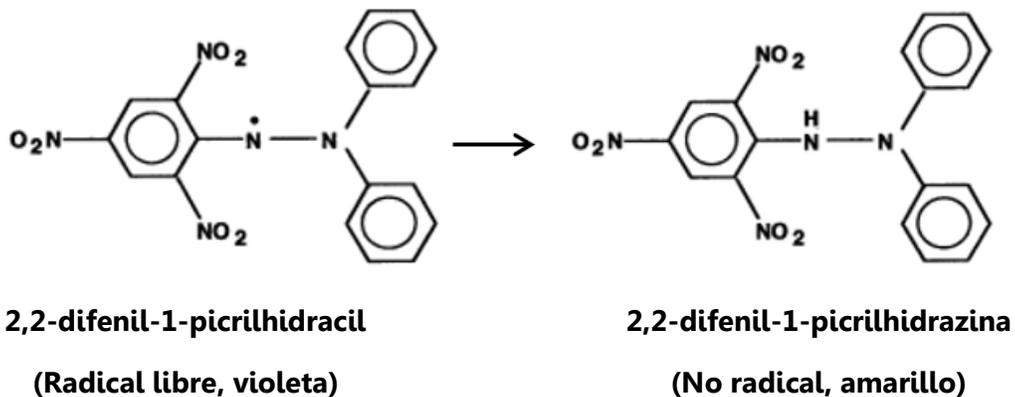
Interpretación de resultados

Los resultados son reportados en porcentaje de inhibición, teniendo en cuenta que la concentración que representa el 100% de inhibición fue aquella en la que ya no se observó crecimiento, la cual corresponde a la CFM; mientras que la concentración que representa al 50% de inhibición corresponde a la CF₅₀. El cálculo de la CF₅₀ se realiza interpolando la concentración a partir de la ecuación obtenida de la regresión lineal o logarítmica.

Apéndice 8

Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH•) (Okusa et al., 2007)

El 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH•) es un radical libre, con un electrón desapareado que le da una coloración violeta y que no se dimeriza. Cuando el DPPH• está en contacto con una sustancia que le puede donar un átomo de hidrógeno, éste se reduce produciendo un cambio de color de violeta a amarillo, coloración dada por el grupo picril (Molyneux, 2004).



Con base a lo anterior, la Capacidad Antioxidante Media (CA_{50}) se evalúa midiendo el grado de decoloración de una solución metanólica de DPPH•, por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (1-100 ppm). A partir de la medición obtenida por medio de espectrofotometría VIS, se determina la concentración a la cual el radical es reducido al 50%.

Stock de extracto: se prepara una solución con 10 mg del extracto o fracción a evaluar y 10 ml de metanol 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.

Solución DPPH: se prepara en un matraz 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 (1-100 ppm) 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 540 nm en un lector de ELISA. Es importante señalar que se emplean este tipo de cajas debido a que el material no reacciona con los solventes empleados.

Blanco: se llenan pozos con 200 µl de metanol grado HPLC.

Control positivo: se realiza una curva patrón de quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Interpretación de resultados

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

$$\% \text{ Reducción del DPPH} = (C-E/C)*100$$

En donde:

C= Absorbancia del DPPH disuelto en MeOH.

E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPPH (150 µl)+ Solución problema (50 µl)).

Apéndice 9

Contenido de fenoles totales (CFT) (Método modificado de Singleton et al., 1999)

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, donde es empleado el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo de coloración amarilla y pH ácido, contiene molibdato y tungstato sódico que tienen la capacidad de reaccionar con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de las moléculas (Gutiérrez et al., 2008).

Para la curva de calibración se emplea ácido gálico, que es una pequeña molécula que debido a su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo -OH (Aguilar et al., 2003).

Curva de calibración: se utiliza una solución estándar ácido gálico de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A partir de ésta solución se toman las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (6.25, 12.5, 25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), a cada una se le agrega el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 ml.

