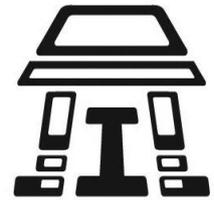




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y  
PROTOTIPOS**

**LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA**

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Momordica  
charantia* L.**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I Ó L O G O**

**PRESENTA:  
KENNETH YAEL VENTURA AVILA**

**DIRECTORA DE TESIS:  
Dra. MA. MARGARITA CANALES MARTINEZ**

**LOS REYES IZTACALA,  
TLALNEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO  
2024**





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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora de tesis, la Dra. Margarita Canales a quien conocí en segundo semestre y desde ahí noté su gran pasión por la ciencia y su facilidad para transmitirla. Ella fue la que influenció mi interés en esta rama de la química y las plantas medicinales. Tengo mucho que agradecerle ya que es un pilar muy grande para el desarrollo de mi carrera, siempre aportándome enseñanza, consejos y regaños como una segunda madre. Agradezco que me haya dado la oportunidad de formar parte del laboratorio de Farmacognosia y de realizar este trabajo con una especie de planta que siempre llamó mi atención. Gracias infinitas.

A mis abuelos Dora Domínguez y Ezequiel García, quienes nos transmitieron ese conocimiento del uso de algunas plantas medicinales, además de que me ayudaron en la búsqueda y colecta del material, siempre estuvieron al pendiente y atentos para saber más acerca de los beneficios del cundeamor.

A la Dra. Ana Hernández quien desde que llegué al laboratorio me recibió con los brazos abiertos y mostró interés en mi proyecto, apoyándome y guiando mis pasos en cada una de las técnicas utilizadas para que todo saliera bien. Además de resolver mis dudas y brindar con calidez su conocimiento, no sólo hacia mi sino hacia todo el laboratorio.

Al Dr. Marco Aurelio quien se tomó el tiempo de revisar mi trabajo y aportar sus observaciones al mismo, además de aportar consejos siempre para realizar una mejor presentación.

Al Dr. Mario quien mostró interés por mi proyecto aportando consejos y apoyo para engrandecer este trabajo.

A todos los que compartieron el laboratorio de Farmacognosia conmigo, haciéndome sentir parte de un gran grupo. Les agradezco a Uriel, Jimena, Pilar, Mikel, Sofía, Jessica, Marlene, David, Antonio y Wendolin por su ayuda y consejo en cada una de

las técnicas realizadas, por amenizar el ambiente, por hacer que estar en el laboratorio fuera como una segunda casa, por las risas y por mostrar apoyo en los momentos más difíciles.

Quiero hacer un especial agradecimiento a mi amigo Bauma quien fue el que estuvo apoyándome desde el inicio de mi carrera, desde que lo conocí siempre ha mostrado lealtad y me ha brindado una amistad que es de valorar. Así mismo durante el transcurso del proyecto aportando sus consejos y opiniones para que fuera mejor, gracias.

## DEDICATORIAS

A mi madre Berenice Avila quien me enseñó el valor de la vida y me formó desde pequeño como un gran ser humano, siempre impulsándome a ser mejor y apoyando cada paso de mi vida, no existen suficientes palabras para decir lo infinitamente agradecido por todos los desvelos, los regaños, los consejos, los alimentos tan ricos y todo lo que hiciste a lo largo de toda mi carrera escolar. GRACIAS MADRE, TE AMO.

A mi padre Sergio Ventura quien me enseñó a luchar por lo que quiero y me apoyó en todo momento tanto emocional y económicamente en las decisiones que yo tomé, dándome lecciones de vida y siempre buscando mi bienestar y que creciera cada vez más en el ámbito escolar y personal. TE AMO PADRE, MUCHAS GRACIAS.

A Yidonni Ventura, una persona aguerrida, dedicada, y disciplinada que siempre lucha por trascender en todos los aspectos, y como no dedicarle este trabajo a él, si fue de quien aprendí tantas cosas, una verdadera motivación para ser mejor. Es mi hermano y es un gran ejemplo a seguir, gracias.

A mis abuelos Virginia Espinoza y Francisco Ventura, seres increíbles que estuvieron conmigo desde el minuto 1 de mi vida, siempre dándome motivación y mucho cariño de verdad agradezco todo lo que hicieron por mí. Una dedicatoria especial a mi abuelito quien me sigue apoyando desde arriba, a quien me hubiera gustado que me viera titulado pero la vida no le brindó más tiempo para poder ser así, te amo abuelito, abrazo hasta el cielo.

A mi amigo Emiliano Betancourt quien se volvió una pieza fundamental para el desarrollo de mi carrera, sabiendo ser un gran amigo y acompañándome en las buenas y en las malas, haciéndome pasar muy buenos ratos, amenizando la carrera, además de ser alguien admirable y fiel con sus verdaderos amigos,

A todos mis compañeros del grupo 01 con quienes disfruté muchas clases y prácticas de campo juntos, pasándola genial y aprendiendo a la vez, me gusta que durante casi

toda la carrera fuimos un grupo unido y que supimos llevar a cabo y superar las clases y ya la gran mayoría, la carrera.

A mis abuelos maternos, a quienes les dedico este trabajo porque fueron pilares en el proceso de esta investigación, y siempre buscaban aportar su conocimiento para mi desarrollo profesional, esto va por ustedes, los amo mucho.

A mi novia Leslie Cambray, quien desde que la conocí, llegó para brindarme mucho amor y apoyo, siéndome muy leal y sabiendo ser una buena compañera dándome ánimos para poder titularme, te amo.

## ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	2
DEDICATORIAS .....	4
ÍNDICE GENERAL.....	6
ÍNDICE DE CUADROS .....	8
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN .....	10
ANTECEDENTES .....	12
JUSTIFICACIÓN.....	13
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	14
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVO GENERAL .....	14
OBJETIVOS PARTICULARES.....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
a) Colecta del material.....	15
Obtención del extracto metanólico .....	16
b) Pruebas químicas.....	16
Capacidad antioxidante del extracto .....	16
Fenoles Totales .....	16
Flavonoides Totales.....	16
Alcaloides Totales.....	17
c) Pruebas biológicas .....	17
Actividad antimicrobiana .....	17
-Método de difusión en agar de Kirby-Baüer .....	17
-Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) .....	18
Actividad de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	18
RESULTADOS.....	18
a) Colecta del material.....	18
Obtención del extracto .....	19
b) Pruebas químicas.....	21
Detección cualitativa de metabolitos secundarios .....	21
Cuantificación de fenoles, flavonoides y alcaloides totales. ....	22
Capacidad antioxidante del extracto .....	24

c) Pruebas biológicas .....	25
Actividad antibacteriana .....	25
-Evaluación cuantitativa en bacterias .....	27
Actividad sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	29
Actividad antifúngica .....	30
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIÓN.....	36
APÉNDICES .....	37
Apéndice 1: Descripción botánica de <i>Momordica charantia L.</i> .....	37
Apéndice 2: Zona de colecta .....	39
Apéndice 3:Método de difusión en agar de Kirby-Baüer (CLSI, 2012; Cole, 1994; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; Beer y Sherwood, 1945).....	41
Apéndice 4: Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1985; CLSI, 2012).....	43
Apéndice 5:Actividad sobre la curva de crecimiento bacteriano (Muroi et al., 1993).....	45
Apéndice 6: Conteo de fenoles totales (CFT) (Método modificado de Singleton et al., 1999).....	46
Apéndice 7:Contenido de flavonoides totales Método Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007) .....	48
Apéndice 8: Detección cualitativa de alcaloides .....	51
Apéndice 9: Cuantificación de Alcaloides (Shamsa et al., 2008) .....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	54

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Antecedentes de <i>Momordica charantia</i> .....	12
Cuadro 2. Ficha técnica de <i>M. charantia</i> .....	19
Cuadro 3. Rendimiento del extracto metanólico de <i>M. charantia</i> .....	20
Cuadro 4. Detección de metabolitos secundarios en ..... el extracto de <i>Momordica charantia</i> .....	22
Cuadro 5. Cuantificación de fenoles, flavonoides y alcaloides .....	23
Cuadro 6. Evaluación de la actividad del extracto sobre el crecimiento bacteriano. ....	26
Cuadro 7. Valores de CMI y CBM del extracto de <i>M. charantia</i> .....	29
Cuadro 8. Evaluación de la actividad del extracto sobre el crecimiento de hongos levaduriformes .....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama general de la metodología utilizada en esta investigación.....	15
Figura 2. Hojas y flor de <i>M. charantia</i> .....	19
Figura 3. Rendimiento del extracto metanólico de <i>M. charantia</i> .....	20
Figura 4. Extracto metanólico de <i>M. charantia</i> . ....	21
Figura 5. Prueba cualitativa de la presencia de metabolitos secundarios en el extracto metanólico de <i>M. charantia</i> . ....	22
Figura 6. Cuantificación de fenoles totales.....	23
Figura 7. Cuantificación de flavonoides totales. ....	24
Figura 8. Cuantificación de alcaloides totales. ....	24
Figura 9. Curva antioxidante del extracto .....	25
Figura 10. Halos de inhibición presentados por el extracto y el control positivo .....	26
Figura 11. Análisis sobre los halos de inhibición bacteriana del extracto de <i>M. charantia</i> ...	27
Figura 12. Microdilución en caldo para determinar la CMI y CBM. ....	28
Figura 13. Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	30
Figura 14. Halos de inhibición presentados por el extracto .....	31
Figura 15: <i>Momordica charantia</i> L.....	37
Figura 16: <i>Momordica charantia</i> L.....	38
Figura 17. Localización del poblado de Chichicaxtle, Veracruz. ....	39

## RESUMEN

El cuidado de la salud y prevención de enfermedades se ha ido relacionando desde la antigüedad con el uso de sustancias obtenidas de la naturaleza. En nuestro país existen cerca de 30 000 diferentes especies de plantas con flor, de las cuales se ha calculado que no menos de una quinta parte cuenta con propiedades medicinales significativas, dentro de las cuales podemos encontrar a la planta *Momordica charantia* o mejor conocida como “cundeamor”, la cual cuenta con antecedentes de sus propiedades medicinales benéficas para la salud. En este trabajo, se evaluó la actividad antimicrobiana de *M. charantia*. Para las pruebas químicas de fenoles, flavonoides y alcaloides se utilizaron pruebas colorimétricas para confirmar o descartar la presencia de los metabolitos secundarios, obteniéndose resultados positivos para los 3 metabolitos evaluados. Posteriormente se realizó la cuantificación de estos metabolitos obteniendo en fenoles 15.6mg eAG/g de extracto (1.56%), para flavonoides 2.23mg eQ/g de extracto (0.223%) y para alcaloides 1.746 mg eA/g de extracto (0.1746%). En el caso de las pruebas biológicas se evaluó la actividad del extracto sobre el crecimiento bacteriano, en donde *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. faecalis* fueron susceptibles ante la presencia del extracto. En la evaluación sobre hongos levaduriformes se evaluaron 3 especies de *Candida* en el cual ninguna fue susceptible al extracto metanólico de *M. charantia*. En la microdilución en caldo para obtener CMI y CBM se utilizaron las bacterias que fueron susceptibles al extracto obteniendo una CMI de 0.6 mg/ml y una CBM de 2.5 mg/ml para *S. aureus*, por otro lado, una CMI de 0.6 mg/ml y una CBM de 2.5 mg/ml para *E. faecalis*. Finalmente, para la técnica de actividad sobre la curva de crecimiento bacteriano se obtuvo que el extracto presenta un efecto bacteriostático ante *S. aureus* con las concentraciones de 5 mg/ml y 10 mg/ml.

**Palabras clave:** Cundeamor (*Momordica charantia*), Melón amargo, Pepino cimarrón, Extracto Metanólico, Cucurbitaceae, Actividad antibacteriana.

## **INTRODUCCIÓN**

El cuidado de la salud y prevención de enfermedades se ha relacionado desde la antigüedad con el uso de sustancias obtenidas de la naturaleza. La práctica de la medicina herbolaria se basa en el uso terapéutico de las plantas medicinales como sustitutas de las medicinas farmacéuticas o en combinación. De las plantas se usan sus extractos en diversas formas de preparación, para mejorar el estado de salud (White et al., 2004).

La medicina herbolaria se utiliza desde tiempos remotos para curar o aliviar las enfermedades, dando lugar a los fitofármacos, es apreciada por su bajo costo y por los reducidos índices de toxicidad, en comparación con algunos compuestos sintéticos (Pascual-Casamayor et al., 2014). Durante siglos, los conocimientos tradicionales, indígenas y ancestrales han sido un recurso fundamental para la salud en los hogares y las comunidades, y aún al día de hoy siguen constituyendo una parte importante de la atención de salud en muchas regiones, debido a que para millones de personas, sobre todo para las que viven en zonas remotas y rurales, la medicina tradicional sigue siendo la primera opción para mantener la salud y el bienestar, porque ofrece una atención culturalmente aceptable, accesible y asequible. Sin embargo, en muchos países del mundo, el diagnóstico de la medicina tradicional no está actualmente documentado ni reportado de manera eficiente. Por lo tanto, no se dispone de datos agregados y comparables a nivel internacional sobre los encuentros con la medicina tradicional en términos de forma, frecuencia, eficacia, seguridad, calidad, resultado y costo. De los 194 países miembros de la OMS, 170 mencionan que utilizan plantas medicinales, acupuntura, yoga, terapias indígenas y otras formas de medicina tradicional (OMS, 2023).

El estudio de las plantas medicinales, la etnobotánica, la fitoterapia y la fitoquímica están tomando gran importancia, tanto en la práctica de la medicina complementaria como en el ámbito académico. El 80% de la población mundial, utiliza las plantas como principal remedio medicinal. Esto se asocia al empirismo en la mayoría de los casos, por lo que faltan estudios químicos, clínicos y epidemiológicos que confirmen de forma determinante los efectos fisiológicos de las plantas y los principios activos responsables. El 25% de los fármacos existentes provienen de sustancias halladas en la investigación fitoquímica (Beyra et al., 2004).

