



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Escuela Superior de Medicina

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de
Cyrtocarpa procera Kunth.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

KARLA STEPHANIE MARTÍNEZ ELIZALDE

DIRECTORES DE TESIS:

DR. SAÚL ROJAS HERNÁNDEZ

DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

MÉXICO, DF. 2011.





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 19 del mes de septiembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis titulada:

“Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocarpa procera* Kunth”

Presentada por el alumno:

Martínez

Apellido paterno

Elizalde

Apellido materno

Karla Stephanie

Nombre(s)

Con registro:

A	1	0	0	6	4	6
---	---	---	---	---	---	---

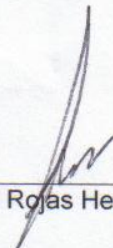
aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

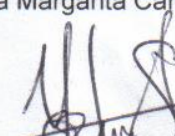
LA COMISIÓN REVISORA

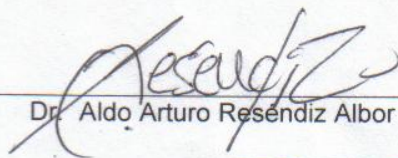
Directores de tesis


Dr. Saúl Rojas Hernández


Dra. María Margarita Canales Martínez

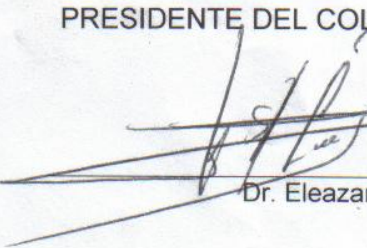

Dr. Rafael Campos Rodríguez


Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy


Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor


Dr. Pedro López Sánchez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Eleazar Lara Padilla



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
CONTROL ESCOLAR



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 19 del mes septiembre del año 2011, el que suscribe Martínez Elizalde Karla Stephanie alumna del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro A100646 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Saúl Rojas Hernández, Dra. María Margarita Canales Martínez y cede los derechos del trabajo intitulado “Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocarpa procera* Kunth”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección karmareli_17@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Karla Stephanie Martínez Elizalde

Nombre y firma

AGRADECIMIENTOS

A la Maestría en Ciencias de la Salud, Instituto Politécnico Nacional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A los apoyos recibidos por:

- CONACyT, con número (CVU/Becario): 288498/ 48642
- COFAA PIFI 2011
- Al proyecto por parte de KEW, Royal Botanic Gardens: Plantas útiles de San Rafael, Coxcatlán (MGU/Useful Plants Project Mexico).
- UNAM PAPIIT IN218511

Al Comité Tutorial:

Dr. Rafael Campos Rodríguez

Dr. Marco Aurelio Rodríguez

Monroy

Dr. Pedro López Sánchez

Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de Tesis, Dr. Saúl Rojas Hernández y Dra. Ma. Margarita Canales Martínez, por haberme guiado en la realización de este trabajo, por su apoyo y los conocimientos que me transmitieron.

A los miembros del comité tutorial:

Dr. Rafael Campos Rodríguez, por los comentarios y sugerencias realizadas durante la realización de este trabajo.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, por enriquecer este trabajo con sus observaciones y sugerencias, además de la ayuda otorgada en la realización de algunos experimentos; por el cariño y confianza que siempre me brindó.

Dr. Pedro López Sánchez, por sus atinadas observaciones en el proyecto y por compartir conmigo sus valiosos conocimientos.

Dr. Aldo Arturo Reséndiz Albor, por sus consejos y observaciones que ayudaron a concluir este trabajo.

También quiero agradecer al Dr. Alberto Parra y la Dra. Gisela por las facilidades otorgadas en la ejecución de algunos experimentos.

De la FES Iztacala, quiero agradecer:

A la Dra. Tzasná Hernández Delgado, por los consejos, apoyo, amistad y cariño que siempre me brindó en el laboratorio de Farmacognosia.

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

Al M. en C. Ángel Durán Díaz, por su ayuda en el análisis estadístico.

Al módulo de Metodología Científica II y III, por el apoyo con algunos reactivos y préstamo de equipo.

A mis Padres y Hermano: por todo

su apoyo y amor incondicional

Los Amo

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biología y Prototipos (UBIPPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Y en el laboratorio de Inmunobiología Molecular de la Escuela Superior de Medicina, IPN.

Índice

Índice de Figuras	i
Índice de Cuadros	ii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
ANTECEDENTES	6
PROBLEMA.....	7
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL.....	8
Objetivos particulares.	8
MÉTODOS.....	9
Colecta del material	9
ESTUDIO BROMATOLÓGICO.....	9
Cuantificación de Carbohidratos por la técnica de Nelson-Somogy.....	9
Determinación de Carbohidratos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	9
Cuantificación de Proteínas por el método de Bradford.	10
Cuantificación de Lípidos por la técnica de Soxhlet.....	10
Determinación de Lípidos por Cromatografía de Gases acoplado a espectrometría de masas.	10
Determinación del ácido Ascórbico (Vitamina C).....	11
Obtención de los extractos	11
PRUEBAS BIOLÓGICAS.....	12
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	12
Evaluación cualitativa.....	13
Evaluación cuantitativa	13

Efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriana.	13
Actividad antioxidante.	13
Citotoxicidad.	14
RESULTADOS	15
Colecta de la planta.....	15
Estudio Bromatológico.....	15
Determinación de Carbohidratos.....	17
Determinación de Lípidos.....	18
Determinación de Vitamina C y Actividad Antioxidante.....	19
Rendimiento del extracto.....	19
Figura 4: Rendimiento de los extractos del fruto de <i>C. procera</i>	20
Actividad antibacteriana.....	21
Evaluación Cualitativa.....	21
Evaluación cuantitativa.....	23
Actividad del extracto M1y M2 sobre la curva de crecimiento bacteriano.....	24
Citotoxicidad de los extractos del fruto de <i>C. procera</i>	27
Análisis químico de los extractos del fruto de <i>C. procera</i>	28
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	35
PERSPECTIVAS	36
APÉNDICES	36
APÉNDICE 1	36
Descripción botánica de la planta estudiada.....	36
APÉNDICE 2:	39
Zona de colecta.....	39
APÉNDICE 3	43

Cuantificación de carbohidratos	43
APÉNDICE 4	45
Determinación de Carbohidratos por cromatografía de alta resolución (HPLC)	45
APÉNDICE 5	45
Cuantificación de Proteínas por el método de Bradford.	45
APÉNDICE 6	46
Determinación del ácido Ascórbico (Vitamina C).....	46
APÉNDICE 7	47
Método de difusión en agar de Kirby-Bauer	47
APÉNDICE 8	50
Microtécnica de dilución en caldo	50
APÉNDICE 9	51
Efecto del extracto sobre la curva de crecimiento bacteriano	51
APÉNDICE 10	53
Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)	53
APÉNDICE 11	54
Citotoxicidad	54
REFERENCIAS	56