Preparación del extracto: se prepara una solución estándar (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), de la cual se toma una alícuota de 250 μl y se agregan 750 μl de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 ml.

Se toma 1 ml de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) se transfiere a un tubo de ensayo con 6 ml de agua destilada a continuación se adicionan 500 μl 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.

Interpretación de resultados

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 10

Contenido de Flavonoides Totales.

Método de Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007).

Este método se basa en el cambio de coloración de una solución de AlCl_3 (incolora) a amarilla por la formación de complejos estables ácidos con el grupo ceto en C-4 y, o bien el grupo hidroxilo C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles, así como por la formación de complejos lábiles ácidos con los grupos orto-dihidroxil en el anillo A o B de los flavonoides (Kalita et al., 2013).

Stock de quercetina: se pesa 1 mg de quercetina en 1 ml de MeOH grado HPLC.

Curva patrón: Se toman las alícuotas necesarias del stock de quercetina para la preparación de la curva patrón, con las concentraciones: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 $\mu\text{g/ml}$ y se les agrega 1 ml de AlCl_3 al 2%.

Stock de extracto: se pesa 1 mg de extracto metanólico, se disuelve en 5 ml de MeOH grado HPLC.

Blanco: se toma 1 ml del stock del extracto y 1 ml de MeOH grado HPLC.

Problema: se toma 1 ml del stock del extracto y se le agrega 1 ml de AlCl_3 al 2%.

Se vacían 200 μl de las soluciones preparadas para la curva patrón, el problema y el blanco, así como de MeOH, de AlCl_3 , y de MeOH + AlCl_3 (controles negativos), en una placa de ELISA, por triplicado.

Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 415 nm.

Interpretación de resultados

Se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina, se realiza un análisis de regresión lineal y se interpola el promedio de la absorbancia de la muestra a evaluar.

Apéndice 11

Cromatografía en columna (CC) y cromatografía en capa fina (CCF)

Cromatografía en columna (CC)

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

Se caracteriza 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 separan.

Permite obtener información tanto cualitativa (para identificar los compuestos de la mezcla), como cuantitativa (para poder obtener la cantidad y composición de las sustancias separadas).

La cromatografía en columna abierta se realizó con 3 g del extracto metanólico.

Fase móvil: mezclas de Hexano, Hex-AcOEt, AcOEt-MeOH y MeOH en orden creciente de polaridad. Posteriormente se utilizó metanol con H_3PO_4 al 0.1, 0.2, 0.5, 1 y 2%.

Fase estacionaria: sílica gel de malla 70-230 μm (Sigma 5-2509).

Cromatografía en capa fina (CCF)

Este tipo de cromatografía permite: realizar el seguimiento de una reacción, determinar el grado de pureza de un compuesto y comparar muestras. La comparación de muestras es útil en la separación de sustancias, a partir del corrido de éstas de forma diferencial en la placa cromatográfica.

La placa de cromatografía es una lámina de plástico o aluminio recubierta de una fina capa de adsorbente (fase estacionaria), que generalmente es gel de sílice (SiO_2) o alúmina (Al_2O_3), ambas de carácter polar. En un extremo de la lámina se deposita la muestra a

analizar. Esta lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil). La mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, produciendo un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra entre el disolvente y el adsorbente.

La mayoría de las placas de cromatografía llevan un indicador fluorescente a la luz ultravioleta (254 nm) que permite la visualización de los compuestos activos previamente separados. Los compuestos activos evitan que el UV del indicador absorba la luz y el resultado es la visualización de fluorescencia en la placa (indicando la presencia de un compuesto).

Los compuestos que no absorben luz UV requieren de agentes reveladores. Éstos reaccionan con los productos adsorbidos en la placa, proporcionando color visible para su identificación.

Se utilizaron placas de aluminio recubiertas de sílica gel (TLC Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck), de 0.25 mm de espesor con soporte de aluminio de 20 x 20.