En 2017 la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH) determinó que en México el consumo per cápita de plantas medicinales es de 500 gramos anuales, la práctica herbolaria constituye a su vez un referente biológico, al expresar en su materia vegetal la diversidad botánica y ecológica de nuestro país. La riqueza de recursos con que trabajan nuestros curadores populares refleja la variedad de regiones fisiográficas existentes en México. Así, existen cerca de 30 000 diferentes especies de plantas con flor, de las cuales se ha calculado que no menos de una quinta parte cuenta con propiedades medicinales significativas (Hersch-Martínez, 1999). Dentro de las cuales podemos encontrar a la especie *Momordica charantia* L. o mejor conocida como “cundeamor”, la cual cuenta con antecedentes de sus propiedades medicinales benéficas para la salud.

De acuerdo con la FHIA (2010) la especie *M. charantia*, perteneciente a la familia Cucurbitaceae, se encuentra en Asia, África, Sudamérica y el Caribe. En México es común encontrarla a lo largo de las zonas costeras del territorio nacional, por ejemplo, estado de Veracruz, Guerrero, Nayarit, Campeche, Jalisco, entre otros, esto debido a que la enredadera es favorecida por el clima tropical y el alto porcentaje de humedad en el aire. Esta especie tiene diferentes nombres comunes, de los que destacan “Cundeamor”, “Melón amargo”, “Balsamina”, “Pepino cimarrón” entre otros, y ha cobrado importancia debido a que se utiliza en la medicina tradicional mexicana, donde se emplean diferentes partes de la planta para aliviar ciertos padecimientos como lo son: hipertensión, dolor estomacal, altos niveles de glucosa, colesterol alto, entre otras.

De acuerdo con diversas pruebas biológicas de *M. charantia* se ha informado que tiene actividad hipoglucemiante, antibacteriana, antiviral, antitumoral, inmunomodulación, antioxidante, antihelmíntica, antimutagénica, antiulcerosa, antilipolítica, hepatoprotectora, y antiinflamatoria. Además de incluir proteínas, polisacáridos, y fitoquímicos como flavonoides, triterpenos, saponinas, ácido ascórbico y esteroides (Shuo et al., 2017).

## ANTECEDENTES

En el cuadro 1, se presentan algunas de las actividades biomédicas reportadas para *M. charantia*.

**Cuadro 1: Antecedentes de *Momordica charantia***

Referencia	Parte de la planta utilizada	Aportación
Harinantenaina et al., 2006	Fruto maduro y seco.	Evaluaron la actividad hipoglucemiante de la fracción del extracto metanólico y ha mostrado efectos hipoglucémicos en sangre en la cepa de ratones macho con diabetes inducida a 400 mg/kg.
Horax et al., 2006.	Cáscara, tejido interno y semilla del fruto.	Analizaron cuatro variedades de melón amargo ( <i>M. charantia</i> ) verde india, blanco india, verde china y blanco china para determinar el contenido fenólico total y determinar que fenoles están presentes principalmente en las semillas, pulpa y cáscara de la planta, obteniendo como resultado que los contenidos fenólicos variaron de 4.67 a 8.02, 4.64 a 8.94 y 5.36 a 8.90 mg eAC/g, respectivamente.
Lagarto et al., 2008	Tallos y hojas.	Demostraron la baja toxicidad de la ingestión oral de extractos de todas las partes de la planta, sin embargo, se ha observado toxicidad e incluso muerte en animales de laboratorio cuando se inyecta por vía intravenosa.
Santos et al., 2012	Hojas	Utilizaron el extracto etanólico de <i>M. charantia</i> para evaluar la actividad antifúngica de la planta respecto a cepas de <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> y <i>Candida krusei</i> , demostró que la planta <i>M. charantia</i> contiene una actividad modificadora de fungicidas con toxicidad moderada.
Bai et al., 2016a, b	Fruto	Extracto etanólico de <i>M. charantia</i> alivió el estado inflamatorio en el sistema y en los tejidos adiposos blancos de ratas obesas, y se asocia con una regulación proporcional de la microbiota intestinal.
Svobodova et al., 2016	Tallo, hojas, flores y frutos.	Evaluación de las actividades biológicas del extracto de etanol/agua de las partes aéreas y correlaciona estas actividades con la presencia de compuestos fenólicos. El extracto mostró actividad antioxidante en los cuatro ensayos (DPPH, potencia reductora, blanqueamiento de caroteno y TBARS).

Nahid et al., 2017	Frutos frescos e inmaduros	Análisis revelaron que el extracto de <i>M. charantia</i> reduce los niveles de azúcar en sangre y contiene una cantidad considerable de alcaloides, fenoles y saponinas. También se pueden encontrar taninos, glucosas, proteínas, entre otros.
Shuo et al., 2017	Fruto, pulpa, semilla.	El extracto acuoso de <i>M. charantia</i> mostró una actividad antimicrobiana significativa en bacterias como: <i>S. typhi</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> .
Mituiassu et al., 2021	Flores y frutos.	Evaluaron la actividad larvicida de tres extractos (metanol, acetato de etilo y hexano) de flores y frutos de <i>M. charantia</i> ante larvas de <i>Aedes aegypti</i> , obteniendo como resultado que existe una alta toxicidad a los extractos de acetato de etilo de flores y frutos en concentraciones de 200 µg/ml y 100 µg/ml, con 97% y 87% de mortalidad de larvas (L3), respectivamente. El extracto de hexano demostró una baja toxicidad, mientras que el extracto de metanol exhibió una mortalidad larvaria del 78%.

## JUSTIFICACIÓN

El melón amargo (*M. charantia*) es utilizada de manera común para aliviar distintos padecimientos en Sudamérica, así como en México, particularmente en el estado de Veracruz, sin embargo, a nivel nacional no se realizan muchos estudios que involucren a esta especie, y mucho menos existe una propagación o cultivo importante de ella.

Debido a que en México los estudios biológicos de *M. charantia* en pro de la farmacognosia son escasos, es importante retomar las investigaciones respecto a las propiedades medicinales y nutraceuticas de esta especie debido a los numerosos reportes positivos de su uso como medicina alternativa en las regiones donde esta especie crece de forma silvestre y donde sus funciones son conocidas únicamente por tradición, además, en el viejo continente, donde también presenta distribución natural, se han percatado de la importancia del uso de esta planta y algunas de estas

han derivado en medicamentos o suplementos alimenticios que se han comercializado.

Es por lo antes mencionado que se realizó este proyecto, con la finalidad de evaluar las propiedades medicinales de *M. charantia*.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

Dada la evidencia que existe sobre la actividad antibacteriana de *M. charantia* en medio oriente, ¿la planta *M. charantia* colectada de la zona de Chichicaxtle, Veracruz tendrá actividad antibacteriana?

## **HIPÓTESIS**

Si se ha demostrado que los extractos de *M. charantia* son una fuente importante de fenoles y flavonoides; y si se ha reportado que este tipo de compuestos pueden ser los responsables de diferentes actividades biomédicas, entonces, es muy probable que la especie obtenida de la región de Chichicaxtle Veracruz presente actividad antibacteriana.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la actividad antimicrobiana de *M. charantia*.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Colectar la planta en el estado de Veracruz.
2. Obtener el extracto metanólico (EM) por maceración.
3. Determinar el efecto antimicrobiano del extracto (difusión en agar de Kirby-Baüer).
4. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) del extracto (microdilución en caldo).

5. Determinar si nuestro EM es bacteriostático o bactericida mediante la técnica de actividad sobre la curva de crecimiento bacteriano.
6. Cuantificar la Capacidad Antioxidante Media (CA<sub>50</sub>) de los extractos por el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH).
7. Cuantificar la Concentración de Fenoles Totales (CFT), la Concentración de Flavonoides Totales y la Concentración de Alcaloides Totales por espectrofotometría.

## MATERIALES Y MÉTODOS

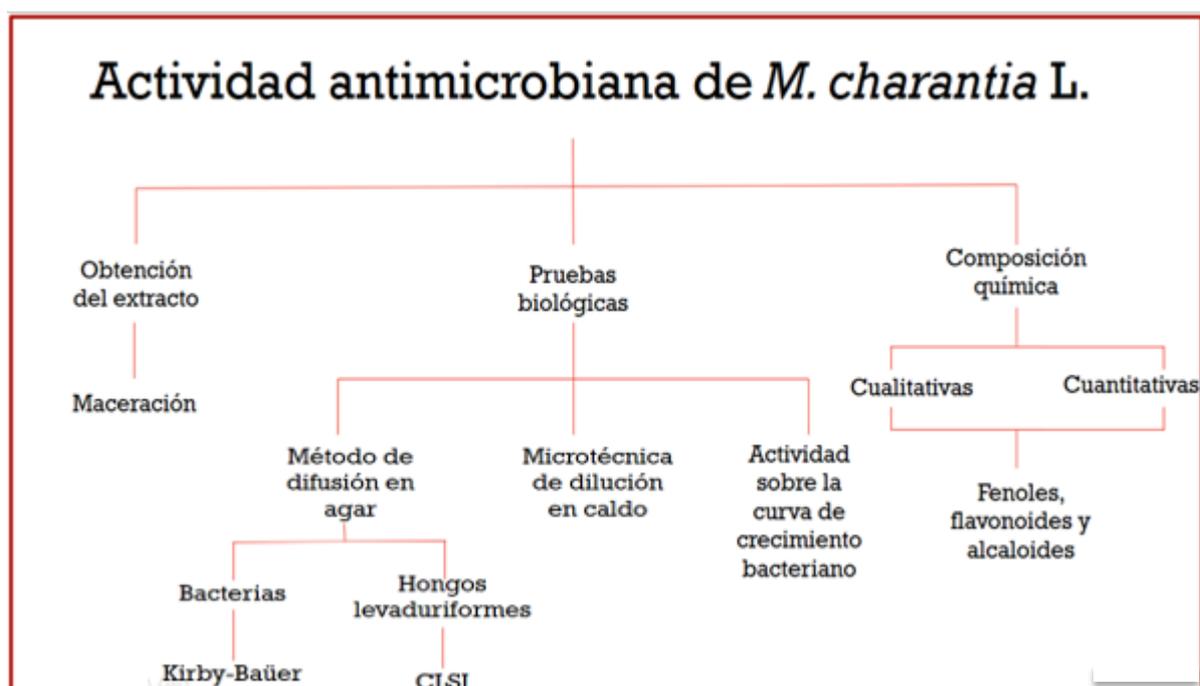


Figura 1. Diagrama general de la metodología utilizada en esta investigación.

### a) Colecta del material

Se colectaron 2 kg de *M. charantia* de la comunidad de Chichicaxtle, Veracruz, se limpiaron y se aportó un ejemplar para la determinación taxonómica por el Herbario de la FES Iztacala.

## **Obtención del extracto metanólico**

El extracto metanólico (EM) se obtuvo por el método de maceración (Domínguez, 1973). Para tal fin, se pesó la planta seca y se colocó únicamente tallos y hojas en un matraz con metanol, para posteriormente obtener el extracto metanólico crudo, que se filtró y destiló a presión reducida utilizando un rotavapor. El rendimiento del extracto se determinó con relación al peso seco de la planta.

### **b) Pruebas químicas.**

#### **Capacidad antioxidante del extracto**

Se determinó por el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Se cuantificó la Capacidad Antioxidante Media (CA<sub>50</sub>), utilizando las concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 µg/ml. Como control positivo se utilizó quercetina. Como blanco se usaron pozos con 200 µg de metanol grado HPLC. El DPPH se preparó a una concentración de 0.1 mM (0.004 g en 100 ml de metanol HPLC) (Guija-Poma et al., 2015)

#### **Fenoles Totales**

La Concentración de Fenoles Totales (CFT) se cuantificó por espectrofotometría con base en una reacción colorimétrica redox por el método modificado de Singleton et al., 1999. Se realizó una curva de calibración con ácido gálico en una solución estándar de 200 µg/ml. A partir de esta solución se tomaron alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.0625, 0.125, 0.5 y 1 mg/ml). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg eAG/g) (Apéndice 6).

#### **Flavonoides Totales**

Se determinó por medio del método de Dowd, empleando una solución de AlCl<sub>3</sub> al 2%. Se realizó una curva de quercetina a diferentes concentraciones (1-100 µg/ml). Se determinó la absorbancia a 415 nm, y los resultados se expresaron como µg equivalentes de quercetina por gramo de extracto (µg eQ/g) (Ramamoorthy y Bono, 2007) (Apéndice 7).

## **Alcaloides Totales**

Se determinó por medio de la técnica de Shamsa et al. (2008), utilizando para ello, verde de bromocresol. Se realizó una curva patrón con atropina a diferentes concentraciones (0.02-0.1 mg/ml). Se determinó la absorbancia a 470 nm y los resultados se expresaron como mg equivalentes de atropina por gramo de extracto (mg eA/g). (Apéndice 8 y 9)

### **c) Pruebas biológicas**

#### **Actividad antimicrobiana**

##### **-Método de difusión en agar de Kirby-Baüer**

Se determinó la actividad antibacteriana por la técnica de difusión en agar de Kirby-Baüer, para lo cual, se impregnaron sensidiscos con 2 mg del extracto a probar; como control positivo se usaron sensidiscos impregnados con 25 µg de cloranfenicol (Vanden-Berghe y Vlietinck, 1991; CLSI, 2012) (Apéndice 3).

- B1) *Staphylococcus aureus* CDBB-1044 (+)
- B2) *Staphylococcus aureus* donada por la CUSI (+)
- B5) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (+)
- B6) *Enterococcus faecalis* CDBB-B-1533 (+)
- B8) *Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-999 (-)
- B19) *Escherichia coli* (-)

En el caso de los hongos levaduriformes, se llevó a cabo la misma metodología, utilizando como control positivo sensidiscos impregnados con 25 µg de Nistatina y las cepas evaluadas fueron las siguientes:

- C4) *Candida albicans* CDBB-L-1003
- C7) *Candida tropicalis* CDBB-L-1098
- C13) *Candida glabrata* CB5138

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

Se realizó la microtécnica de dilución en caldo, con un abanico de concentraciones del extracto metanólico de *M. charantia* (40,20,10,5,2.5,1.25,0.625 mg/ml). Las cajas se inocularon con 50 µl de un cultivo bacteriano a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/ml y se incubaron por 24 horas. Posteriormente se agregaron 50 µl de TTC (sal de tetrazolio) 0.08% como indicador de viabilidad celular (Koneman, 1985; CLSI, 2012). (Apéndice 4)

### **Actividad de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriano**

Para evaluar la actividad sobre la curva de crecimiento bacteriano, se utilizó una cepa Gram positiva, monitoreándose el crecimiento de ésta durante 24 horas al ser expuestas a diferentes concentraciones de los extractos (CMI, CBM, 2CBM y 4CBM) y un grupo testigo, durante 9 tiempos (Muroi et al., 1993) (Apéndice 5).