Índice de Figuras

Figura 1: Cromatograma de la composición de carbohidratos del fruto de <i>C. procera</i>	17
Figura 2: Cromatograma del contenido de lípidos del fruto de <i>C. procera</i>	18
Figura 3: Actividad Antioxidante media del extracto M1, M2 y Hexánico del fruto de <i>C. procera</i>	19
Figura 4: Rendimiento de los extractos del fruto de <i>C. procera</i>	20
Figura 5: Halos de Inhibición del extracto M1 y M2 del fruto de <i>C. procera</i>	22
Figura 6: Actividad del extracto M1 sobre la curva de crecimiento de <i>S.aureus</i> ATCC 29213.....	25
Figura 7: Actividad del extracto M1 sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> Tor.....	25
Figura 8: Actividad del extracto M2 sobre la curva de crecimiento de <i>S.aureus</i> ATCC 29213.....	26
Figura 9: Actividad del extracto M2 sobre la curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> Tor.....	26
Figura 10: Determinación de la CL ₅₀ los extractos del fruto de <i>C. procera</i>	27
Figura 11: Cromatograma del extracto M2 del fruto de <i>C. procera</i>	28
Figura 12: Cromatograma del extracto Hexánico del fruto de <i>C. procera</i>	29
Figura 13: <i>Cyrtocarpa procera</i>	37
Figura 14: Mapa de la distribución geográfica de <i>Cyrtocarpa procera</i>	38
Figura 15: Fruto maduro de <i>C. procera</i>	39
Figura 16: Ubicación geográfica del poblado de San Rafael.....	40

Índice de Cuadros

Cuadro 1: Cepas bacterianas utilizadas.....	12
Cuadro 2: Datos etnobotánicos de la especie	15
Cuadro 3: Evaluación Bromatológica del fruto de <i>C. procera</i>	15
Cuadro 4: Rendimiento de los extractos del fruto de <i>C. procera</i>	20
Cuadro 5: Actividad antibacteriana del extracto metanólico crudo (M1) y metanólico libre de compuestos no polares (M2) del fruto de <i>C. procera</i>	22
Cuadro 6: Determinación de CMI y CBM de los extractos M1 y M2 del fruto de <i>C. procera</i> en mg/mL.	24
Cuadro 7: Determinación de la dosis letal media (DL ₅₀) de los extractos del fruto de <i>C. procera</i>	27
Cuadro 8: Compuestos del extracto M2 y Hexánico	28

RESUMEN

Los nutraceuticos se definen como aquellos alimentos que además de su contenido nutrimental, aportan beneficios a la salud, al contener sustancias que desempeñan una acción específica en las funciones fisiológicas del organismo. Estas sustancias pueden ser antioxidantes, compuestos fenólicos, fitoesteroles, ácidos grasos, o probióticos, que han sido utilizados por el hombre para aliviar diversos padecimientos como enfermedades respiratorias, para sanar heridas, como anti-inflamatorios, para tratar enfermedades intestinales entre otras. En nuestro país las enfermedades infecciosas intestinales ocupan una alta morbilidad, la gran mayoría de estas infecciones están dadas por bacterias Gram negativas, las cuales son un gran problema de salud debido a que han surgido cepas resistentes por el mal uso de fármacos, por lo que en la actualidad se tratan de sintetizar nuevos fármacos que a la larga causan daño a los seres humanos, por este motivo se han buscado alternativas en el uso de los productos naturales, una especie utilizada es la del fruto de *C. procera*, conocida mejor como Chupandilla, que además de ser utilizado como un alimento se le atribuye actividad antidiarréica.

Por lo anterior en el presente trabajo se determinaron las propiedades nutraceuticas del fruto de *C. procera*.

El fruto se colectó en la localidad de San Rafael, Coxcatlán (Puebla), se realizó el estudio bromatológico (cuantificación de carbohidratos por el método de Nelson-Somogy, lípidos por el método de Soxhlet, proteínas por el método de Bradford y Vitamina C, (por el método de Titulación) del fruto fresco para evaluar sus propiedades nutrimentales. Posteriormente se obtuvo el extracto Metanólico (M1) del fruto seco de *C. procera* por el método de maceración. Se determinó por el método de difusión de Kirby-Baüer la actividad antibacteriana de forma cualitativa, y de forma cuantitativa por el método de microdilución en caldo. Se

Propiedades Nutraceuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

determinó la actividad bactericida o bacteriostática del fruto de la Chupandilla y la citotoxicidad por el método de viabilidad con cristal violeta.

La concentración de carbohidratos, lípidos y proteínas fue de 29, 1, 0.83% respectivamente, y de vitamina C fue de 0.44%, estos resultados están dentro de los parámetros marcados para todos los frutos en general. Los carbohidratos que están presentes en el fruto son glucosa, sacarosa y fructosa. Los lípidos contenidos en el fruto son Vitamina E, escualeno, campesterol, ácido oleico y palmítico. El extracto metanólico crudo (M1) y libre de compuestos no polares (M2) presentaron actividad antibacteriana, siendo el extracto M2 el más activo. Las cepas más sensibles a M2 fueron *V. cholerae* Tor y *S. aureus* ATCC 29213, los valores de CMI y CBM van de 2 a 10 mg/mL. El extracto M1 y M2 son bacteriostáticos, la dosis letal media (CL₅₀) tanto de M1 como M2 es de 14.86 y 22.03 µg/mL, la actividad antioxidante fue de 48.9 y 50 µg/mL respectivamente.

ABSTRACT

Nutraceuticals are defined as those foods in addition to nutrient content; provide health benefits, containing substances that perform a specific action on the body's physiological functions. These substances can be antioxidants, phenolic compounds, phytosterols, fatty acids, or probiotics, which have been used by man to relieve various ailments such as respiratory diseases, wound healing, anti-inflammatories to treat intestinal diseases among others. In our country, intestinal infectious diseases occupy a high morbidity, the vast majority of these infections are given by Gram-negative bacteria, which are a major health problem because resistant strains have arisen by misuse of drugs, so is now trying to synthesize new drugs that will eventually cause harm to humans, which is why alternatives have been sought in the use of natural products, a species used is the fruit of *C. procera*, better known as Chupandilla, besides being used as a food Antidiarrheal activity is attributed.

Therefore in this study was to determine the nutraceutical properties of the fruit of *C. procera*.