Apéndice 12

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Gros et al., 1985; Mathews et al., 2002).

Éste método es ampliamente usado para la separación, identificación, purificación y cuantificación de componentes de productos naturales (Gurib-Fakim, 2006). 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 la columna cromatográfica y donde la presión incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce su difusión, mejorando la resolución de la cromatografía.

Los elementos que participan en un HPLC son: fase móvil, fase estacionaria y la muestra. La muestra pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria, la cual presenta pequeñas partículas con características químicas en su superficie, mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión. Los componentes de la muestra se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que se adelantan por la columna. El tiempo que tarda un compuesto a ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y es una característica que identifica a un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria.

El extracto metanólico y las fracciones activas se analizaron por HPLC, con las siguientes condiciones:

- Columna Allsphere ODS-1 de 250 x 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 0.5 μm .
- **Extracto metanólico:** Se corrió de forma isocrática con una mezcla de MeOH-acetonitrilo- H_2O (25:25:50).
- **Fracciones activas:** se corrió con una mezcla de MeOH-acetonitrilo- H_2O - H_3PO_4 (25:25:50:0.1).
- Flujo: 1 ml/min.
- Detector de arreglo de diodos (DAD)
- Longitud de onda de 260nm, realizando un barrido completo de 200-400 nm.

Apéndice 13

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

En cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna.

Cromatógrafo de Gases Modelo 6850 y un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C VL MSD, ambos de marca Agilent Technologies.

Columna RTX de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 25 micras de película: compuesta de dimetil polisiloxano (95 %) y fenil polisiloxano (5 %).

Condiciones de corrida para las fracciones (método hexánico): fracciones 20, 21, 41 y 53.

- Temperatura del inyector: 250°C.
- Modo de inyección: Split.
- Radio: 33.5:1
- Purga de flujo del Split: 29.9 ml/min.
- Flujo de corrida: 35 cm/seg

Horno:

- Temperatura inicial: 70°C
- Rampa de calentamiento: 15°C por minuto hasta 290°C, se mantiene 6 min.
- Tiempo de corrida total: 21.67 minutos.
- Temperatura de línea de transferencia: 290°C.

Detector del Espectrómetro de Masas:

- Temperatura del cuadrupolo: 150°C.
- Temperatura de la fuente de ionización: 230°C.
- Impacto electrónico (EI): energía de ionización de 70 eV.
- Método de adquisición de datos. Full Scan.
- Rango de masas: 35-600 m/z.