## **RESULTADOS**

### **a) Colecta del material**

La planta fue colectada en la comunidad de Chichicaxtle, Veracruz en el mes Agosto del 2022 obteniendo la información sobre la misma y sus propiedades (Cuadro 2).

## Cuadro 2. Ficha técnica de *M. charantia*.

Nombre común	Cundeamor
Nombre científico	<i>Momordica charantia</i> L.
Familia	<i>Cucurbitaceae</i>
Usos	En la medicina tradicional mexicana, se usan todas las partes de la planta para aliviar distintos padecimientos como lo son: hipertensión, dolor estomacal, altos niveles de glucosa, colesterol alto, sarpullido, entre otras.
Parte utilizada	Hojas y tallos.



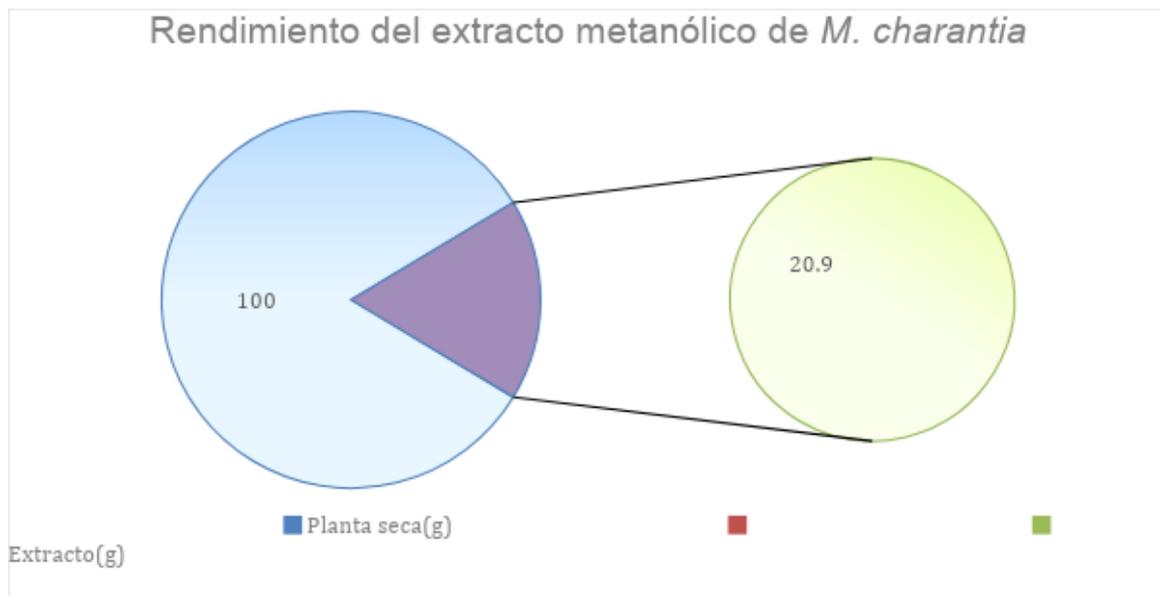
Figura 2. Hojas y flor de *M. charantia*

### Obtención del extracto

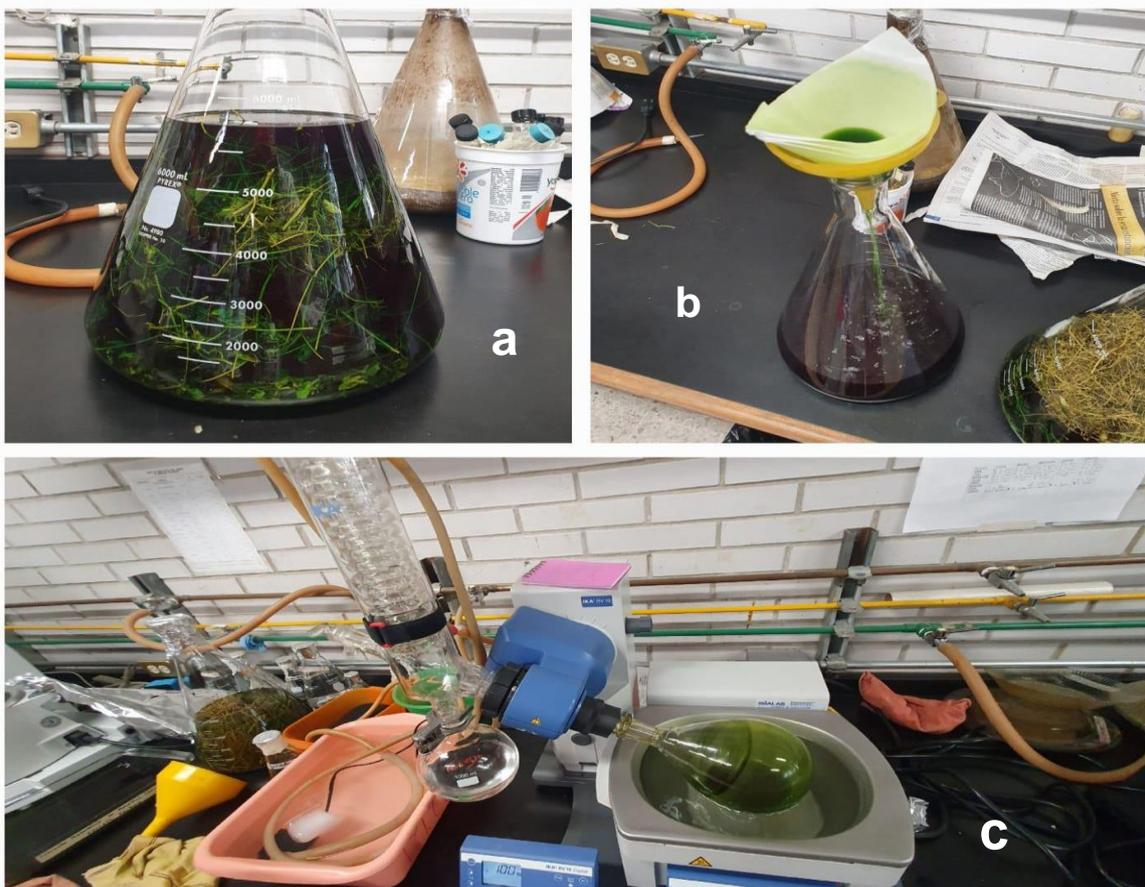
En el Cuadro 3 se presentan los resultados del rendimiento del extracto metanólico de *M. charantia*, en donde se utilizaron 100 g de planta seca macerados en 5.5 litros de metanol, el cual presentó un color verde oscuro acercándose drásticamente a un tono negro, con un olor característico a hierba y ligeramente amargo, con un peso final del extracto de 20.9 g (Figura 3 y 4).

**Cuadro 3. Rendimiento del extracto metanólico de *M. charantia***

	Extracto (g)	%
PLANTA SECA (100 g)	20.9	20.9



**Figura 3. Rendimiento del extracto metanólico de *M. charantia*.** Se muestra el rendimiento del extracto obtenido (20.9g) a partir de 100g de planta seca.



**Figura 4. Extracto metanólico de *M. charantia*.** a: maceración con metanol; b: filtrando el extracto metanólico; c: eliminación del exceso de solvente a presión reducida.

## b) Pruebas químicas

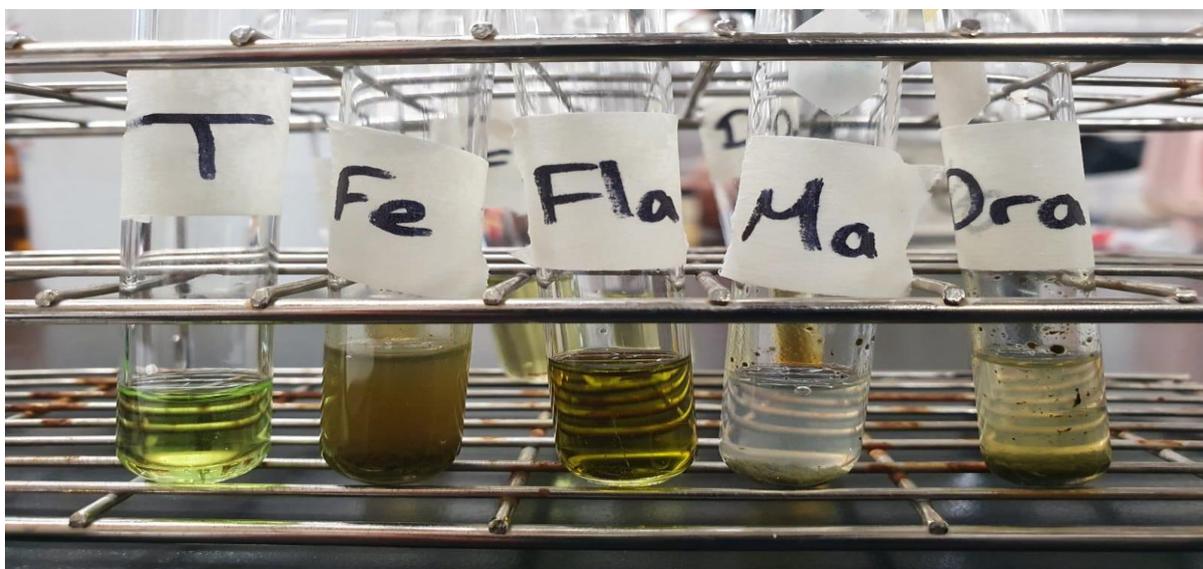
### Detección cualitativa de metabolitos secundarios

Para comenzar con la identificación de compuestos presentes en el extracto, se hicieron pruebas cualitativas para detectar la presencia o ausencia de compuestos como alcaloides, fenoles y flavonoides (Figura 5). Se utilizó cloruro férrico para la prueba de fenoles en el cual si ocurre un vire a azul muy oscuro es porque existe presencia de estos, en el caso de los flavonoides se utilizó cloruro de aluminio el cual vira a amarillo si hay presencia de flavonoides y finalmente, para alcaloides se hicieron 2 pruebas, en la primera se usó reactivo de Meyer en el cual se observa un precipitado blanco si el resultado es positivo y la otra prueba fue con reactivo de Dragendorff en el cual se observa un precipitado rojo si el resultado es positivo. Los resultados se reportan en el Cuadro 4.

**Cuadro 4. Detección de metabolitos secundarios en el extracto de *Momordica charantia***

Metabolito	Extracto <i>M. charantia</i>
FENOLES	++
FLAVONOIDES	+
ALCALOIDES	+

++: Alta presencia; +: Mediana presencia



**Figura 5. Prueba cualitativa de la presencia de metabolitos secundarios en el extracto metanólico de *M. charantia*.** Los metabolitos evaluados fueron fenoles(Fe), flavonoides (Fla), alcaloides con reactivo de Meyer (Ma) y alcaloides con el reactivo de Dragendorff (Dra). T: Testigo

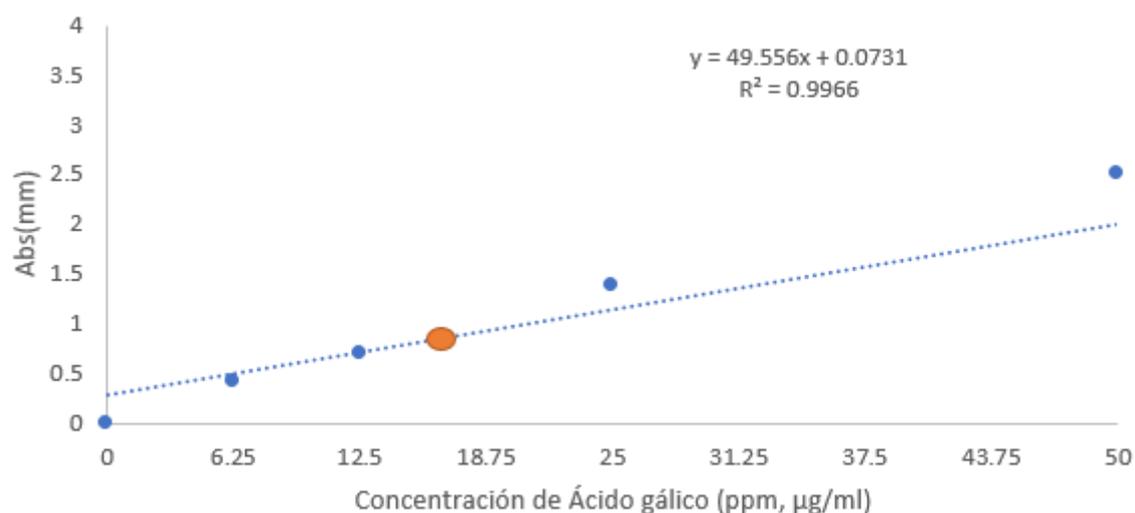
### **Cuantificación de fenoles, flavonoides y alcaloides totales.**

Después de haber detectado la presencia de fenoles, flavonoides y alcaloides se procedió a la cuantificación de estos compuestos. Los resultados se plasmaron en el cuadro 5. En las figuras 6, 7 y 8 se muestra la curva patrón de cada grupo de metabolito secundario donde se interpoló la absorbancia del extracto de *M. charantia*.