The fruit was collected in the town of San Rafael, Coxcatlán (Puebla), the study was conducted bromatological (quantification of carbohydrates by the Nelson-Somogy method, lipids by Soxhlet method, protein by the Bradford method and Vitamin C, (by titration) of fresh fruit to assess their nutritional properties. then obtained methanol extract (M1) of the dried fruit of *C. procera* by the method of maceration. determined by the diffusion method of Kirby-Bauer antibacterial activity qualitatively and quantitatively by the broth microdilution method. We determined the bactericidal or bacteriostatic activity of the fruit of Chupandilla and cytotoxicity by the method of viability with crystal violet.

The concentration of carbohydrates, lipids and proteins was 29, 1, 0.83%, respectively, and vitamin C was 0.44%, these results are within the parameters set for all the fruits in general. The carbohydrates that are present in the fruit are glucose, sucrose and fructose. The lipid content in the fruit is Vitamin E, squalene, campesterol, oleic acid and palmitic acid. The crude methanol extract (M1) and free of non-polar compounds (M2) showed antibacterial activity, the extract being the most active M2. The strains were sensitive to M2 *V. cholerae* Tor, *S. aureus* ATCC 29213, the MIC and MBC values ranging from 2 to 10 mg / mL. M1 and M2 extract are bacteriostatic, the median lethal dose (LC50) M1 and M2 both 14.86 and 22.03 is ug / mL, the antioxidant activity was 48.9 and 50 mg / mL respectively.

Propiedades Nutraceuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

INTRODUCCIÓN

Un producto nutraceutico se define como aquel alimento que además de su contenido nutrimental, aporta beneficios a la salud, al contener sustancias que desempeñan una acción específica en las funciones fisiológicas del organismo (Birute et al., 2009).

La demanda de este tipo de alimentación ha crecido espectacularmente en países asiáticos desde finales del siglo XX y en fechas recientes, su uso se ha extendido rápidamente a países de Europa, África y América (Ramírez, 2009).

El descubrimiento de la actividad biológica de los nutraceuticos parte de una base etnomédica, de aquí la importancia de la etnobotánica dentro del estudio de la nutrición y la alimentación, ya que ayuda a identificar alimentos funcionales como frutas, verduras, especias, y/o plantas medicinales con potenciales efectos terapéuticos que en ocasiones se utilizan como alimento o condimento en la preparación de platillos y/ o remedios herbolarios (Bermúdez y Velásquez, 2002).

El uso de algunas especies de plantas en la medicina tradicional le ha proporcionado al hombre diversos beneficios entre ellos le ha servido para aliviar diferentes padecimientos, pues en nuestro país las infecciones bacterianas son uno de los principales problemas de la salud y el surgimiento de bacterias resistentes a antibióticos ha complicado el panorama. Lo anterior ha incentivado el desarrollo de nuevos antimicrobianos. Esto aunado al interés (en décadas recientes) en la medicina tradicional como alternativa terapéutica, ha originado que la búsqueda de compuestos antibacterianos en plantas medicinales se haga más intensa (Cáceres et al. 1993; Rabe y Van Staden, 1997; Feresin et al., 2000).

Actualmente la investigación y desarrollo de nuevos alimentos funcionales se basa en el estudio de probióticos y grupos de sustancias químicas presentes en alimentos de origen vegetal como flavonoides, terpenos, carotenoides, fitoestrógenos, betaglucanos, ácidos grasos omega n-6 y n-3, entre las principales; con la finalidad de demostrar su actividad biológica y potencial efecto benéfico para la salud. Entre los reportes de actividad biológica descritos en la literatura

para estos alimentos, destacan principalmente su acción antidiarréica, antioxidante, hipoglucemiante, hipocolesterolemiante, antitumoral e inmunomoduladora. En este contexto, los estudios científicos que demuestran la eficacia biológica de los componentes activos presentes en los nutracéuticos, han contribuido de manera importante al aumento de la aceptación y uso a nivel mundial de estos alimentos con fines dietéticos y terapéuticos (Ramírez, 2009).

En México, el uso de alimentos tradicionales como el frijol, maíz, nopal, amaranto, tomate, jamaica, chile, etc, pueden actuar como quimiopreventivos en el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como diabetes, hipertensión e hipercolesterolemias, cáncer, así como antidiarreicos, por lo que pueden ser considerados como nutraceúticos (Pijoan, 2003).

De acuerdo con el Boletín Mexicano de Epidemiología de México, en el 2010 se reportaron 3 648 494 casos de infecciones intestinales, que podrían ser causadas por bacterias Gram negativas, siendo Puebla, Veracruz, el DF y el estado de México los estados de la República Mexicana más vulnerables ante esta problemática (Boletín de Epidemiología 2010).

Dentro de la Medicina tradicional, un caso en particular es el fruto del árbol *C. procera* (Chupandilla) (Apéndice 1) que se utiliza para aliviar la diarrea (Argueta y Cano, 1994) que es una enfermedad de posible origen infeccioso, por lo que la pregunta planteada en el presente proyecto es determinar si la composición química del fruto tiene actividad biológica y mediante la cuantificación de vitamina C y el estudio bromatológico poder catalogarlo como un nutracéutico.

Propiedades Nutraceuticas del Fruto de *Cyrtocarpa procera* Kunth

ANTECEDENTES

En las revisiones de la literatura taxonómica y etnobotánica, la especie *Cyrtocarpa procera* (Chupandilla) cuenta con muy pocos registros sobre su uso medicinal y de sus propiedades nutrimentales. Sin embargo de algunas especies de la familia Anacardiaceae, a la cual pertenece *C. procera*, se tienen los siguientes estudios:

Ojewole, 2005, examinó la actividad antiinflamatoria, analgésica y antidiabética del extracto acuoso de la corteza y tallo de *Mangifera indica* Linn. Ésta especie presentó actividad significativa, los diferentes componentes químicos de la planta, son especialmente polifenoles, flavonoides, triterpenoides, mangiferina, y otros compuestos químicos presentes en la planta que participan en la actividad antiinflamatoria, analgésica y efecto hipoglucemiante.

Maiga et al., 2006, evaluaron la actividad antioxidante de diversas plantas, entre ellas *Lannea velutin*, encontrando que la raíz, corteza y tallo son ricos en antioxidantes.

En particular de la corteza de *C. procera* se tienen los siguientes estudios:

Canales et al., 2005 y 2006, realizaron un estudio sobre el conocimiento tradicional de la flora medicinal de San Rafael, en el municipio de Coxcatlán, Puebla, encontrando que la corteza de *C. procera* se utiliza como té para aliviar dolor de riñones aunado a lo anterior demostraron que la corteza de *C. procera* fue activa sobre 6 cepas bacterianas.