REFERENCIAS

- Abreu A. C., McBain A. J. y Simões, M. 2012. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Products Reports* 29 (9): 1007-1021.
- Aguilar, O. C., Sosa, V., Aguilar, O. M. 2003. Toxic phenols in various Anacardiaceae species. *Economic Botany* 57 (3): 354-364.
- Aguilar, R. A. 2006. Actividad antimicrobiana de *Ceiba parvifolia* Rose (Pochote) de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. México.
- Akerele, O. 1993. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mundial de la Salud* 14: 390-395.
- Anaya, L. A. 2004. *Ecología Química*. Ed. Plaza y Valdéz S.A. de C.V. UNAM. 349 pp.
- Araujo, D. J. y Salas, A. R. 2008. Actividad antimicrobiana de plantas. *Científica* 6: 6-18.
- Argueta, V. A. y Cano, A. J. 1994. *Atlas de las plantas en la medicina tradicional mexicana*. Instituto Nacional Indigenista. México. 1193 pp.
- Avendaño, A., Casas, A., Dávila, P. y Lira, R. 2006. Use forms, management and commercialization of "Pochote" *Ceiba aesculifolia* (H.B. & K.) Britten & Baker f. subsp. *parvifolia* (Rose) P. E. Gibbs & Semir (Bombacaceae) in the Tehuacán Valley, Central, México. *Journal of Arid Environments* 67: 15-35.
- Avendaño, G. A., Lira, S. R., Dávila, A.P., Casas, F. A., De la Torre, A. R. 2008. Caracterización de un hongo asociado a la planta macho del pochote (*Ceiba aesculifolia* (H.B. & K.) Britten & Baker f. subsp. *parvifolia* (Rose) P.E. Gibbs & Semir) en Tehuacán-Cuicatlán, México. *Agrociencia* 41: 205-215.
- Beer, E. J. y 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. y Lira, S. R. 2004. Floristic composition, plant uses and management practices in homegardens of San Rafael Coxcatlán, Valley of Tehuacán-Cuicatlán, México. *Journal of Arid Environments*. 57: 39-62.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. 2008. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 19a edición. Manual Moderno. México. 824 pp.
- Caballero, J. y L. Cortés. 2001. Percepción, uso y manejo tradicional de los recursos vegetales en México. In: Rendón, B., S. Rebollar, J. Caballero y M. A. Martínez (eds.). *Plantas cultura y sociedad*. Universidad Autónoma Metropolitana-Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. Pp. 79-100.
- Callen, O. 1967. Analysis of Tehuacán Coprolites. En D. S. Byers, ed. *The Prehistory of the Tehuacán Valley*. Vol. 1: Environment and Subsistence. University of Texas Press, Austin, Texas. Pp. 261–280.
- Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Durán, 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.
- Canales, M. M., Hernández, D. T., Caballero, N. J., Romo de V. R. A., Durán, D. Á., 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.
- Casas, A., Valiente-Banuet, A., Viveros, J. L., Dávila, P., Lira, R., Caballero, J. 2001. Plant resources of the Tehuacán Valley, Mexico. *Economic Botany* 55: 129–166.
- Chekuboyina, R. K., Koteswara R. P., Bhaskar, R. D., Sirisha N., Raghava, R. T. 2012. Physico-chemical characterization and antimicrobial activity of *Ceiba pentandra* (Kapok) seed oil. *Alternative Medicine Studies* 2: 43-47.
- Cole, M. D. 1994. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays- a critical review. *Biochemical Systematic and Ecology* 22 (8): 837-856.

- CONANP. 2014. [En línea]: <http://tehuacan-cuicatlan.conanp.gob.mx/index.php> [Consulta: 19 agosto 2014].
- Cowan, M. M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 564-582.
- Davidson, P. M., Sofos, J. N., Branen, A. L. 2005. *Antimicrobials in food*. 3ªEd. Taylor and Francis Group. USA. 709 pp.
- Dávila, A. P., Medina, L. R., Ramírez, R. A., Salinas, T. A., Tenorio, P. 1995. Análisis de la flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: endemismo y diversidad. Citado en Linares, E., Dávila P., Chiang, F., Bye, R., Elias, T. (eds.). *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. pp. 33-41.
- Dávila, A. P., Arizmendi, M. Del C, Valiente-Banuet A., Villaseñor, J. L., Casas, A., Lira R. 2002a. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Biodiversity and Conservation* 11: 421-442.
- Dávila, A. P., Lira, S. R., Paredes, F. M., Blanckaert, I., Rosas, L. R. 2002b. La Flora útil de dos comunidades indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Zapotitlán Salinas y San Rafael Coxcatlán, Puebla. Informe final del proyecto T015. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. 33 pp.
- Davis, S. D., Heywood, V. H., Herrera-MacBryde, O., Villalobos, J., Hamilton, A. C. 1997. *Centres of Plant Diversity: A Guide and Strategy for Their Conservation*. Vol 3. World Wildlife Fund for Nature (WWF) and IUCN. Cambridge.
- Diego-Pérez, N. y Gómez-Campos, A. 2013. Flora de Guerrero. Bombacaceae. *Prensas de Ciencias México* 54: 34 pp.
- Domínguez, A. X. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Primera edición. Editorial Limusa. México. Pp. 3-17.
- Farnsworth, N., Akerele, A. O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., Guo, Z. 1985. *Bull. Organización Mundial de la Salud*. 63: 965-981.