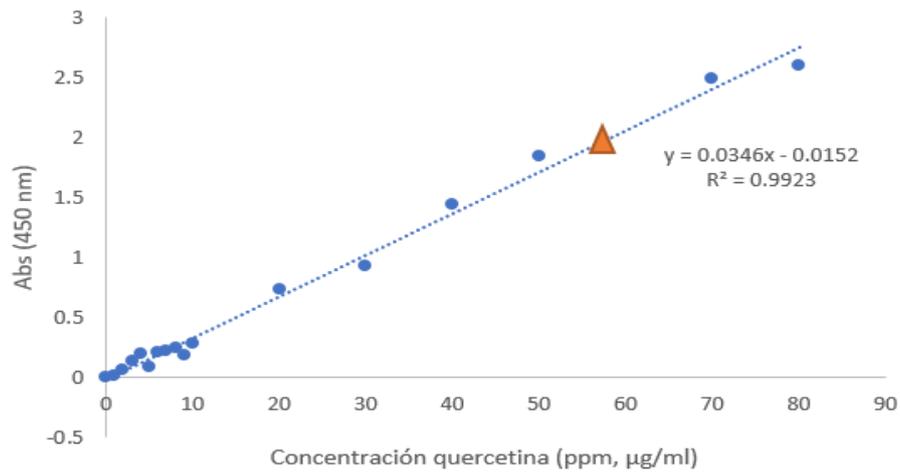
**Cuadro 5. Cuantificación de fenoles, flavonoides y alcaloides.**

Extracto	Fenoles (mg *eAG/g)	Flavonoides ( mg (*eQ) /g)	Alcaloides (mg *eA/g)
Metanólico	15.6 (1.56%)	2.23 (0.223%)	1.746 (0.17%)

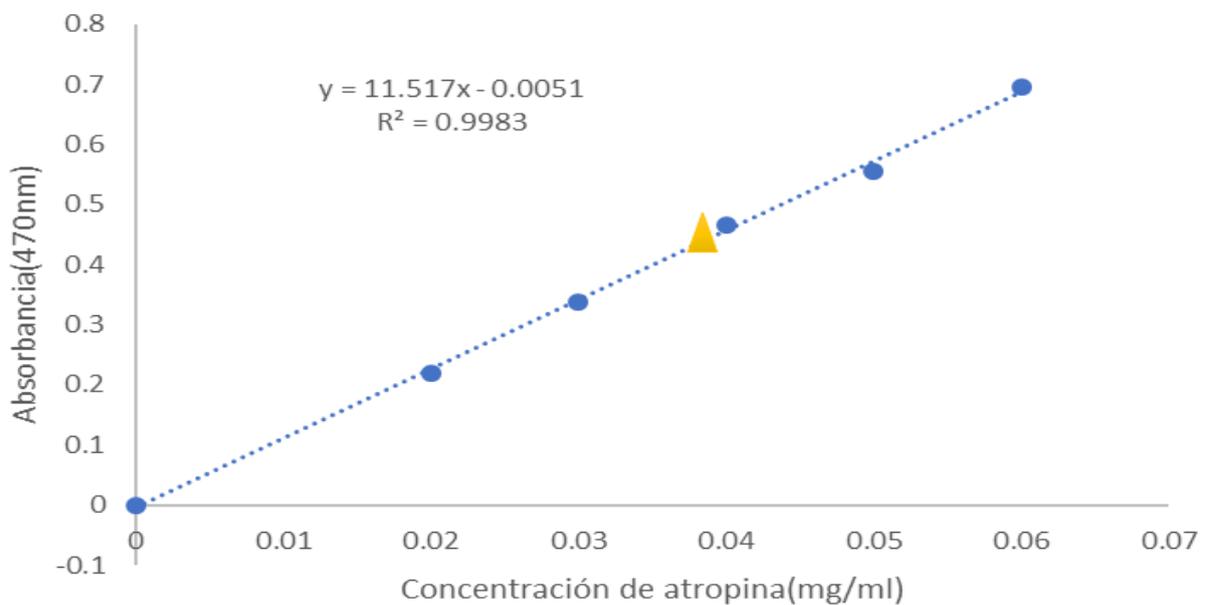
\*eAG/gr= equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto; \*eQ/gr= Equivalentes de quercetina por gramo de extracto; \*eA/gr= Equivalentes de atropina por gramo de extracto.



**Figura 6. Cuantificación de fenoles totales.** Curva de calibración leída a 760 nm para la cuantificación de fenoles totales donde se señala el valor de fenoles presentes en el extracto metanólico de *M. charantia*, señalado con el círculo naranja.



**Figura 7. Cuantificación de flavonoides totales.** Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides totales donde se señala el valor de flavonoides presentes en el extracto metanólico de *M. charantia*, señalado con el triángulo naranja.



**Figura 8. Cuantificación de alcaloides totales.** Curva de calibración para la cuantificación de alcaloides totales donde se señala el valor de alcaloides presentes en el extracto metanólico de *M. charantia*, señalado con el triángulo amarillo.

### Capacidad antioxidante del extracto

Los resultados de la prueba de la capacidad antioxidante del extracto metanólico fue de 486.72 ppm. Los datos se encuentran registrados en la figura 9, se muestra la

gráfica resultante al evaluar la capacidad antioxidante de las diferentes concentraciones del extracto de *M. charantia*, tomando como estándar la quercetina.

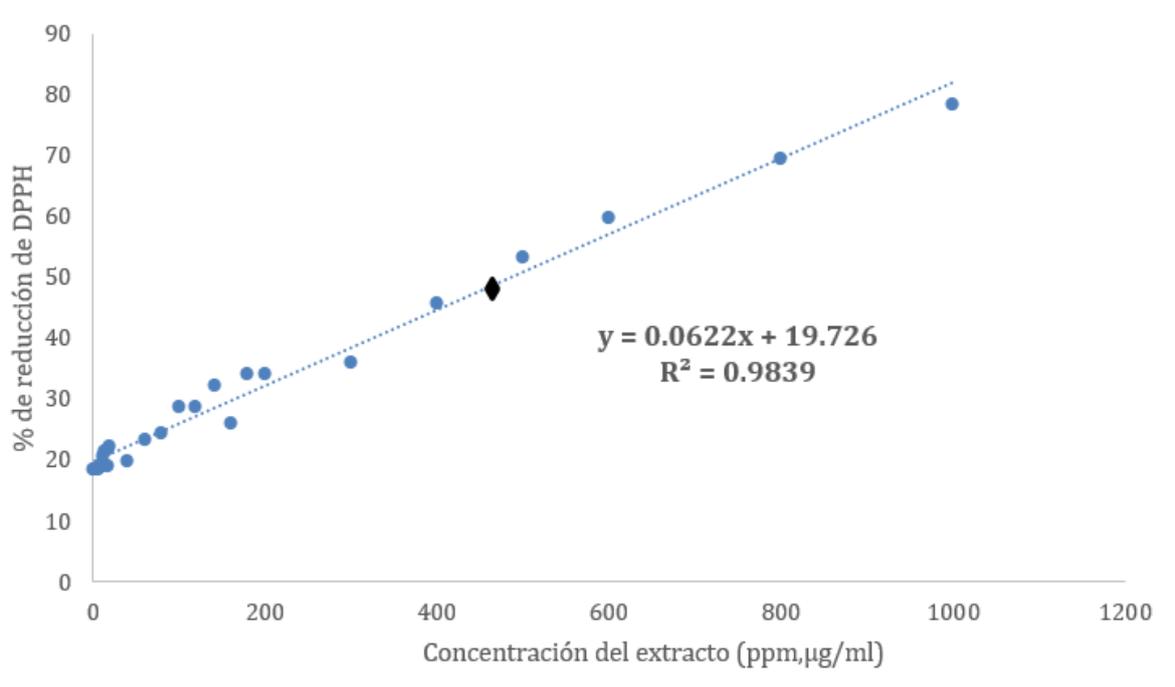


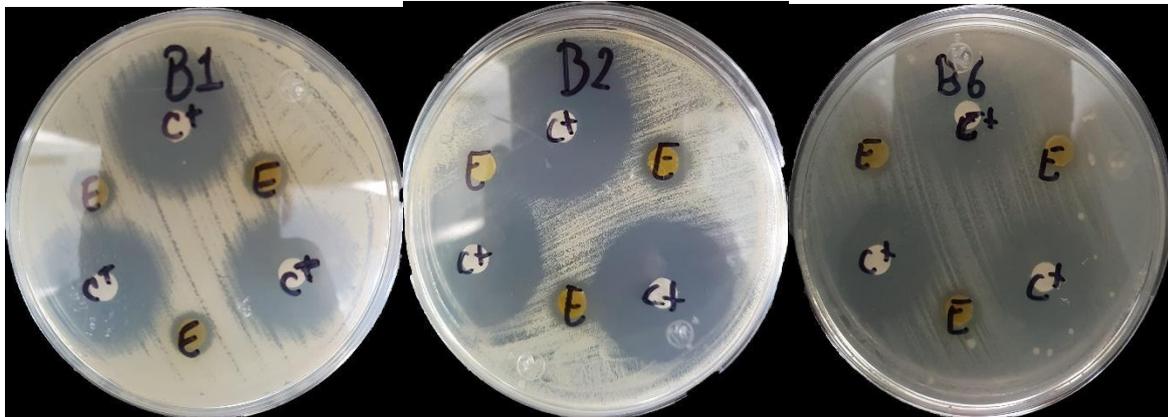
Figura 9. Curva antioxidante del extracto.

### c) Pruebas biológicas

#### Actividad antibacteriana

Se obtuvieron los halos de inhibición, que presentó el extracto de las hojas y tallos de *M. charantia* al interactuar con 6 cepas bacterianas de las cuales 4 fueron Gram positivas (*Staphylococcus aureus* CDBB-1044, *Staphylococcus aureus* donada por la CUSI, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* CDBB-B-1533) y 2 Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* CDBB-B-999 y *Escherichia coli*). El extracto metanólico de *M. charantia* tuvo efecto inhibitorio ante las 4 bacterias Gram positivas, siendo *Staphylococcus aureus* donada por la CUSI la que resultó más

susceptible ante nuestro extracto. Las bacterias Gram negativas no presentaron susceptibilidad ante el extracto metanólico de *M. charantia*. Los resultados se muestran en la Fig. 10, 11 y el cuadro 6.

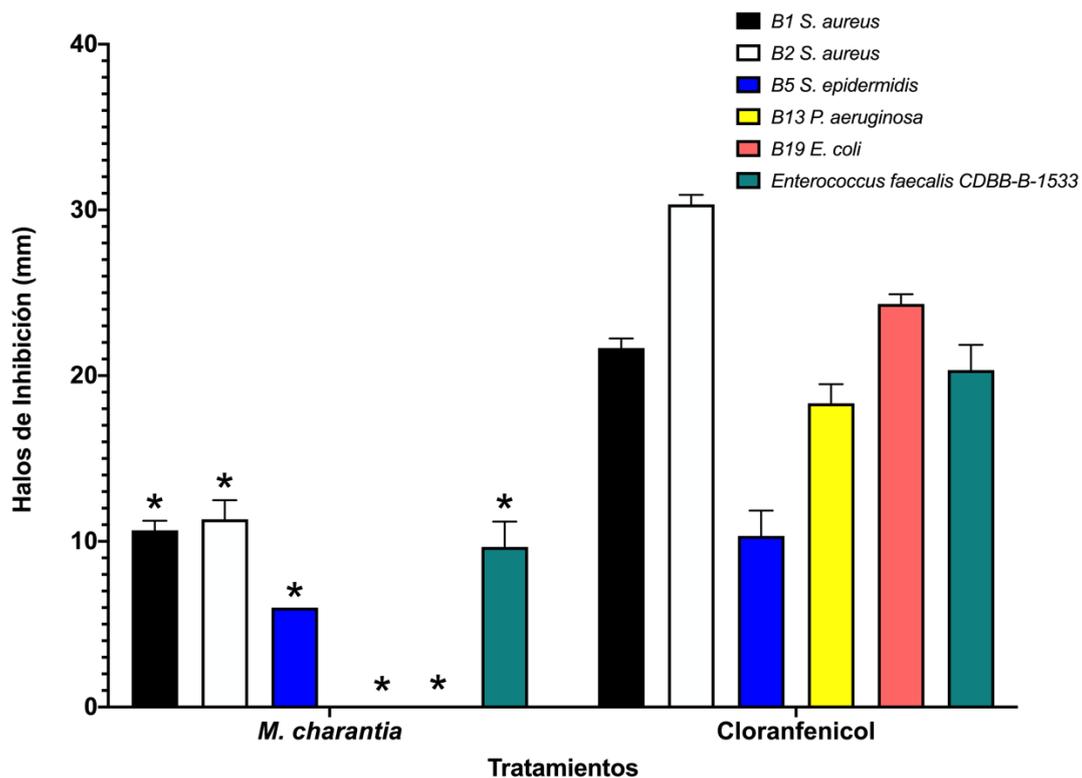


**Figura 10.** Halos de inhibición presentados por el extracto y el control positivo, se observa que el control positivo (C+) posee los halos de inhibición mayores respecto al extracto de *M. charantia*, sin embargo, el extracto presentó actividad en 4 de las 6 bacterias evaluadas.

**Cuadro 6. Evaluación de la actividad del extracto sobre el crecimiento bacteriano.**

	<b>Cepa</b>	<b>Cloranfenicol (mm)</b>	<b>Extracto <i>M.</i> <i>charantia</i> (mm)</b>
1	B1) <i>Staphylococcus aureus</i> CDBB-1044 (+)	21.67 ± 0.57	10.67 ± 0.57
2	B2) <i>Staphylococcus aureus</i> donada por la CUSI (+)	30.33 ± 0.57	11.33 ± 0.0
3	B5) <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 (+)	10.33 ± 1.52	6.0 ± 0.0
4	B6) <i>Enterococcus faecalis</i> CDBB-B-1533 (+)	20.33 ± 1.52	9.67 ± 1.52
5	B8) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CDBB-B-999 (-)	18.33 ± 1.15	na
6	B19) <i>Escherichia coli</i> (-)	24.33 ± 0.57	na

Sensidiscos impregnados con el extracto metanólico de *M. charantia* con una concentración de 2mg/disco. Diámetro en milímetros del halo de inhibición; na= no activo; Gram positiva (+); Gram negativa (-)