Rodríguez-López et al., 2006, obtuvieron el extracto de la corteza de *C. procera* con hexano seguido de diclorometano y acetona, estos extractos fueron evaluados para determinar su toxicidad sobre *Artemia salina*. Todos los extractos mostraron una actividad significativa y el fraccionamiento de estos extractos condujo al aislamiento de β - sitosterol, la identificación de varios compuestos como el 1,3-propil-dipentadecanoato, 3-hydroxipropil-9-octadecanoato, pentadecilbenzeno, eicosilbenzeno, docosano, heptacosano dotriacontano y de 2,6,10-trimetiltetradecano.

Martínez en el 2009, evalúa la actividad antimicrobiana, actividad antioxidante, toxicidad general y mediante una cromatografía de alta resolución (HPLC) determinó que los metabolitos secundarios responsables de dicha actividad son fenoles, validando científicamente el uso tradicional de la corteza de *C. procera*.

Por otro lado el fruto de *C. procera* cuenta con los siguientes estudios:

Eleno en el 2010, determina la actividad antimicrobiana del fruto de *C. procera* en diferentes estadios de maduración, encontrando que el fruto maduro tiene una toxicidad moderada sobre *Artemia salina* y comparando la actividad antibacteriana del extracto del fruto maduro e inmaduro, éste último presenta una mayor actividad antibacteriana.

Villanueva en el 2006, caracteriza parcialmente y evalúa la estabilidad de la pulpa del fruto de *C. procera* conservada por diversos métodos.

PROBLEMA

Por los antecedentes sobre la familia Anacardiaceae y en particular de *C. procera* antes mencionados y por las estadísticas que demuestran que las diarreas son un problema muy importante de salud en México, además de que se sabe que un gran porcentaje de la población no tiene acceso a la medicina alópata y sumándole que se ha perdido gran parte de las costumbres por consumir productos regionales que aporten nutrientes al organismo y en su lugar se introducen productos de otras regiones, la pregunta que se plantea en esta investigación es: si la composición química del fruto tiene actividad sobre cepas bacterianas causantes de infecciones en el hombre y si tendrá propiedades sobresalientes como alimento, para poder establecer sus propiedades nutraceuticas.

Propiedades Nutraceuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

HIPÓTESIS

Si se sabe que el árbol de *C. procera* sintetiza diversos metabolitos secundarios como fenoles contenidos en la corteza, además algunos de estos presentan actividad antibacteriana, antifúngica, antioxidante, etc. lo cual justifica su uso en la medicina tradicional para aliviar diversos padecimientos. Entonces el fruto de esta especie probablemente debe contener metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica reportada y además podría tener propiedades sobresalientes como alimento.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar las propiedades nutraceuticas del fruto de *C. procera* Kunth

Objetivos particulares.

1. Determinar la concentración de vitamina C y realizar los estudios bromatológicos del fruto fresco de *C. procera* para establecer sus propiedades nutrimentales.
2. Obtener el extracto metanólico de *C. procera*.
3. Evaluar la actividad antibacteriana, toxicidad general y antioxidante del extracto metanólico y la partición hexánica del fruto.
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida mínima (CBM) del extracto activo.
5. Determinar el efecto bacteriostático o bactericida del extracto activo.
6. Determinar la Concentración letal media (CL₅₀) de los extractos del fruto de *C. procera* en células CaSki.

MÉTODOS

Colecta del material

El fruto maduro de *C. procera* (Apéndice 1) fue colectado en San Rafael, Coxcatlán, Puebla, (Apéndice 2) durante el mes de agosto del 2009; se depositó un ejemplar en el herbario IZTA para su identificación y número de colecta; el material colectado fue separado en dos porciones una para ser congelada y así mantener el fruto fresco y la otra porción fue secada para obtener el extracto.

ESTUDIO BROMATOLÓGICO

Cuantificación de Carbohidratos por la técnica de Nelson-Somogy.

Para la cuantificación de carbohidratos primero se realizó la extracción de carbohidratos utilizando 100mg de la pulpa del fruto fresco y 25mg del fruto seco (apéndice 10) posteriormente se hizo la cuantificación por el método de Nelson-Somogy (González y Peñalosa, 2000) utilizando 1 mL de la muestra problema, la cual se procesó de acuerdo a la curva patrón como lo describe la técnica, el patrón fue glucosa 200µg/mL (Apéndice 3).

Determinación de Carbohidratos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se realizó una cromatografía líquida de alta resolución para determinar los carbohidratos presentes en la muestra problema del fruto, los patrones con los que se hizo la comparación fueron: Glucosa, Fructosa y Sacarosa, la fase móvil fue agua, y la preparación de la muestra consistió en pesar 100mg de fruto seco en 5mL de agua destilada, se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos y se inyectaron 30µL en el HPLC, con una columna para carbohidratos de 30cm x 7.8cm, con un detector de refracción de la luz. Una vez que corrió la muestra se comparó y se cuantificó la concentración de cada azúcar presente en la muestra mediante el área bajo la curva (Apéndice 4).

Propiedades Nutraceuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Cuantificación de Proteínas por el método de Bradford.

Para cuantificar proteínas primero se realizó la extracción a partir de 10gr de fruto adicionando 2 mL de la solución Tris-HCl 50mM a pH=7.3 con PVP al 0.1% para homogeneizar el tejido y centrifugar a 15000 rpm por 15 minutos, el sobrenadante es el que contiene las proteínas para realizar la cuantificación por el método de Bradford, utilizando como patrón BSA 100µg/mL, se leyó en el espectrofotómetro a 595nm (González y Peñalosa, 2000) (Apéndice 5).

Cuantificación de Lípidos por la técnica de Soxhlet.

El contenido de lípidos totales de la muestra del fruto se estimó mediante extracción con hexano como solvente orgánico en un aparato Soxhlet.

Se realizó un cartucho de papel filtro con 4gr de muestra seca y molida, éste se puso en un horno a 65°C por 24 horas; este cartucho se pesó hasta que alcanzó un peso constante, posteriormente se procedió a extraer los lípidos en un aparato Soxhlet utilizando hexano como solvente durante 4 horas. Una vez pasado el tiempo el cartucho se secó al aire y se puso nuevamente en la estufa a 65°C hasta que alcanzó peso constante, la cantidad de lípidos se determinó por la diferencia de peso del cartucho antes y después de la extracción, esta cantidad correspondió a la cantidad de lípidos extraídos por el solvente (González y Peñalosa, 2000).

Determinación de Lípidos por Cromatografía de Gases acoplado a espectrometría de masas.

Análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS): Se emplea un equipo FISIONS MD-800 con una columna DB-5MS. La programación de temperatura es la siguiente: 40°C (inicial), 120°C (final), gradiente: 3°C/min. La inyección se efectúa en split 1/75 a 200°C. El modo de adquisición es Full Scan (35-450 u.m.a.).

La identificación de los compuestos volátiles a partir de la inyección de 10µL fue mediante la comparación del espectro de masas con la base de datos del equipo.

Determinación del ácido Ascórbico (Vitamina C).

En esta técnica se determinó la cantidad de ácido ascórbico presente en el fruto y fué cuantificada por titulación con el indicador 2, 6-diclorofenolindofenol, el cual es reducido por el ácido ascórbico a una forma incolora.

Primero se pipetearon 2mL de la solución patrón de ácido ascórbico en un matraz Erlenmeyer de 250 mL se adicionaron 10 mL de ácido acético al 10% y 50 mL de agua destilada. Se tituló este contenido con la solución de 2, 6-diclorofenolindofenol hasta que un color ligeramente rosado persiste por 15 segundos. Se calcularon los mg de ácido ascórbico que son equivalentes con 1 mL de indicador. Para el fruto se tituló 10 mL del jugo y se siguió el mismo procedimiento que el patrón. Se calculó la cantidad de ácido ascórbico en 100 mL de jugo del fruto (Murillo, 2006) (Apéndice 6).

Obtención de los extractos

El extracto fué obtenido por el método de maceración (Domínguez, 1973). Se pesaron 690.78gr del fruto seco y se colocó en trozos en un matraz con metanol, se obtuvo el extracto metanólico crudo, el cual se filtró y destiló a presión reducida en un rotavapor. El extracto se colocó en un recipiente de vidrio con la finalidad de completar la evaporación del solvente. Para obtener el extracto metanólico libre de compuestos no polares, 70 gr del extracto crudo se sometió a una partición con hexano. El rendimiento del extracto se determinó por diferencia de peso con relación al peso seco de la planta.

De esta forma se obtuvieron 3 extractos:

M1: metanólico crudo

M2: libre de compuestos no polares

H:

hexánico

Propiedades Nutraceuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

PRUEBAS BIOLÓGICAS

Evaluación de la actividad antibacteriana

Se utilizaron 13 cepas bacterianas (cinco Gram positivas y ocho Gram negativas) de importancia médica (Cuadro 1).

Cuadro 1: Cepas bacterianas utilizadas.

Tipo	Cepa	Número ATCC, clasificación o donadas por:
Gram positivas	<i>Staphylococcus aureus</i>	12398
	<i>Staphylococcus aureus</i>	29213
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	FES Cuautitlán
	<i>Bacillus subtilis</i>	Llaboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Cuautitlán
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Llaboratorio de microbiología de la FES Cuautitlán
Gram negativas	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Llaboratorio de Análisis clínicos de la CUSI de la FES Iztacala
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Hospital los Ángeles
	<i>Salmonella typhi</i>	19430
	<i>Escherichia coli</i>	25922
	<i>Vibrio cholerae</i>	INDRE 206 (aislada de agua contaminada)
	<i>Vibrio cholerae</i>	CDC V12 (Tor)
	<i>Proteus mirabilis</i>	

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 2000 µg del extracto a probar; como control positivo se utilizaron sensidiscos con 25 µg de cloramfenicol, y como control negativo se utilizaron sensidiscos con 10 µL del solvente empleado para diluir el extracto a evaluar (Vanden Berghe y Vlietinck, 1991) (Apéndice 7).

Evaluación cuantitativa

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) se utilizó la microtécnica de dilución en caldo, en donde las concentraciones empleadas fueron: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125 µg/mL. Las cajas se inocularon con 50µL de un cultivo bacteriano a una concentración de 1×10^5 UFC/mL durante 24 hrs (Koneman, et al, 1985) (Apéndice 8).

Efecto de los extractos sobre la curva de crecimiento bacteriana.

Se evaluó el efecto de los extractos M1 y M2 sobre la curva de crecimiento bacteriana. Se utilizó una cepa bacteriana Gram positiva y una Gram negativa (las que presentaron los valores menores en las pruebas cuantitativas). Se monitoreó su crecimiento en nueve tiempos durante 24 horas, al ser expuestas a diferentes concentraciones del extracto ($\frac{1}{2}$ CMI, CMI, CBM) y un grupo testigo (Muroi et al., 1993) (Apéndice 9).

Actividad antioxidante.

La actividad antioxidante se evaluó con el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH). Se determinó la Concentración Antioxidante Media (CA₅₀), utilizando las siguientes concentraciones: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16,

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

18 y 20 µg/mL. Como control positivo se utilizó la catequina a las mismas concentraciones que el compuesto problema. Como control negativo se utilizaron pozos con 200 µL de MeOH grado HPLC (Okusa et al., 2007) (Apéndice 10).

Citotoxicidad.

La citotoxicidad se realizó mediante la técnica de cristal violeta, en la cual se utilizaron células CaSki (células epiteliales tumorales de cérvix) éstas se pusieron a proliferar en medio de cultivo RPMI enriquecido con suero fetal Bovino al 10% y 0.5mL de antibiótico (GIBCO 15240) a una temperatura de 36°C por tres días aproximadamente en una incubadora con una atmósfera de CO₂ del 5% y 95% de aire. Una vez saturada la caja de cultivo se despegaron las células con 1mL de tripsina-verseno al 0.05%, se centrifugaron para ser cultivadas en placas de cultivo celular de 96 pozos; para la curva patrón se pusieron cantidades seriadas de 60000, 30000, 15000, 7500, 3750, 1375 células por pozo y para el ensayo se requirieron 30000 células por pozo, las cuales se dejaron reposar por 2 horas para que se adhieran a la placa a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de CO₂ del 5% y 95% de aire. Una vez que se adhirieron a la placa se le añadieron concentraciones seriadas de los extractos del fruto de 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.81, 3.90, 1.95, 0.97, 0.48, 0.24 µg/100µL por pozo y se dejaron interactuar por 24 hrs. Posteriormente se lavaron con PBS 1x y se fijaron con 30 µL por pozo de glutaraldehído al 1.1% por 10 minutos, las placas fueron lavadas y secadas al aire. Se añadieron 50µL/pozo del colorante cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico pH 6.0 y se mantuvieron por 10 minutos en agitación. Después de la tinción se lavaron 3 veces las cajas de cultivo con agua de tal manera que el colorante no asimilado fue retirado de los pozos. Posteriormente se añadieron 50µl/pozo de ácido acético al 10% dejando en agitación constante por 20 minutos a temperatura ambiente para desteñir las células y que el colorante quede en suspensión de forma homogénea. Posteriormente se tomaron las lecturas de cada pozo en un lector de placas de

ELISA (EI_x800; Bio-Tek) a 595nm. Este procedimiento se llevó a cabo tanto para la curva patrón como para el ensayo de citotoxicidad (Apéndice 11).