- Feng, W. y Zheng, X. 2007. Essential oils to control *Alternaria alternata* *in vitro* and *in vivo*. Food Control 18 (9): 1126-1130.
- Fernández, B. M. 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. UNAM. México. 98 pp.
- Fernández, F. S. y Alonso, G. 2009. Cólera y *Vibrio cholerae*. Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" 40 (2): 50-69.
- Fook, Y. C. y Kheng, Y. S. 2009. Antioxidative and antibacterial activities of *Pangium edule* seed extracts. International Journal of Pharmacology 5 (5): 285-297.
- Freeman, B. C. y Beattie, G. A. 2008. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. The American Phytopathological Society. [En línea]: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/OverviewOfPlantDiseases.aspx> [Consulta: 19 agosto 2014].
- García, A.G. y Martínez, F. R. 2010. Especies de *Fusarium* en granos de maíz recién cosechado y desgranado en el campo en la región de Ciudad Serdán, Puebla. Revista Mexicana de Biodiversidad 81 (1): 15-20.
- García, M. E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 3a ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 252 pp.
- Gibbs, P. y Semir, J. 2003. A taxonomic revision of the genus *Ceiba* Mill (Bombacaceae). Anales del Jardín Botánico de Madrid 60 (2): 259-300.
- Gros, E. G., Pomilio, A. B., Seldes, A. M., Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría general de la organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C. 25-31 pp.
- Gurib-Fakim, A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular Aspects of Medicine 27: 1-93.
- Gutiérrez, A., D., Ortiz, G.C., Mendoza, C., A. 2008. Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación animal. Simposio de Metrología.

- Harborne, J. B. y Dey, P. M. 1989. Methods in plant biochemistry. Vol 1. Plant phenolics. Academic Press, San Diego. 552 pp.
- Hernández, X. E. 1993. Aspects of plant domestication in Mexico: a personal view. En: Ramamoorthy, T. P., Bye, R. A., Lot, A., Fa, J. (Eds.) Biological Diversity of Mexico. Oxford University Press, New York. 812pp.
- Inouye, S., Watanabe, Y., Nishiyama, Y., Takeo, K., Akao M., Yamaguchi, H. 1998. Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. Mycoses 41: 403-410.
- Kalita, P., Barman, T. K., Pal, T. K., Kalita, R. 2013. Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* Linn. Journal of Drug Delivery & Therapeutics 3(4): 33-37.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Sommers, H. M. 1985. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. 909 pp.
- Linares, D., Bye, R., Flores, B. 1999. Plantas Medicinales de México usos remedios y tradiciones. Instituto de Biología, UNAM. pp. 155.
- Linstrom, P.J. y Mallard, W.G. 2014. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69. National Institute of Standards and Technology. [En línea]: <http://webbook.nist.gov> [Consulta]: 7 noviembre 2014].
- Lira, R. 2001. Los recursos vegetales del Valle de Tehuacán-Cuicatlán desde una perspectiva etnobotánica. Informe técnico. Universidad Autónoma de México. 9 pp.
- Lira, R., I. Rodríguez, L. García, H. Cervantes, C. M. Flores, J. Vázquez, I. Peñalosa, L. Hernández, M. Urzúa, M. Moreno, G. Avila, T. Hernández, M. Canales, A. M. García-Bores, R. Serrano, O. Coronado y M. López. 2008. 2o Informe del proyecto Conservación de Plantas Útiles de San Rafael Coxcatlán, a Través de Bancos de Semillas y Propagación, MGU/Useful Plants Project (UPP) - México, KEW Royal Botanic Gardens/FES Iztacala, UNAM, México. 20 p.