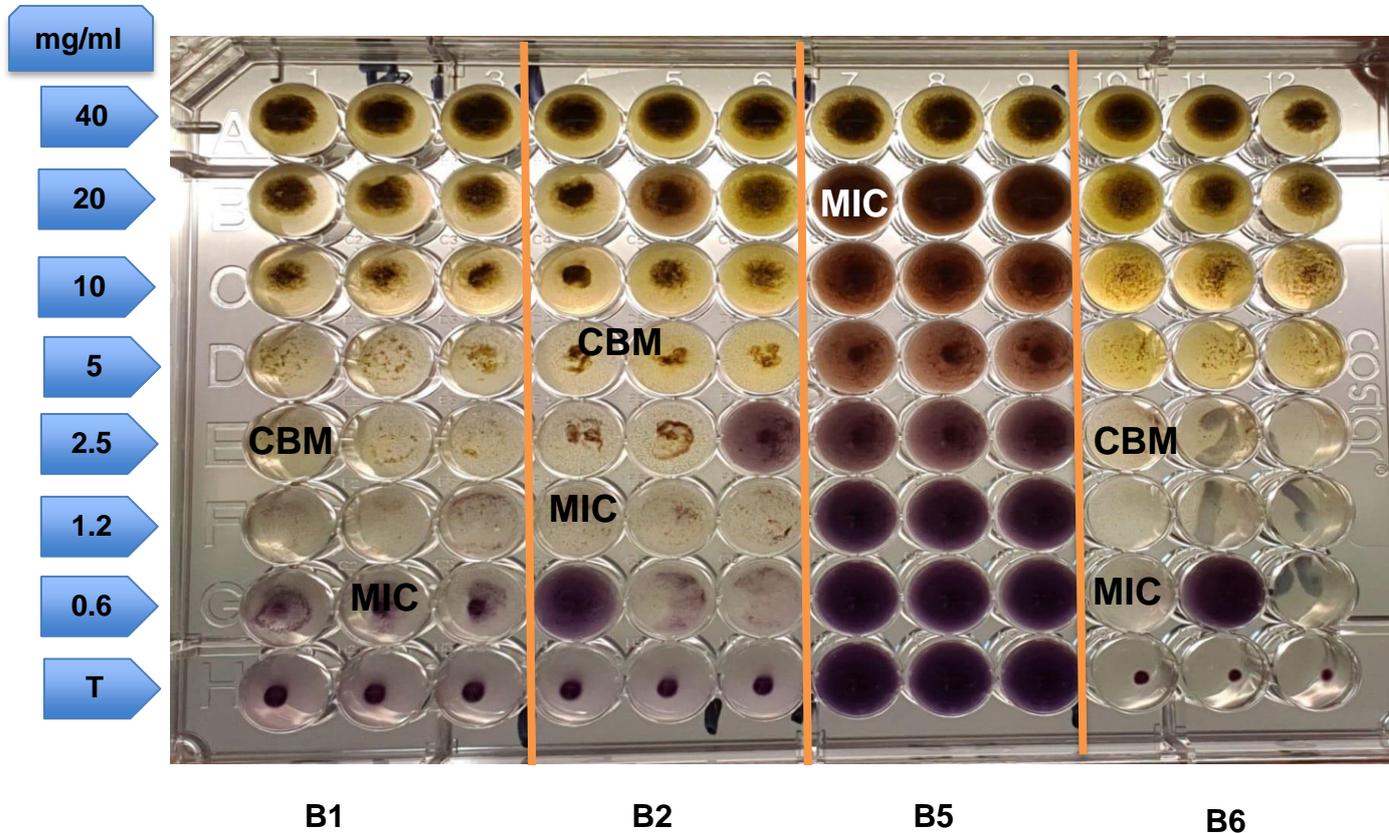
**Figura 11. Análisis sobre los halos de inhibición bacteriana del extracto de *M. charantia*.** Se observa que nuestro extracto presenta actividad en bacterias Gram positivas. Se realizó la prueba de Mann-Whitney ( $P < 0.05$ ) ya que los datos no presentan una distribución normal. El \* señala la diferencia significativa entre la cepa bacteriana tratada con cloranfenicol y la cepa tratada con el extracto de *M. charantia*

En la figura 11 puede observarse el efecto del extracto en las cepas utilizadas para el ensayo de difusión en agar. Donde se analizó el halo de inhibición visible alrededor del sensidisco, en el gráfico se observa claramente que las bacterias que presentan una susceptibilidad mayor ante el extracto metanólico son las Gram positivas y que nuestro control positivo tuvo efecto inhibitorio ante las 6 cepas bacterianas evaluadas.

#### **-Evaluación cuantitativa en bacterias.**

Posteriormente a la evaluación de difusión en agar donde se determinaron los diámetros de los halos de inhibición en las diferentes cepas de bacterias, se procedió

a determinar los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM) del extracto. Los valores obtenidos de cada concentración de extracto pueden observarse en el cuadro 7, así como también el efecto de los extractos sobre las bacterias de manera colorimétrica mediante el reactivo de TTC (Fig. 12)



**Figura 12. Microdilución en caldo para determinar la CMI y CBM.** B1: *S. aureus* CDBB-1044; B2: *S. aureus* donada por la CUSI; B5: *S. epidermidis* ATCC 12228; B6: *Enterococcus faecalis* CDBB-B-1533. CMI (Concentración mínima inhibitoria); CBM (Concentración bactericida mínima).

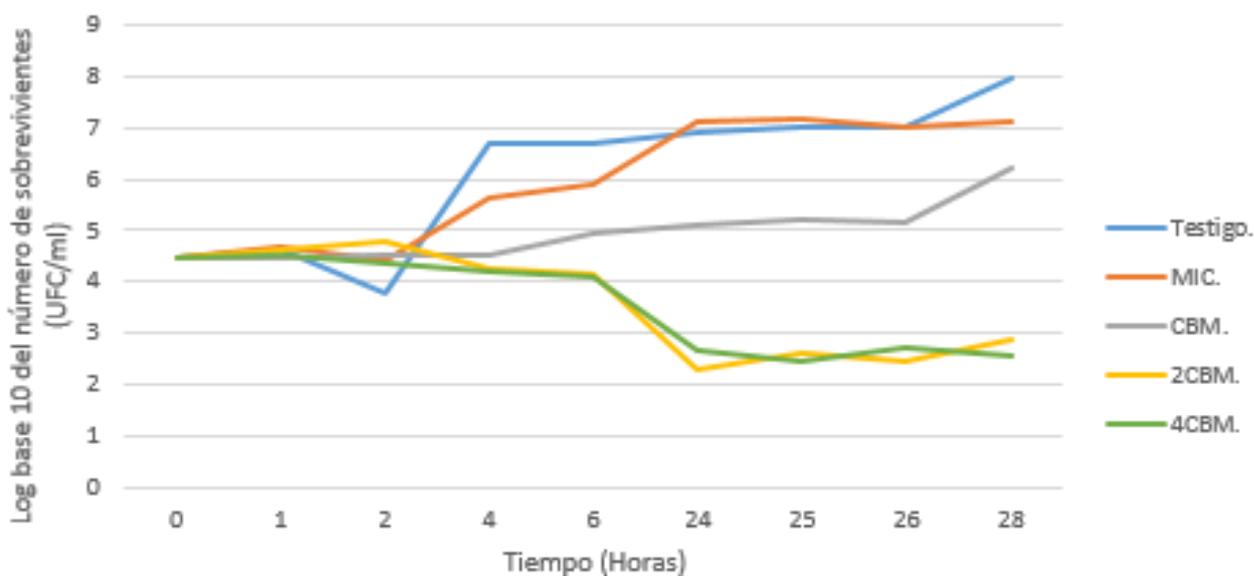
El ensayo se realizó por triplicado, usando diferentes concentraciones de extracto (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.2, 0.6 mg/ml) y el testigo (T), el cual no tenía ninguna concentración de extracto. En color morado pertenece a las colonias bacterianas vivas teñidas por el TTC, mientras que los pozos sin color muestran la actividad antibacteriana del extracto. Es importante recordar que el color de nuestro extracto era un verde muy oscuro, así que en las concentraciones más altas para las bacterias B1, B2 y B6 el botón oscuro que se observa es parte del extracto y no un indicativo del crecimiento bacteriano. Por otro lado, en la bacteria B5 si se observa crecimiento bacteriano incluso hasta la concentración de 20mg/ml.

**Cuadro 7. Valores de CMI y CBM del extracto de *M. charantia*.**

CEPAS	Extracto <i>M. charantia</i> (mg/ml) CMI	Extracto <i>M. charantia</i> (mg/ml) CBM
B1) <i>Staphylococcus aureus</i> CDBB-1044 (+)	0.6	2.5
B2) <i>Staphylococcus aureus</i> caso clínico CUSI (+)	1.25	5
B5) <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 (+)	20	>40
B6) <i>Enterococcus faecalis</i> CDBB-B-1533 (+)	0.6	2.5

**Actividad sobre la curva de crecimiento bacteriano.**

La siguiente prueba realizada fue analizar la actividad del extracto en la curva de crecimiento bacteriano. Para ello, se seleccionó una cepa Gram positiva (*Staphylococcus aureus* caso clínico CUSI). Para la prueba, se utilizaron cuatro concentraciones (MIC, CBM, 2CBM y 4CBM). Los resultados se graficaron en la figura 13.

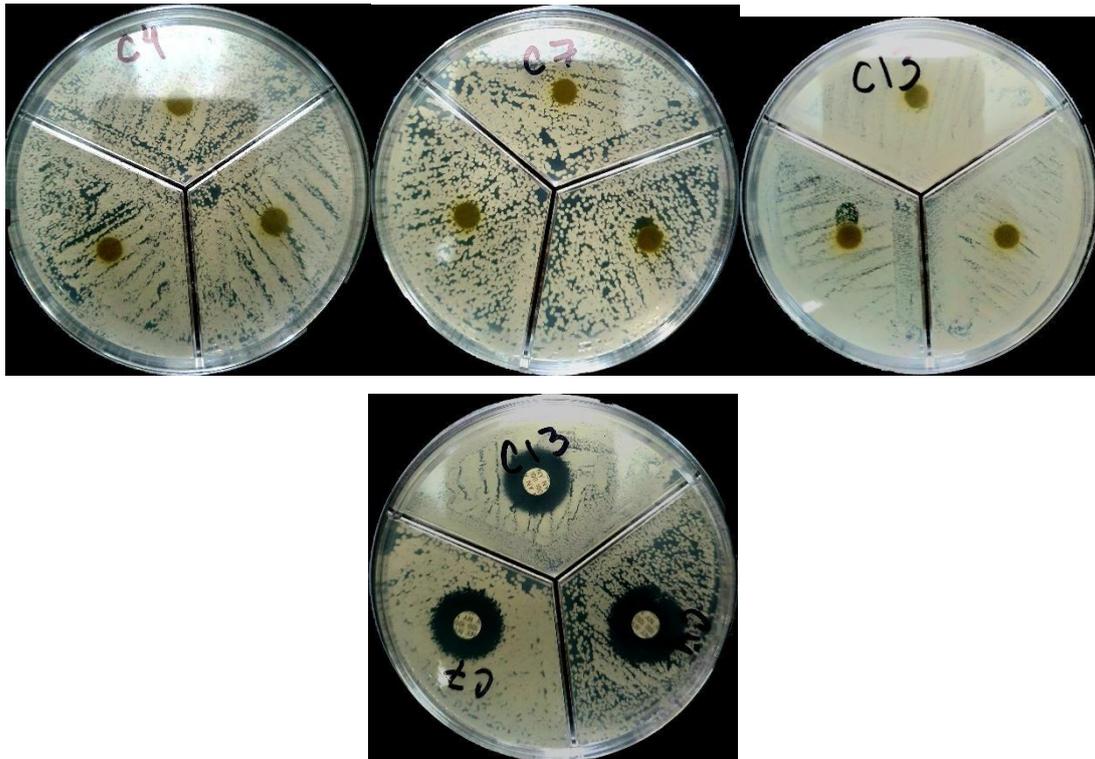


**Figura 13. Actividad del extracto metanólico sobre la curva de crecimiento bacteriano en *Staphylococcus aureus* caso clínico CUSI.** MIC= 1.25 mg/ml; CBM= 5 mg/ml; 2CBM= 10 mg/ml; 4CBM= 20 mg/ml.

El extracto metanólico presentó un efecto bacteriostático en las concentraciones 2CBM (5 mg/ml) y 4CBM (10 mg/ml), mientras que la concentración de CBM (2.5 mg/ml) mantuvo el crecimiento bacteriano por abajo del grupo testigo dentro de las primeras 7 horas con un pequeño realce en el último tiempo del experimento. En el caso de la concentración correspondiente a CMI (1.25mg/ml) la bacteria no presentó ninguna alteración en su proliferación y crecimiento normales al ser comparada con el grupo testigo, porque el aumento en el número de colonias fue gradual, pero es interesante el comportamiento que presenta a partir de las 26 horas, ya que al parecer la tendencia del crecimiento es a estabilizarse siendo menor que el grupo testigo que sigue en aumento.

### **Actividad antifúngica**

Se obtuvieron los halos de inhibición, que presentó el extracto de las hojas y tallos de *M. charantia* al interaccionar con hongos levaduriformes, utilizando para el experimento una concentración en cada sensidisco de 4 mg, y teniendo como control positivo sensidiscos impregnados con 25 µg de nistatina. Los resultados se muestran en la figura 14.



**Figura 14. Halos de inhibición presentados por el extracto y el control positivo ante C4 (*Candida albicans*), C7 (*Candida tropicalis*) y C13 (*Candida glabrata*).**

Se observa que el control positivo (nistatina) fue el único que posee los halos de inhibición ante cada una de las levaduras evaluadas, ya que el extracto de *M. charantia* no presentó actividad ante ninguna de ellas.

**Cuadro 8. Evaluación de la actividad del extracto sobre el crecimiento de hongos levaduriformes.**

	Cepa	Nistatina (mm)	Extracto <i>M. charantia</i> (mm)
1	C4) <i>Candida albicans</i> CDBB-L-1003	18.0 ± 0.5	na
2	C7) <i>Candida tropicalis</i> CDBB-L-1098	16.0 ± 0.5	na
3	C13) <i>Candida glabrata</i> CB5138	16.0 ± 0.5	na

Sensidiscos impregnados con el extracto metanólico de *M. charantia* con una concentración de 4mg/disco. Diámetro en milímetros del halo de inhibición(mm); na: no activo.

## DISCUSIÓN

La especie *Momordica charantia* es una especie trepadora que se encuentra dentro de la familia Cucurbitaceae, es favorecida por el clima tropical y por un alto porcentaje de humedad en el aire, distribuida en Sudamérica, el Caribe, África y Asia (Braca et al., 2008), en México se han hecho observaciones de la especie en varios estados cercanos a las costas como Baja California, Quintana Roo, Veracruz, Jalisco, Oaxaca, Campeche, Yucatán, Nayarit, Guerrero, Chiapas, Tabasco, San Luis y algunos otros como Michoacán, Durango, Tamaulipas, , Morelos, Hidalgo y Estado de México; todas las partes de la planta se utilizan para aliviar distintos padecimientos como lo son: hipertensión, dolor estomacal, altos niveles de glucosa, colesterol alto, entre otras.

Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen de manera positiva porque se reafirma la efectividad de esta especie reportada en la medicina tradicional mexicana, ya que se demostró que presenta actividad antimicrobiana principalmente ante *S. aureus*, por lo que se valida el uso medicinal tradicional de esta especie. Cabe recalcar que a pesar de que ya se han hecho diferentes estudios alrededor del mundo de esta especie (Shuo et al, 2017), es la primera vez que en México se realiza una investigación acerca de las propiedades antibacterianas de *M. charantia*.

El rendimiento del extracto metanólico de *M. charantia*, fue de 20.9% sobre peso seco de la planta, el solvente utilizado (metanol) tiene una polaridad alta, mayormente inclinada a polar, lo cual da la posibilidad de extraer compuestos polares y apolares por exceso de solvente. Rakholiya et al., (2014) utilizaron extractos metanólicos a diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%), además de un extracto acuoso, todos obtenidos de diferentes partes de *M. charantia*, en donde el mayor rendimiento lo obtuvo el extracto acuoso de pulpa y cáscara (25%), de la parte aérea, el extracto obtenido con metanol al 50% obtuvo el mayor rendimiento con un 20% sobre peso seco, en cuanto a las semillas, el extracto obtenido con metanol al 25% fue el que obtuvo el mayor rendimiento con un 18%, el rendimiento extractivo fue considerablemente mayor con agua que con metanol, también se observa que a medida que la concentración de metanol disminuyó, el rendimiento extractivo aumentó, por lo que se puede decir que en ciertas partes de la planta los

fitoconstituyentes solubles en agua son mayores. El uso del solvente metanol en este trabajo se justifica principalmente porque se utilizó la parte aérea de la planta, sin embargo, es importante tomar en cuenta que a pesar de haber obtenido resultados de calidad con este solvente de polaridad alta, existen otros que también poseen propiedades interesantes, por ejemplo, Nobre et al., (2005) llevó a cabo la estandarización de extractos para el estudio de metabolitos secundarios de *M. charantia*, utilizó un extracto etanólico (70%), mientras que el otro fue acuoso, también explica que el uso de diferentes métodos de extracción interviene en la cuantificación de flavonoides, demostrando así que la solución extractiva que presentó el mayor porcentaje de flavonoides fue preparado por maceración, con etanol 70%.

Los análisis químicos del extracto de *M. charantia* confirman la presencia de fenoles, flavonoides y alcaloides en hojas y tallos, se observa que hay 1.6% de fenoles, 0.223% de flavonoides y 0.17% de alcaloides en 1 g de extracto metanólico de *M. charantia*. Sin embargo, Horax et al., (2006) realizó otro estudio donde trabajaron con semillas, tejido de la cubierta de la semilla y pulpa, utilizaron 2 tipos de extractos uno liofilizado y otro secado al horno, en donde se encontró que el contenido fenólico de los tejidos secados al horno fue significativamente mayor (5.39% a 8.94% mg equivalentes de ácido clorogénico (CAE)/g en peso seco) en comparación con el rendimiento del extracto obtenido por liofilización (4.64% a 8.90% mg equivalentes de ácido clorogénico (CAE)/g en peso seco).

En otro estudio llevado a cabo por Abalaka et al., (2009) reportaron ausencia de saponinas y flavonoides en hojas y tallo, por otro lado, encuentran alcaloides y taninos en ambas partes de la planta, para un extracto con 20 g de planta seca molida de *M. charantia* en 100 ml de etanol al 95%.

Respecto a la actividad antioxidante del extracto de *M. charantia* se obtuvo una  $CA_{50}$  de 486.72  $\mu\text{g/ml}$ , de acuerdo con Shan et al, (2012) los flavonoides son el grupo con mayor capacidad antioxidante de la *M. charantia*, a pesar de eso un extracto metanólico usado por Xie y Zhang (2010) de la planta mostró baja actividad antioxidante con una  $CA_{50}$  de 612  $\mu\text{g/ml}$  aun así mostró ser mejor que la mostrada por el extracto acuoso con una  $CA_{50}$  de 1200  $\mu\text{g/ml}$  esto puede deberse a que los flavonoides a pesar de ser solubles en agua son mayormente solubles en metanol.

En otro estudio realizado por Ghaffar et al. 2016, el aceite de las semillas de *M. charantia* del distrito de Charsadda en Pakistán mostró tener una capacidad antioxidante de 23.89% a la concentración máxima evaluada de 100 µg/ml, por lo que la variación en la capacidad antioxidante también puede ser resultado de la parte de la planta utilizada, así como de las condiciones en las que se da su crecimiento.

En la evaluación de la actividad antimicrobiana se obtuvieron halos de inhibición sobre 4 de las 6 cepas bacterianas utilizadas: *S. aureus*, *S. aureus*, caso clínico CUSI, *S. epidermidis* y *E. faecalis* por lo que se reporta el extracto como bioactivo, sin embargo, en la evaluación ante hongos levaduriformes no presentó actividad inhibitoria ante ninguna de las 3 cepas evaluadas. En estudios realizados por Rakholiya et al., (2014) donde utilizaron diferentes extractos hidroalcohólicos (100% MeOH, 75% MeOH, 50% MeOH, 25%MeOH, Acuoso y Hexánico), los cuales se evaluaron ante diferentes cepas bacterianas Gram positivas, Gram negativas y algunos hongos, se encontró que todos los extractos mostraron actividad contra *S. aureus* lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo, la mayor actividad la obtuvo el extracto con MeOH al 50% seguido del extracto hexánico ante *Micrococcus flavus*. Según Braca et al., (2008) el aceite esencial de semillas de *M. charantia* presenta un efecto inhibitorio significativo sobre *S. aureus*, mientras que presentó baja actividad ante *E. coli* y *C. albicans* con una concentración >500 µg/ml. Por otro lado, Lu et al., (2011) no observó actividad en *S. aureus*, *E. coli* o *P. aeruginosa* en el extracto del fruto sin semilla de la planta a una concentración de 10 mg/ml, por lo que el extracto del tallo y hojas de la planta posee mejores resultados ante estas cepas.

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en µg/ml) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C. (Andrews, 2001), mientras que la CBM se interpreta como la concentración más baja que puede eliminar por completo los microorganismos (99.9% de inhibición). Empleando un indicador de viabilidad celular, una coloración morada es indicativa de crecimiento microbiano debido a que el TTC se une a la cadena respiratoria de las bacterias, generando el vire de color. En este caso la CMI y CBM fue evaluada en bacterias Gram positivas, se determinó que en *S. aureus* CDBB-1044, *S. aureus* caso clínico, *S. epidermidis* ATCC-12228 y *E.*

*faecalis* presentaron una CMI de 0.6, 1.25, 20 y 0.6 mg/ml y una CBM de 2.5, 5.0, >40.0 y 2.5 mg/ml respectivamente. En el caso de los hongos levaduriformes no se continuo con esta metodología debido a los resultados negativos obtenidos en los halos de inhibición. Rakholiya et al., (2014) cuantificó la CMI y CBM del extracto metanólico de la parte aérea de las plantas para la bacteria *Micrococcus flavus* obteniendo una CMI de 0.312 mg/ml y una CBM de 1.25 mg/ml, también lo realizó con bacterias Gram negativas como lo son *P. pictorium*, *P. putrida*, *P. testosteroni* y *P. syringae*, pero no encontró resultados favorables al no obtener valores determinables en las primeras 3 bacterias y la última con una concentración >1.25 mg/mL tanto para CMI y CBM, por lo que podemos determinar que el extracto metanólico presentó mayor actividad antibacteriana en bacterias Gram positivas.

Esta propiedad antibacteriana es asociada principalmente a la considerable presencia de fenoles y flavonoides que presenta nuestro extracto, ya que estos metabolitos secundarios son de los grupos más importantes de compuestos fenólicos con los que existe evidencia de su actividad antibacteriana ante las bacterias Gram positivas, en donde influye el tipo y la posición de los sustituyentes del anillo bencénico y la longitud de la cadena lateral de los ácidos fenólicos (Gill y Holley, 2006). Por otro lado, Maddox y colaboradores (2010) mencionan que los ácidos fenólicos pueden inhibir el crecimiento de las bacterias debido a las propiedades prooxidativas, así como por alterar la hidrofobicidad y la carga superficial de las células, causando finalmente la fisura y deposición citoplasmática. También es importante considerar que las bacterias Gram negativas, Gram positivas y los hongos presentan diferencias en cuanto a la estructura y composición de la pared celular, por ejemplo, las bacterias Gram positivas poseen una pared celular mucho más gruesa que las Gram negativas, sin embargo, las Gram negativas presentan una segunda capa externa con un alto porcentaje de lípidos que le brinda un mayor grado de protección, siendo esa la más probable razón de que nuestro extracto no haya tenido actividad ante ellas. El mismo caso sucede con *Candida* ya que estos microorganismos presentan una capa de quitina, una de glucano y una más externa de proteínas las cuales le ayudan para darle estructura a la célula y además le brinda protección mecánica ante agentes externos, siendo esta la principal razón por la que se asume que los componentes de nuestro extracto no pudieron interactuar con las células microbianas de manera efectiva.

En el caso de la curva de crecimiento bacteriano para *S. aureus* se observa que el extracto tiene actividad bacteriostática en las concentraciones de CBM, 2CBM y 4CBM, ya que el éxito reproductivo bacteriano no se llevó a cabo con eficiencia porque el número de colonias se mantuvo muy bajo en comparación con el grupo testigo. Para el caso de CBM el crecimiento bacteriano se mantuvo bajo durante los primeros 7 tiempos del experimento, pero en la última hora existió un ligero realce en el crecimiento bacteriano. En la concentración más baja que fue CMI hubo un crecimiento gradual hasta las 26 horas, ya que a partir de ese tiempo se estabilizó el crecimiento bacteriano, es un comportamiento interesante porque el hecho de que a bajas concentraciones el crecimiento bacteriano se ve poco afectado, nos puede indicar que el extracto a estas concentraciones no es tóxico, aunque se deben hacer protocolos específicos para demostrarlo. Por lo que más adelante sería interesante evaluar a diferentes niveles la toxicidad del extracto, ya que como reporta Lagarto y colaboradores en el año 2008 que el extracto de diferentes partes de la planta presenta baja toxicidad por ingestión oral, pero presenta alta toxicidad e incluso muerte en animales de laboratorio cuando se inyecta por vía intravenosa.

## **CONCLUSIÓN**

El extracto metanólico de *M. charantia* presenta actividad antibacteriana principalmente en bacterias Gram positivas: *S. aureus*, *S. epidermidis* y *E. faecalis*. además el extracto metanólico presenta un efecto bacteriostático ante *S. aureus* en concentraciones de 5, 10 y 15 mg/ml. El extracto metanólico de *M. charantia* no inhibió a los hongos levaduriformes, pero demostró tener capacidad antioxidante, estos resultados están correlacionados con los compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides presentes en el extracto.

## APÉNDICES

### Apéndice 1: Descripción botánica de *Momordica charantia* L.

#### Nombre común:

Es conocida en Sudamérica como melón amargo, cundeamor o balsamina y en Asia y África como balsam pear, bitter, melon, karela, papala, balsam apple, bitter gourd, melao de sao caetano, sorosi, Khandan, bejuco de coje, cundeamor, sibicoje, sibicogen, subicogén, subi-coje, fu-kua, ku (Barraza et al., 2015).

#### Botánica y ecología:

Enredadera dicotiledónea de la familia *Cucurbitaceae*, tiene hojas de 4 a 12 cm, delgadas, con 5 a 7 lóbulos. Las flores masculinas solitarias o agrupadas sobre un pedúnculo que hacia la mitad o en la base presenta brácteas ovadas y cordadas en la base; las flores femeninas solitarias. Fruto ovoide, con la superficie cubierta por verrugas o tubérculos, de color amarillo-oro, abriendo de manera explosiva. Las semillas elípticas, planas (Figuras 15 y 16).

Habita en climas tropicales y subtropicales, originaria del sureste de Asia se ha propagado por África y Sudamérica, distribuida en el estado de Veracruz en México (Barraza et al., 2015).



Figura 15: *Momordica charantia* L. (Tomado de garden&outdoor.com)



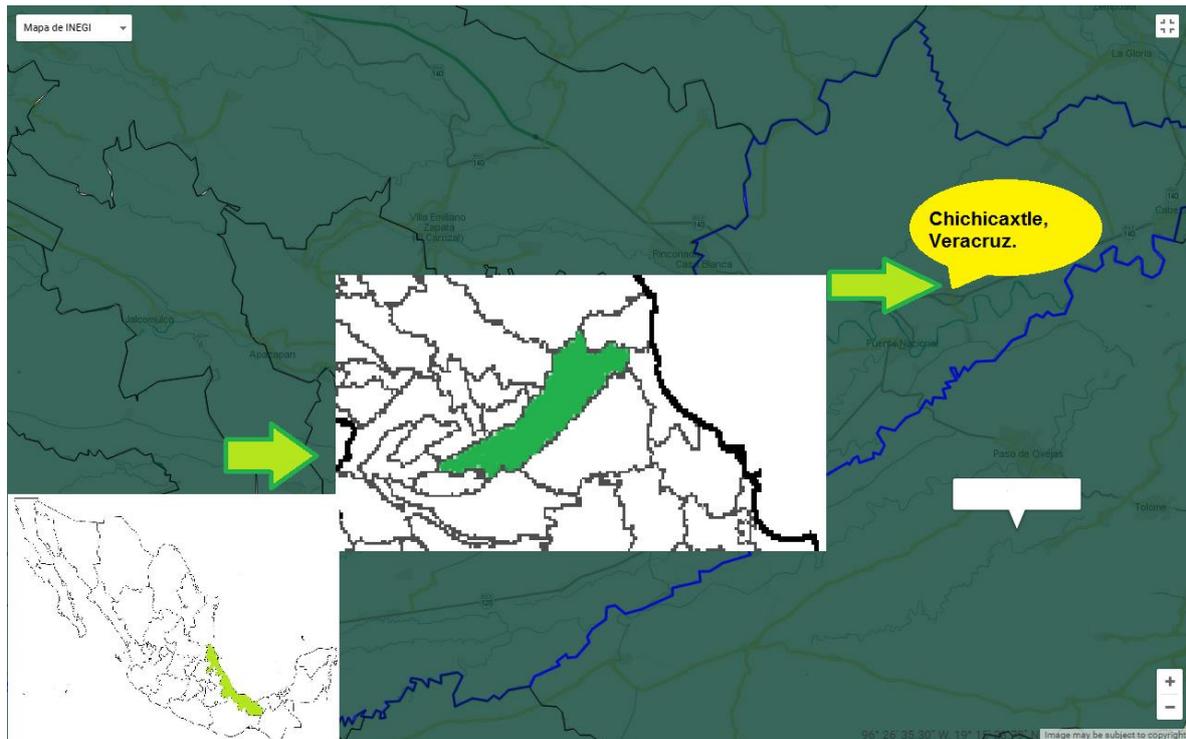
**Figura 16: *Momordica charantia* L.**

(Fotografía original, tomada por Kenneth Yael Ventura Avila)

### **Etnobotánica y antropología:**

En el estado de Veracruz es usada para aliviar infecciones estomacales, diarreas, también se utiliza como hipoglucemiante, antiinflamatorio y cicatrizante. Tradicionalmente se recolecta la planta y se deja secar, una vez seca, se preparan tés con las hojas, tallo y raíz de la planta. La pulpa del fruto es utilizada como dulce.