RESULTADOS

Colecta de la planta.

El fruto del árbol de *C. procera* (Chupandilla) fue colectado en el mes de Agosto del 2009 en la localidad de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Los datos de la especie se presentan en el cuadro 2.

Cuadro 2: Datos etnobotánicos de la especie

Nombre científico	<i>Cyrtocarpa procera</i>
Nombre común	Chupandilla
Familia	<i>Anacardiaceae</i>
Parte utilizada	Fruto
Forma de uso	Se hace un té con la cáscara del fruto y se toma como agua de uso

Estudio Bromatológico

Los resultados obtenidos del estudio bromatológico del fruto de *C. procera* se muestran en el cuadro 3:

Cuadro 3: Evaluación Bromatológica del fruto de *C. procera*

Contenido	% por cada 100gr
Carbohidratos	29
Lípidos	1
Proteínas	0.83
Vitamina C	0.44

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Como se observa en el cuadro 3 cada 100 gramos de fruto contiene el 29% de carbohidratos, 1% de lípidos, 0.83% de proteínas y el 0.44% de vitamina C.

Determinación de Carbohidratos

Sin embargo ese 29% de carbohidratos contenidos en el fruto estcompuesto por sacarosa (3.3%), glucosa (8.8%) y fructosa (10.7%) esto se logró determinar por HPLC (Figura 1).

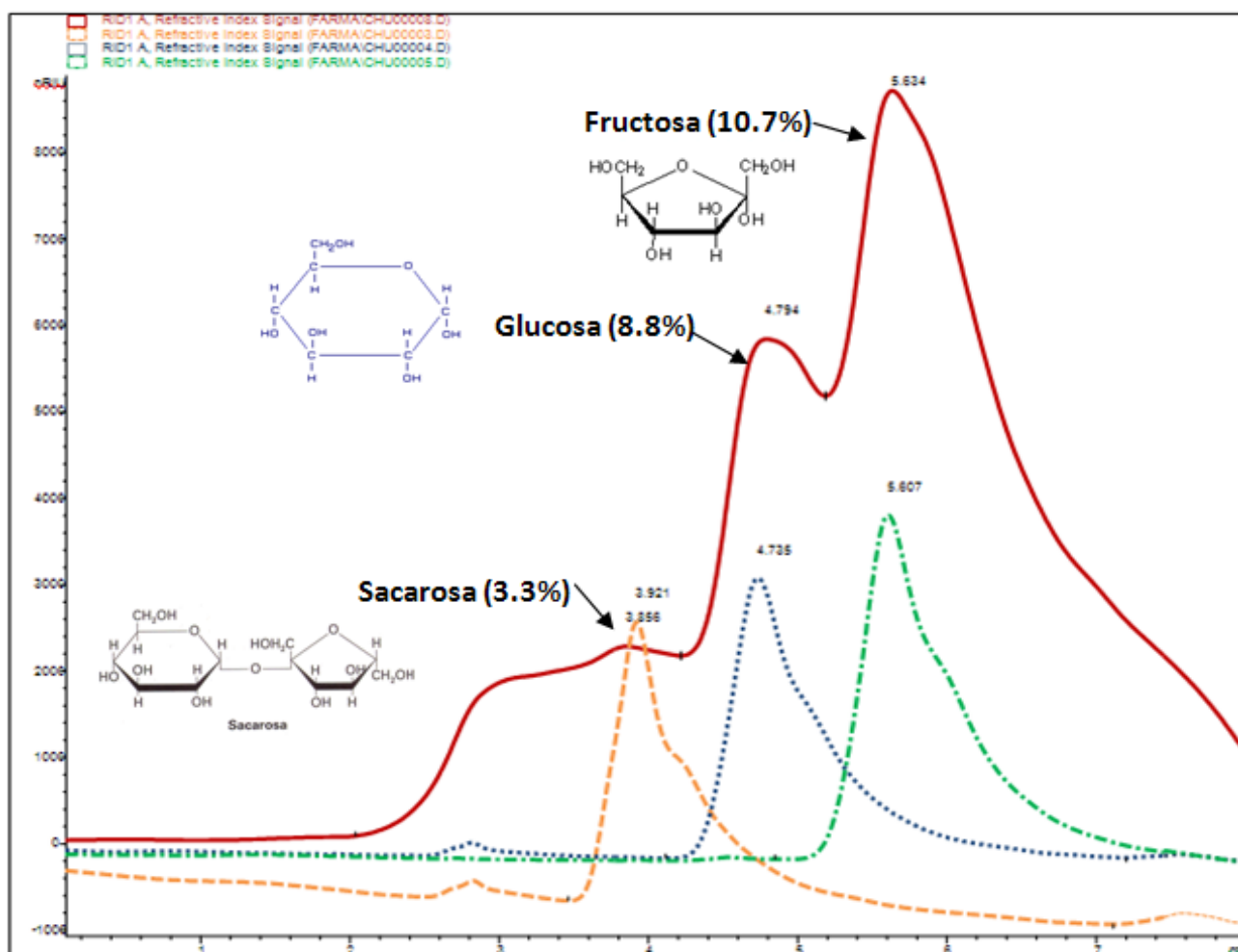


Figura 1: Cromatograma de la composición de carbohidratos del fruto de *C. procera*

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Determinación de Lípidos

Con respecto a la cantidad de lípidos contenidos en el fruto de *C. procera*, la concentración fue del 1%, la Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (GC/MS) mostró los que compuestos más representativos son: 1.15% de ácido palmítico (ácido graso saturado), 5.92% de oleico (ácido graso insaturado), 1.15% de escualeno (compuesto orgánico), 1.81% de campesterol (fitoesterol) y 7.67% de Vitamina E (Figura 2).