- MacNeish, R. S. 1967. A Summary of the Subsistence. Páginas 290–331 en D. S. Byers, ed., The Prehistory of the Tehuacan Valley. Vol. 1: Environment and Subsistence. University of Texas Press. Austin, Texas.
- Madawala, S. R. P., Andersson R. E., Jastrebova, J. A., Almeida, M., Dutta, P. C. 2012. Phytosterol and α -Lipoic Acid Conjugates: Synthesis, Free Radical Scavenging Capacity and RP-LC-MS-APCI Analysis. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences 62 (3): 159-169.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. 2009. Brock Biología de los microorganismos. Pearson Addison Wesley. 12a ed. Pp. 873.
- Márquez, O. J. 1985. Germinación prematura del maíz (*Zea mays* L.) en la zona centro de Puebla. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- Martínez, F. S., González, G. J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria 17 (6): 271-278.
- Marzinek, J. y K. S. M. Mourão. 2003. Morphology and anatomy of the fruit and seed in development of *Chorisia speciosa* A. St.-Hil. – Bombacaceae. Brazilian Journal of Botany 26 (1): 23-34.
- Mathews, C. K., Holde, K. E., Ahern, K. G. 2002. Bioquímica. 3a ed. Addison Wesley. España. 166-170 pp.
- Medina, S. 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 de Licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. México. 48 pp.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal Science Technology 26 (2): 211-219.
- Montes, B. R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Micología 29: 73-82.
- Muñoz, C. N. 2013. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad inhibidora del sistema de censado de Quorum bacteriano, de las cortezas de *Amphipterygium adstringens*

- (Schltdl.) Standl. y *Ceiba* spp. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. México. 112 pp.
- Muroi, M., Shiragami, N., Nagao, K., Yamasaki, M., Takatsuki A. 1993. Folimycin (concanamycin A), a specific inhibitor of VATPase, blocks intracellular translocation of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus before arrival to the Golgi apparatus. *Cell Structure and Function* 18: 139–149.
- Nagamani, J., Divya, N., Suma, P. 2012. Antioxidant and antihemolytic activities of *Bombax Ceiba pentandra* spike and fruit extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4 (5): 311-315.
- 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.
- Organización Mundial de la Salud. Medicina tradicional. [En línea] 2008. http://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/index.html [Consulta: 7 de agosto 2013]. N°134.
- Orozco, M. J. 2010. Estudio comparativo de algunas actividades biológicas de las cortezas de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia*, *Juliana adstringens* y *Cyrtocarpa procera* de San Rafael Coxcatlán, Puebla. Tesis de Maestría. FES-Iztacala. UNAM. México. 128 pp.
- Osorno, S. 2001. Biología de la polinización de *Ceiba aesculifolia* subsp. *parvifolia* Rose. (Bombacaceae) en el Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Oyediji, O., Oziegbe, M., Taiwo, F. O. 2011. Antibacterial, antifungal and phytochemical analysis of crude extracts from the leaves of *Ludwigia abyssinica* A. Rich. and *Ludwigia decurrens* Walter. *Journal of Medicinal Plants Research* 5 (7): 1192-1199.
- Pagaza, C. M. y Fernández, N. R. 2004. La familia Bombacaceae en la cuenca del río Balsas, México. *Polibotánica* 17: 71-102.