## Apéndice 2: Zona de colecta



**Figura 17. Localización del poblado de Chichicaxtle, Veracruz.**

La muestra de *M. charantia* se recolectó en la localidad de Chichicaxtle, en el municipio de Puente Nacional, que se localiza en la zona semiárida del centro del Estado de Veracruz (Figura 16), en las coordenadas 19° 20" latitud norte y 96° 29" longitud oeste, a una altura de 100 m.s.n.m.

### Clima

Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), el clima es de tipo Cwa o Cfa (basado en la clasificación climática de Köppen) el cual corresponde a un tipo cálido-subhúmedo con lluvias en verano. En 2013 se registró una temperatura promedio anual de 26.5° C; su precipitación media anual fue de 979.3 mm.

### Hidrografía

Se encuentra regado por el río Huitzilapan, de los Pescados o La Antigua y sus afluentes como el Santa María (Acevedo, 2014).

### **Edafología**

Su suelo es tipo vertisol, presenta anchas y profundas zanjas en época de sequía, son suelos duros y con tonalidades negras, grises o rojizas. Aproximadamente el 50% del suelo se utiliza en la agricultura (Acevedo, 2014).

### **Ecosistema**

Los ecosistemas que coexisten en el municipio son el de bosque bajo subtropical perennifolio con guarumbo, jonote, huanacaxtle sangrado y encino, donde se desarrolla una fauna compuesta por poblaciones de ardillas, conejos, tlacuaches y zorros (Acevedo, 2014).

### **Población**

En la localidad hay 945 hombres y 965 mujeres. La proporción mujeres/hombres es de 1.021, y el índice de fecundidad es de 2.40 hijos por mujer. Del total de la población, el 6.44% proviene de fuera del Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave. El 4.76% de la población es analfabeta (el 3.92% de los hombres y el 5.60% de las mujeres). El grado de escolaridad es del 7.81 (8.03 en hombres y 7.61 en mujeres).

El 0.47% de la población es indígena, y el 0.21% de los habitantes habla una lengua indígena. El 0.01% de la población habla una lengua indígena y no habla español.

El 33.40% de la población mayor de 12 años está ocupada laboralmente el 50.26% de los hombres y el 16.89% de las mujeres (Acevedo 2014).

### **Apéndice 3: Método de difusión en agar de Kirby-Baüer (CLSI, 2012; Cole, 1994; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; Beer y Sherwood, 1945)**

Esta técnica es utilizada para evaluar la actividad antibacteriana 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 de la cepa estudiada comienza y los compuestos se alejan del disco de acuerdo a un gradiente de dilución, de modo que a mayor distancia del disco, se tendrá una menor concentración del compuesto o extracto probado, 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 a la cepa.

#### **Medio**

Para el ensayo con bacterias se prepara el medio de cultivo Müller-Hinton, ya que es el medio ideal para promover el desarrollo de la mayoría de los aislamientos bacterianos de interés clínico.

El ensayo se realiza en cajas de Petri, donde el medio debe alcanzar un espesor uniforme de 4 mm; de ser más fino, los compuestos analizados tenderán a difundir más en dirección lateral, aumentando el tamaño de las zonas de inhibición; si es más grueso, el medio provoca que la disolución se precipite, disminuyendo en diámetro del halo de inhibición.

Una vez vertido el medio de cultivo, las cajas se dejan incubando durante 24 horas, esto con la finalidad de verificar la ausencia de contaminación en el agar.

#### **Preparación del inóculo**

##### **I. Bacteriano**

Con un asa de siembra estéril se tocan las superficies convexas de 4 o 5 colonias. Se sumerge el asa en 10 ml de caldo Müller-Hinton. Hay que enjuagar muy bien el asa para que el material bacteriano quede perfectamente disuelto en el caldo. Una vez hecho esto, se retira el asa y el tubo con el cultivo se incuba a 35°C durante un periodo

de 18 a 24 horas o hasta que alcance una turbidez equivalente al estándar No. 0.5 de MacFarland (absorbancia de 0.08 a 0.1 a 625 nm), el cual equivale a una concentración aproximada de  $1.5 \times 10^8$  UFC/ml.

### **III. Inóculo**

Se sumerge un hisopo de poliéster estéril y seco en la suspensión de la cepa con la que se vaya a trabajar; antes de retirarlo del tubo, se elimina el exceso de líquido rotando el hisopo contra las paredes internas del tubo.

Posteriormente, se inocula la superficie de la placa con el medio adecuado (Müller-Hinton), sembrando por medio de estría cerrada por lo menos en tres direcciones, girando  $60^\circ$  al momento de cambiar de dirección.

### **Preparación de sensidiscos**

Se utilizan sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos con papel Whatman del No. 5, en los cuales se aplica la sustancia a evaluar a una concentración de 2mg/sensidisco. Estos sensidiscos se preparan 24 horas antes del experimento, lo anterior es con la finalidad de que el solvente empleado para disolver el extracto se evapore totalmente.

### **Control negativo**

Se colocan en los sensidiscos destinados a tal fin 10  $\mu$ l del solvente utilizado para las muestras problema. Se preparan con 24 horas de anterioridad al experimento.

### **Control positivo**

Para cepas bacterianas, se utilizan sensidiscos impregnados con 25  $\mu$ g de cloranfenicol. Se preparan con 24 horas de anterioridad al experimento.

### **Prueba de susceptibilidad**

Los sensidiscos son colocados manualmente en la superficie del agar utilizando pinzas estériles. Se deben dejar a una distancia adecuada unos de otros y abarcando la totalidad de la placa.

Una vez preparadas todas las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en incubadora a 35°C sin mayor tensión de CO<sub>2</sub>, esto último, para evitar la acidificación del medio y la obtención de falsos positivos o negativos en la prueba.

## **Interpretación de resultados**

### **Bacterias**

En el caso de existir inhibición, se reporta el extracto o fracción como activa. Las zonas de inhibición se miden con una regla de calibración y en milímetros; la prueba debe hacerse mínimamente por triplicado y se reportan los promedios de los resultados por cepa utilizada.

### **Apéndice 4: Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1985; CLSI, 2012)**

Esta técnica se utiliza para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM).

### **Medio**

Esta técnica sigue el mismo principio que el método de macrodilución en agar, con la excepción de que la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determina en fase líquida, en una serie de microtubos moldeados en una caja plástica con 96 cavidades, denominada placa de ELISA. La placa se prepara colocando 50 µl de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260) con la concentración del extracto a probar en las concavidades apropiadas: 40,20, 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625 mg/ml.

### **Inóculo**

Se prepara una suspensión bacteriana inoculando una asada de la colonia en estudio en 10 ml de caldo Müller-Hinton (Bioxon 260). El tubo se incubará por 24 horas a una temperatura de 35°C, obteniendo una concentración aproximada de  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Posterior a esto, se realiza una nueva dilución para obtener una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/ml. Una vez realizado lo anterior, se colocan 50 µl de las suspensiones diluidas en cada uno de los pozos de la placa de ELISA.

## **Control negativo**

Se colocan 50 µl de caldo Müller-Hinton con el solvente empleado para disolver el extracto a analizar.

## **Testigo**

Se prepara colocando 50 µl de caldo Müller-Hinton en las concavidades y se agregan 50 µl de cultivo bacteriano.

## **Incubación**

Una vez que se tiene la placa con la carga bacteriana, se cubre con una tapa para evitar el desecamiento y se incuba a 35°C durante 24 horas.

## **Interpretación de los resultados**

Después del tiempo de incubación, se añade a cada concavidad 50 µl de una solución al 0.08% de sal de tetrazolio oxidada (TTC), para después incubarla durante 30 minutos.

El las concavidades donde haya habido desarrollo de organismos, el colorante será reducido a formazán, el cual produce una coloración rojiza-violácea en el fondo de la concavidad. De no haber desarrollo, la concavidad se mantendrá clara.

Nota: Es importante tener la placa protegida de la luz para evitar resultados falseados.

La concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es aquella en la que se presenta una disminución drástica del crecimiento bacteriano, en tanto que la Concentración Bactericida Mínima será en la que hay una inhibición completa del desarrollo de la cepa.

Esta prueba debe hacerse por triplicado a fin de que tenga resultados estadísticamente significativos.

## **Apéndice 5: Actividad sobre la curva de crecimiento bacteriano (Muroi et al., 1993)**

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

### **Medio de cultivo**

Se coloca agar Müller-Hinton en cajas septadas (3 divisiones). Es importante que el medio alcance un espesor uniforme de 4 mm.

### **Inóculo**

Se prepara una suspensión bacteriana con aproximadamente  $1 \times 10^8$  bacterias/ml en un tubo de ensayo con 10 ml de caldo Müller-Hinton (esta concentración bacteriana se obtiene en un periodo de 24 horas de incubación). Con ayuda de una micropipeta, se inoculan 0.1 ml de la suspensión de bacterias en los tubos que contienen los extractos a evaluar.

La concentración final será de  $1 \times 10^5$  bacterias/ml en cada tubo. Todos los tubos se incubarán a 35°C sin presión de CO<sub>2</sub>.

### **Tubos con extracto**

Se prepara en tubos con agar Müller-Hinton con las concentraciones de CMI, CBM, 2CBM y 4CBM.

Se muestrea cada hora durante los primeros cuatro tiempos: T<sub>0</sub>-0, T<sub>1</sub>-1, T<sub>2</sub>-2, T<sub>3</sub>-3, T<sub>4</sub> (Tiempo-horas transcurridas), después dos muestreos cada dos horas, uno a las 12 horas y otro a las 24 horas.

En cada tiempo se realizan diluciones en tubos con solución salina (1/100 y 1/10000) y se siembran en cajas de tres divisiones con agar Müller-Hinton, para determinar las unidades formadoras de colonias en cada tubo.

### **Testigo**

Se prepara un tubo sin extracto como testigo.

## **Incubación**

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 Log del número de sobrevivientes contra el tiempo para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la inactivación y se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

### **Apéndice 6: Conteo 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 amarillo y pH ácido, contiene molibdato y tungstato sódico que tienen la capacidad de reaccionar con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngsticos en óxidos, cromógenos de color azul intenso de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ), 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 estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a tres grupos hidroxilo (García, 2007).

### **Curva de calibración**

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

### **Preparación del extracto**

Se prepara una solución estándar (50 mg/ml) de la cual se toma una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  y se agregan 700  $\mu\text{l}$  de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 ml, posteriormente se adicionan 50  $\mu\text{l}$  de reactivo Folin-Ciocalteu.

Después de cinco minutos se añaden 150  $\mu\text{l}$  de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (200 g/l). La mezcla resultante se deja reposar durante dos horas, tiempo en el cual todos sus componentes reaccionan a temperatura ambiente, y se lee la absorbancia a 760 nm. Cada concentración se lee por triplicado.

Tubo	Ácido gálico (mg/ml)	Patrón (ácido gálico $\mu\text{l}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{l}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{l}$ )	Folin-Ciocalteu ( $\mu\text{l}$ )	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ ( $\mu\text{l}$ )
Blanco	-----	-----	-----	700	50	150
1	0.00625	3.125	96.88	700	50	150
2	0.0125	6.25	93.75	700	50	150
3	0.0250	12.5	87.5	700	50	150
4	0.05	25.0	75.0	700	50	150
5	0.1	50.0	50.0	700	50	150
6	0.2	100	0	700	50	150
Problema	-----	25	75.0	700	50	150
Problema	-----	50	50.0	700	50	150
Problema	-----	100	0	700	50	150

## Interpretación de resultados

Se grafica la concentración contra la absorbancia para obtener una curva patrón de ácido gálico. Para conocer la concentración de fenoles del extracto problema, se utiliza un análisis de regresión lineal, interpolando la absorbancia de las muestras evaluadas.

Los resultados se reportan como equivalentes de ácido gálico o en porcentaje.

### **Apéndice 7: Contenido de flavonoides totales Método Dowd (Ramamoorthy y Bono, 2007)**

Este método se basa en el viraje de color de una solución de  $AlCl_3$  a color amarillo 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 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 pesan 3 mg de quercetina, los cuales se disuelven en 3 ml de MeOH grado HPLC.

#### **Curva patrón**

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

Nota: Para las primeras concentraciones (de 1 a 5 ppm), hacer lo siguiente:

Del stock de quercetina tomar 20  $\mu$ l y agregar 180  $\mu$ l de MeOH, teniendo un volumen final de 200  $\mu$ l. De este nuevo stock, se toma:

[ ] ppm	$\mu$ l stock de quercetina	$\mu$ l de MeOH	$AlCl_3$ al 2% ml
---------	-----------------------------	-----------------	----------------------

1	10	990	1
2	20	980	1
3	30	970	1
4	40	960	1
5	50	950	1

Del stock de quercetina (3mg en 3 ml de MeOH) tomar:

[ ] ppm	$\mu$ l stock de quercetina	$\mu$ l de MeOH	AlCl <sub>3</sub> al 2% ml
6	6	994	1
7	7	993	1
8	8	992	1
9	9	991	1
10	10	990	1
20	20	980	1
30	30	970	1
40	40	960	1

50	50	950	1
60	60	940	1
70	70	930	1
80	80	920	1
90	90	910	1
100	100	900	1

### **Stock del extracto**

Se pesan 27mg del extracto de la planta y se disuelven en 1 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 vierten 200  $\mu$ l de las soluciones preparadas para la curva patrón, el problema, el blanco y el control negativo en una placa de ELISA, por triplicado.