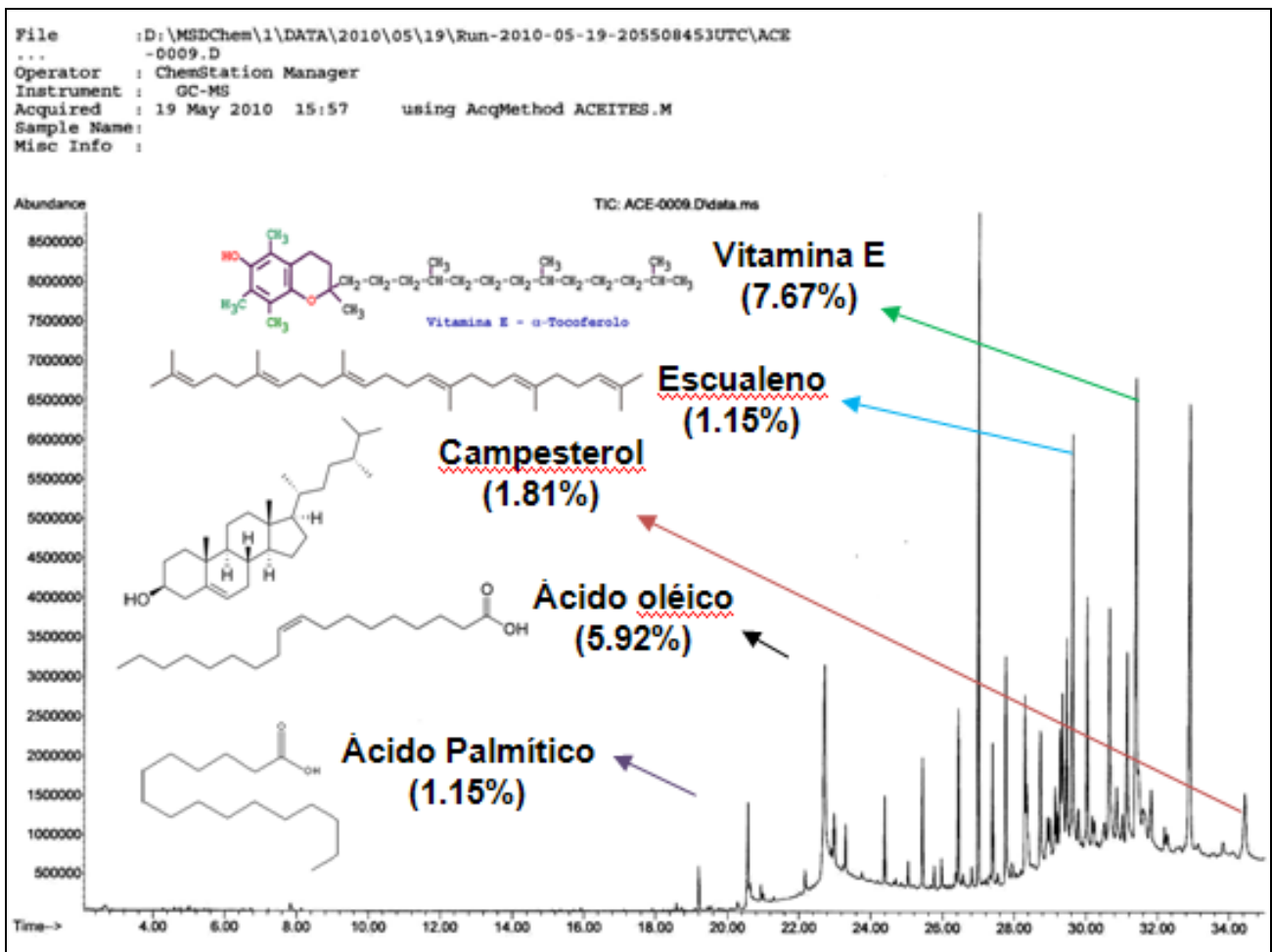


Figura 2: Cromatograma del contenido de lípidos del fruto de *C. procera*.

Determinación de Vitamina C y Actividad Antioxidante

La cantidad de vitamina C contenida en el fruto fresco de *C. procera* es del 0.44%, la cual está relacionada con el pH ácido y su actividad antioxidante pues el fruto fresco mostró una CA_{50} de: mientras que los extractos M1, M2 y H, presentaron una CA_{50} de: >100, 80.6, 69.7, 90.1 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, cabe mencionar que el control positivo (Catequina) tuvo una CA_{50} de 3.94 $\mu\text{g/mL}$ (Figura3).

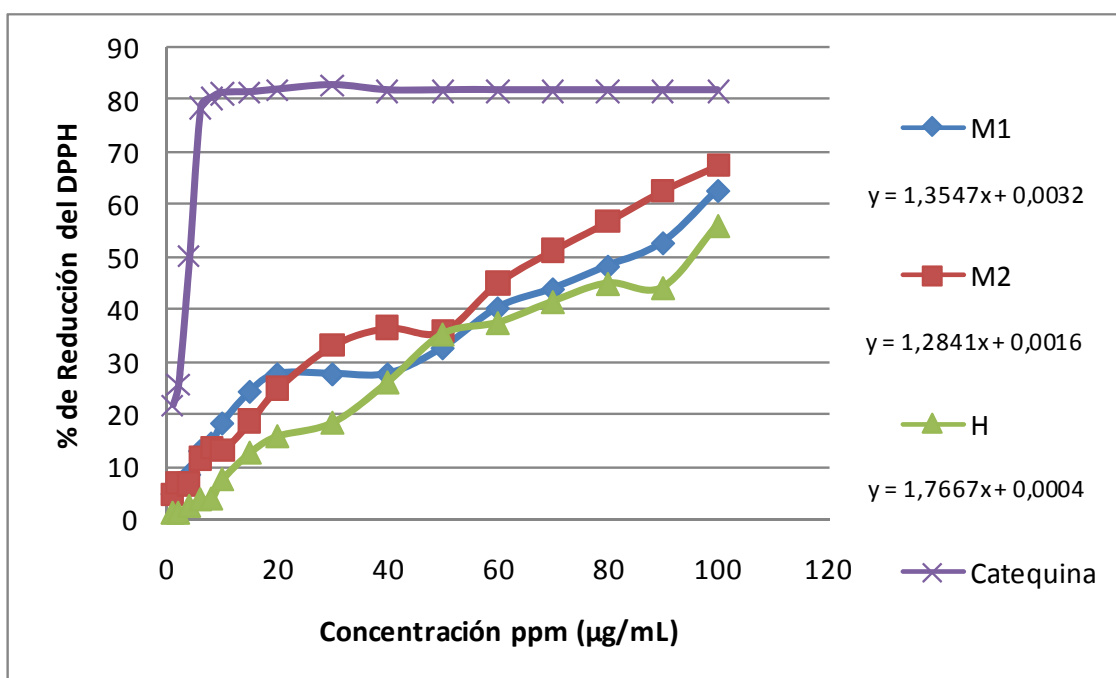


Figura 3: Actividad Antioxidante media del extracto M1, M2 y Hexánico del fruto de *C. procera*

Rendimiento del extracto

El rendimiento del extracto libre de compuestos no polares (M2) del fruto de *C. procera* (Chupandilla) fue del 10.12%; en comparación al extracto hexánico tuvo un mayor rendimiento, lo cual indica que esta especie posee una mayor cantidad de compuestos de polaridad alta (Cuadro 4, Figura 4).