- Paula, V. F., Barbosa, L. C., Demuner, A. J. 1997. The chemistry of the Bombacaceae family. *Química Nova* 20: 627–630.
- Pennington, T. D. y Sarukhán, J. 1998. *Árboles Tropicales de México*. 2ªed. UNAM-FCE. México.
- Pinto, E., Alfonso, C., Duarte, S., Vale-Silva, L., Costa, E., Sousa, E., Pinto, M. 2011. Antifungal activity of xanthenes: evaluation of their effect on ergosterol biosynthesis by high-performance liquid chromatography. *Chemical Biology & Drug Design* 77: 212-222.
- Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología* 25:78-82.
- Ramakrishna, A. y Ravishankar, G. A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behavior* 6 (11): 1720–1731.
- Ramamoorthy, P. K. y Bono, A. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology* 2 (1): 70-80.
- Ramírez, E. M., Barajas, B. L., Pérez, B. C., Sáenz, A. Galindo, S., Belmares, S. Y. 2012. Síntesis y actividad biológica de chalconas. *Revista Mexicana Ciencias Farmacéuticas* 43 (4): 7-14.
- Rao, S. R. y Ravishankar, G. A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 20: 101–153.
- Reddy, B. S., Reddy, K. K., Naidu, V. G. M., Madhusudhana, K., Agwane, S.B., Ramakrishna, S., Diwan, P.V. 2008. Evaluation of antimicrobial, antioxidant and wound-healing potentials of *Holoptelea integrifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* 115: 249-256.
- Refaat, J., Desoky, S. Y., Ramadan, M. A., Kamel, M. S. 2012. Bombacaceae: A phytochemical review. *Pharmaceutical Biology*: 1-31.
- 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. 193 pp.

- Rijke, E., Out, P., Niessen, M. W., Ariese, F., Gooijer, C., Brinkman, A. U. 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A* 1112: 31–63.
- Romero, M. 2014. Bases para el manejo sustentable de *Ceiba aesculifolia* (H.B. & K.) Britten & Baker f. subsp. *parvifolia* (Rose) P.E. Gibbs & Semir a través de un análisis poblacional. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.
- Rosas, L. R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala. UNAM. México. 94 pp.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa. México. 432 pp.
- Rzedowski, J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana* 14: 3-21.
- Salcedo-Sánchez, B. 1997. Insectos precortesianos de la cuenca de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. Pp. 6-10.
- Salisbury, R. 1992. *Plant physiology*. Ed. Hardcover. 4a ed. USA. Pp. 119-121.
- Secretaría de Salud. Censo de Población. 2001. Casa de salud de la comunidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ayuntamiento de Coxcatlán, Puebla, México. 10 pp.
- Sikkema, J., Bont, J. A., Poolman, B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59: 201-222.
- Simões, M., Bennett, R. N., Rosa, A. S. 2009. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. *Natural Products Reports* 26: 746-757.
- Singer-Marion, M.O. 2000. Bajo la sombra de la gran ceiba: la cosmovisión de los lacandones. *Desacatos* 5: 45-56. [En línea]: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=13900504>. [Consulta: 15 de julio de 2014].

- 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* 299: 152-178.
- Soto, R. O., Vega, G. M., Tamajón, L. N. 2002. Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 7 (2): 89-95.
- Standley, P. C. 1923. Bombacaceae. Trees and shrubs of Mexico. U.S. Natural Museum Contributions 23 (3): 786-794.
- Taddei, B. G., Santillana, M. A., Romero, C. J., Romero, T. M. 1999. Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. *Salud Pública de México* 41 (3): 216-220.
- Valiente-Banuet, A., Alcantara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arismendi, M. C., Ortega-Ramírez, J., Soriano, J. A. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 67: 25-75.
- Valiente, B. L. 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 65 pp.
- Vanden Berghe, D. A. y Vlietinck, A. J. 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Hostettmann, K. Series editor Dey, P. M. Academic Press. New York, USA. Pp. 47-71.
- Vila, R., Freixa, B., Cañiguera, S. 2013. Antifungal compounds from plants. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences III*: 23-43.
- Villaseñor, J. L., Dávila, P., Chiang, F. 1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 50: 135-149.
- Wang, H. y Bun, T. N. 2002. Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry* 61: 1-6.
- Zhanel, G. G., Hoban, D. J., Harding, G. K. 1992. Subinhibitory antimicrobial concentrations: A review of *in vitro* and *in vivo* data. *Canadian Journal of Infectious Diseases* 3 (4): 193-201.