Después de 10 minutos de reacción a temperatura ambiente se determina la absorbancia a 450 nm.

### **Interpretación de resultados**

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

Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de extracto.

### **Apéndice 8: Detección cualitativa de alcaloides**

Las dos técnicas de detección cualitativa de alcaloides se basan en la capacidad de los alcaloides para combinarse con yodo y metales pesados como el bismuto, mercurio y tungsteno, formando precipitados visibles. Estos ensayos preliminares se pueden realizar en campo o laboratorio.

#### **I. Dragendorff**

Es una de las técnicas más utilizadas para la detección de alcaloides. Se utiliza el reactivo de Dragendorff.

Primero, se disuelve la muestra problema con ácido clorhídrico al 5% para posteriormente filtrar y agregar el reactivo de Dragendorff (que es tetrayodo bismuto de potasio). En caso de formarse un precipitado rojo-naranja, se confirma la presencia de alcaloides en la muestra.

#### **II. Mayer**

Esta técnica también es muy usada para la detección de alcaloides y se puede utilizar para confirmar los resultados obtenidos con el reactivo de Dragendorff.

Se realiza exactamente el mismo procedimiento que en la técnica de Dragendorff, solo que agregando el reactivo de Mayer, que se compone de cloruro de mercurio y potasio. En este caso, la prueba se declara positiva si se obtiene un precipitado de color blanco o amarillo claro.

### **Apéndice 9: Cuantificación de Alcaloides (Shamsa et al., 2008)**

Se recomienda utilizar esta técnica en caso de detectar alcaloides en la muestra con la que se está trabajando.

Se basa, por un lado, en la reacción del verde de bromocresol, el colorante utilizado dentro de la técnica, para estabilizarse al momento de encontrarse en un medio ácido (entre 4 y 5 en la escala de pH). Cuando se encuentra en un medio de esa naturaleza, se torna azul al desprotonarse, se vuelve amarillo en el momento en que cae en un medio ácido. Por otro lado, la precipitación de los alcaloides en medios ácidos es muy importante, debido a que en el momento en que se encuentran en un medio ácido, tienden a precipitarse (este es el mismo fundamento que las técnicas de detección cualitativa). Dentro de esta técnica, ambos principios se unen, ya que a la hora de hacer lavados con cloroformo, este solvente es capaz de arrastrar los alcaloides acidificados, coloreados con el verde de bromocresol que, al caer en un medio ácido (es decir, el cloroformo con los alcaloides) se torna amarillento, siendo esto lo que se mide por espectrofotometría.

## **Preparación de reactivos**

### **I. Verde de bromocresol**

Se pesan 69.8 mg de verde de bromocresol, los cuales se disuelven en 3 ml de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2 N. Una vez disuelto el colorante, se añaden otros 5 ml de agua destilada.

Es necesario calentar un poco la mezcla con la finalidad de disolver bien el verde de bromocresol. Una vez disuelto perfectamente, se afora a un litro añadiendo agua destilada.

### **II. Buffer de fosfato (pH 4.7)**

Para el buffer se requiere una solución 2 M de fosfato de sodio, la cual se prepara pesando 21.6 gramos de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y se disuelven en un litro de agua destilada.

Para ajustar el pH a 4.7 se utiliza una solución de ácido cítrico en las proporciones de 42.02 g para un litro de solución. Con ayuda de un potenciómetro, se ajusta el pH de la solución hasta llegar a 4.7

Nota: En caso de observarse poca variación al añadir gotas de ácido cítrico, preparar una nueva solución más concentrada.

### III. Estándar de atropina

Para realizar la curva patrón, se hace un stock de atropina en una concentración de 100 µg/ml de agua destilada.

### IV. Stock del problema

En el caso del problema, se prepara un stock con la concentración de 2 mg/ml de agua destilada.

### V. Preparación de la curva

Una vez que se han preparado los stocks de atropina y del problema, se procede a colocar en tubos de ensayo las siguientes cantidades:

ml de stock de atropina (100 µg/ml)	Atropina (mg)	Buffer fosfato (4.7 pH) ml	Verde de bromocresol ml
0.2	0.02	2.5	2.5
0.3	0.03	2.5	2.5
0.4	0.04	2.5	2.5
0.5	0.05	2.5	2.5
0.6	0.06	2.5	2.5
0.8	0.08	2.5	2.5
1.0	0.1	2.5	2.5

En el caso del problema, se toma una alícuota de 1.2 ml, que llevará una concentración de 2.5 mg del extracto.

#### **\*Lavados de cloroformo**

Para obtener los alcaloides a medir, es necesario realizar lavados con cloroformo. Para este efecto, se añaden secuencialmente 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 ml de cloroformo. Con ayuda de un agitador automático, se mezcla perfectamente bien en cada lavado; el uso del agitador es necesario para asegurarse de que el cloroformo arrastre la mayor cantidad posible de alcaloides de la muestra. Una vez agitado, en el fondo del tubo se formará un precipitado amarillento, el cual debe recogerse con una pipeta Pasteur y trasladarse a otro tubo.

Nota: De preferencia, comenzar a recoger el precipitado después del segundo lavado.

#### **VI. obtención e interpretación de resultados**

Una vez obtenidos los lavados de cloroformo de las concentraciones de la curva patrón y del problema, se leen en un espectrofotómetro a 470 nm.

Para interpolar la muestra problema, se realiza un análisis de regresión lineal y se reporta como miligramos equivalentes de atropina por gramo de extracto.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Abalaka, M.E., Olonitola, O.S., Onaolapo, J.A., Inabo, H. 2011. Investigation on the bioeffects of ethanol extracts of leaf and stem of *Momordica charantia* on clinical straining of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.
- Acevedo, G., 2014. Geografía y estadística, Puente Nacional, Chichicaxtle. Febrero 2018, de INEGI Sitio web: <http://www.beta.inegi.org.mx/rde/>
- Andrews, M.J. 2001. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 48(1), 5-16.
- Bai, J., Dong, Y., Zhu, Y., 2016a. Response of gut microbiota and inflammatory status to bitter melon (*Momordica charantia* L.) in high fat diet induced obese rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 194, 717-726.

- Bai, J., Dong, Y., Xiao, X., Zhang, Y., Zhu, Y., 2016b. Effects of bitter melon (*Momordica charantia* L.) on the gut microbiota in high fat diet and low dose streptozocin-induced rats. Tesis de maestría. Escuela de Alimentos e Ingeniería Biológica, Universidad de Jiangsu, Zhenjiang, República Popular China.
- Barraza, A. F. V., Benavides, B. O. E., Tamayo, A. Y., 2015. Análisis de crecimiento del cultivo de balsamina *Momordica charantia* L. en semillero. *Revista de Ciencias Agrícolas*. 32 (1), 24 - 37.
- Beer, E., Sherwood, M., 1945. The paper-disc agar-plate method for assay of antibiotic substances. *The welcome research laboratories*. 459-467
- Beyra, A., León, M. C., Iglesias, E., Ferrándiz, D., Herrera, R., Volpato, G., Godínez, D., Guimaraes, M., Álvarez, R., 2004. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 61(2), 185-203.
- Braca, A., Siciliano, T., D'Arrigo, M., Germano, M.P. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of *Momordica charantia* seed essential oil. *Fitoterapia*. 79, 123-125.
- CLSI. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests Approved Standard. *CLSI*. Eleventh Edition. 29 (1), 1-76.
- Cole, M., 1994. Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays-a critical review. *Biochemical Systematic and Ecology*. 22(8), 837-856.
- Domínguez, X.A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. *Ed. Limusa*, México. 281 pp.
- FHIA (Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, HN). 2010. Evaluación del efecto de diferentes tutorados en el cultivo de cundeamor chino (*Momordica charantia* L.). Comayagua, Honduras. No.15. 4p. doi: [http://www.fhia.org.hn/downloads/hortalizas\\_pdfs/hoja\\_tecnica\\_No\\_15.pdf](http://www.fhia.org.hn/downloads/hortalizas_pdfs/hoja_tecnica_No_15.pdf)
- García, M. 2007. Cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos naturales. Recuperado el 10 de marzo de 2023 de: [http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56\\_1UAQGarciaNava.pdf](http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/56_1UAQGarciaNava.pdf).
- Ghaffar, F., Kainat, B., Ullah, S.H., Ur, R.I. 2017. DPPH Radical Scavenging Assay, Biological Activities, Nutritional Composition and Quality Parameters of

Momordica charantia Seeds Grown in District Charsadda, KPK, Pakistan. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*. 60(2).

- Gill, A. O., Holley, R. A. 2006. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. *International Journal of Food Microbiology*. 111,170–174.
- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M.A., Ponce-Pardo, J., Zarzosa-Norabuena, E. 2015. Evaluación de la técnica 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, 15 (1), 57-60.
- Gutiérrez, A., Ortiz, G., Mendoza, C. 2008. Medición de fenoles y actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. 1-5.
- Harinantenaina, L., Tanaka, M., Takaoka, S., Oda, M., Mogami, O., Uchida, M., Akasawa, Y., 2006. *Momordica charantia* constituents and antidiabetic screening of the isolated major compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54, 1017–1021. doi:10.1248/cpb.54.1017
- Hersch-Martínez, P., 1999. El juego de la pelota en Teotihuacan. *Arqueología Mexicana*. 7 (39), 60-65.
- Horax, R., Hettiarachchy, N., Islam, S. 2006. Total Phenolic Contents and Phenolic Acid Constituents in 4 Varieties of Bitter Melons (*Momordica charantia*) and Antioxidant Activities of their Extracts. *Journal of food science*. 70(4), 275–280. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb07173.x>
- Kalita, P., Barman, T., Pal, T. and 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.
- Lagarto, A., Couret, M., Guerra I., López R. 2008. Toxicidad aguda oral y ensayos de irritación de extractos acuoso e hidroalcohólico de *Momordica charantia* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 13(3).
- Lu, Y.L., Liu, Y.H., Liang,W.L., Chuang, J.H., Cheng, K.T., Liang, H.J. 2011. Antibacterial and cytotoxic activities of different wild bitter gourd cultivars (*Momordica charantia* L. var. abbreviata seringe). *Bot. Stud.* 52, 427–434.

- Maddox, C., Laur, L., Tian, L. 2010. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xilleya fastidiosa*. *Curr Microbiol.* 60, 53-58
- Mituiassu, L.M.P., Serdeiro, M.T., Vieira, R.R.B.T., Oliveira, L.S., Maleck, M. 2021. *Momordica charantia* L. extracts against *Aedes aegypti* larvae. *Brazilian journal of biology.* 26;82:e236498. doi: [10.1590/1519-6984.236498](https://doi.org/10.1590/1519-6984.236498)
- Muroi, M., Shiragami, N., Nagao, K., Yamasaki, M. Takatsuki, A. 1993. Folimycin (concanamycin A), a specific inhibitor of VATPase, blocks intrecellular translocation of the glycoprotein of vesicular stomatitis virus before arrival to the Golgi apparatus. *Cell Structure and Function.* 18, 139–149.
- Nahid, A., Ahmed, C., Hossen, F, Hussain, S., Hossain, T., 2017. Characterization of phytoconstituents and evaluation of antimicrobial activity of silver extract nanoparticles synthesized from *Momordica charantia* fruit extract. *Complementary and Alternative Medicine.* 17, 336.
- Nobre, C.P., Nervo, R.F., Moura, T.F., 2005 Standardization of extracts from *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) by total flavonoids content determination. *Acta farmacéutica Bonaerense.* 24 (4): 562-6
- Organización Mundial de la Salud., 2023. La OMS convoca la primera cumbre mundial de alto nivel sobre medicina tradicional para examinar los datos disponibles e impulsar la atención de salud para todos: *Medicina tradicional*. Web World Health Organization. Recuperado el 1 de Noviembre de 2023 de: <https://www.who.int/standards/classifications/frequently-asked-questions/traditional-medicine>.
- Pascual-Casamayor, D., Pérez-Campos, Y.E., Morales-Guerrero, I., Castellanos-Coloma, I., González-Heredia, E., 2014. Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. *MEDISAN.* 18(10), 1467–74.
- Rakholiya, K., Vaghela, P., Rathod, T., Chanda, S. 2014. Comparative Study of Hydroalcoholic Extracts of *Momordica charantia* L. against Foodborne Pathogens. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences.*76(2) 148-156
- Ramamoorthy, P., 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.

- Santos, K., Matias, E., Sobral, C., Tintino, S., Morais, M., Guedes, G., Santos, F., Sousa, A., Rolón, M., Vega, C., Rojas, A., Costa, J., Menezes, I., Coutinho, H. 2012. Trypanocide, cytotoxic, and antifungal activities of *Momordica charantia*. *Pharmaceutical Biology*, 50 (2), 162-166.
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., Verdian-rizi, M., 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Journal Pharmaceutical Sciences*. 32, 17-20.
- Shan, B.; Xie, J.H.; Zhu, J.H.; Peng, Y. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidant activity. *Food Bioprod. Process*. 2012, 90, 579–587
- Shuo, J., Mingyue, S., Fan, Z., Jianhua, X., 2017. Recent Advances in *Momordica charantia*: Functional Components and Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (12), doi: 10.3390/ijms18122555
- Singleton, V., 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.
- Svobodova, B., Barros, L., Calhella, C.R., Heleno, S., Alves, M.J., Walcott, S., Bittova, M., Kuban, V., Ferreira, I., 2016. Bioactive properties and phenolic profile of *Momordica charantia* medicinal plant growing wild in Trinidad and Tobago. *Industrial crops and products*. 95, 365-373.
- Universidad Autónoma de Chapingo(UACh). 2017. En México, el consumo per cápita de plantas medicinales es de 500 gramos anuales. Página ciudadana. Recuperado el 4 de abril de 2023, de: <https://paginaciudadana.com/consumo-anual-de-500-gramos-de-plantas-medicinales>
- Vanden-Berghe, D. A., Vlietinck, A. J., 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. *Methods in plant biochemistry*. 6, 47-71.
- White, L.B., Foster, S., Staff, .H., 2004. Las mejores alternativas naturales a los medicamentos. *El Recetario Herbario*. 672 pp.
- Xie, J.; Zhang, J. 2010. Study on Antioxidant Activity in Vitro of Different Polysaccharides from *Momordica charantia*. *Guangzhou Chem. Ind*. 5.