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Cuadro 4: Rendimiento de los extractos del fruto de *C. procera*.

Extracto	Peso	%
M1	164.95	23.87
M2	53.58	10.12
Hexánico	4.28	0.47

M1: extracto metanólico crudo, M2: extracto metanólico libre de compuestos no polares.

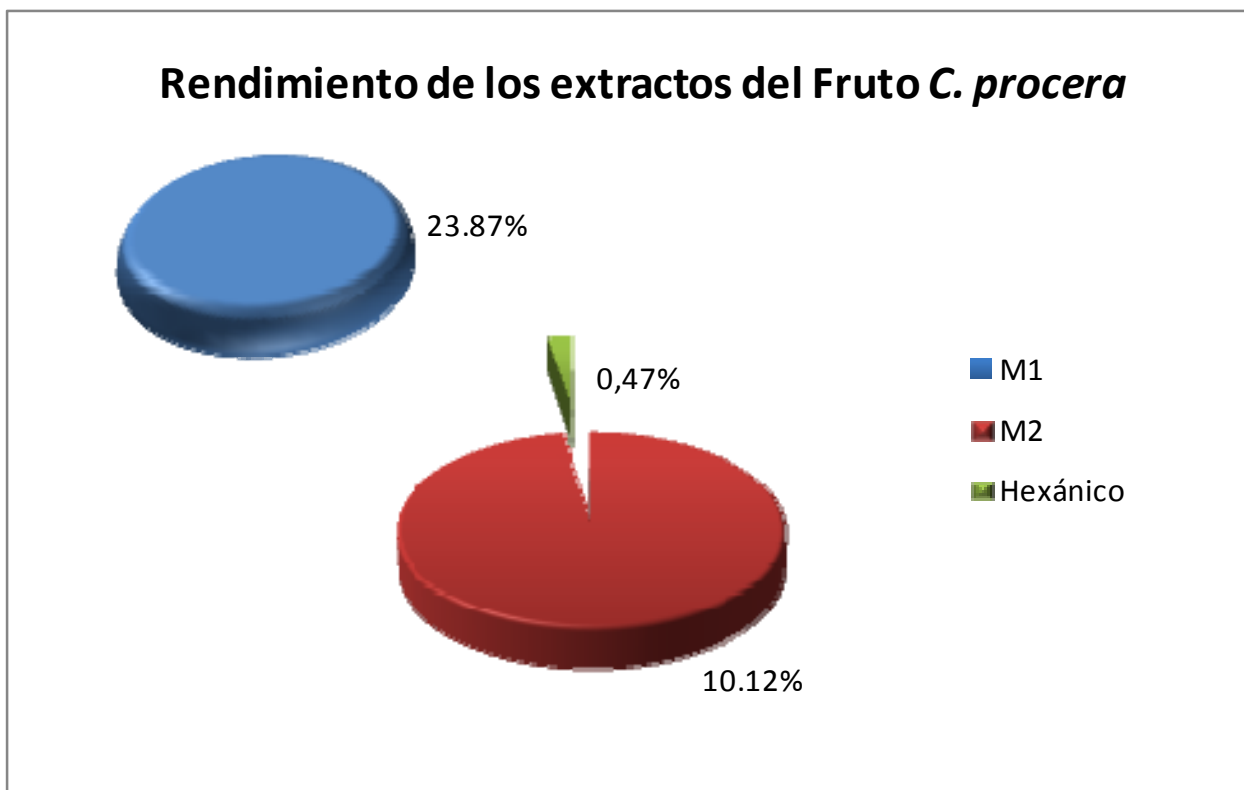


Figura 4: Rendimiento de los extractos del fruto de *C. procera*

El rendimiento en porcentaje de *C. procera* se calculó con respecto a 690.78gr de fruto seco

Actividad antibacteriana

Evaluación Cualitativa

El extracto Hexánico no mostró actividad sobre ninguna de las cepas bacterianas empleadas.

La evaluación de la actividad antibacteriana del extracto M1 y M2 del fruto de *C. procera*, mostró que ambos extractos tuvieron actividad antibacteriana siendo más activo el extracto M2 ya que tuvo actividad sobre 11 de 13 cepas bacterianas a comparación con el extracto M1 que sólo tuvo actividad sobre 9 cepas, a éstos resultados se les aplicó un ANOVA, la cual arrojó que sí existen diferencias significativas entre la actividad del extracto M1 y M2 ($P < 0.05$; $F = 5.189$). Las bacterias causantes de las diarreas son las del grupo Gram negativas, las bacterias que presentaron los halos de inhibición más grandes para ambos extractos fueron *P. mirabilis* ($9.33.00 \pm 0.57$ mm) para los dos extractos, seguida de *V. cholerae* Tor (8.00 ± 0.57 y $9.33.00 \pm 0.57$ mm) M1 y M2 respectivamente, mientras que en *S. tiphy* y *Y. enterocolitica* HA, no se observaron halos de inhibición para ninguno de los dos extractos.

Se realizó la evaluación sobre bacterias Gram positivas con la finalidad de proponer otros usos medicinales del fruto, y se determinó que ambos extractos mostraron una buena actividad, la bacteria con los mayores halos de inhibición fue *B. subtilis* (9.00 ± 0.00 y 10.00 ± 0.00 mm); para los extractos M1 y M2 respectivamente (cuadro 4, Figura 5).

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Cuadro 5: Actividad antibacteriana del extracto metanólico crudo (M1) y metanólico libre de compuestos no polares (M2) del fruto de *C. procera*.

Bacterias	Extractos	
	Halos de Inhibición (mm)	
	M1	M2
<i>S.aureus</i> 29213	7,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00
<i>S. aureus</i> 12398	9,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00
<i>S. epidermidis</i> FES-C.	Na	9,00 ± 0,00
<i>B. subtilis</i>	9,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00
<i>E. faecalis</i>	Na	8,33 ± 0,58
<i>V. cholerae</i> agua	7,67 ± 0,58	9,00 ± 1,00
<i>V. cholerae</i> Tor	8,00 ± 0,00	9,33 ± 0,58
<i>E. aerogenes</i>	7,00 ± 0,00	8,00 ± 0,00
<i>E. coli</i> Raúl	7,67 ± 0,58	7,00 ± 0,00
<i>S. tiphy</i>	Na	Na
<i>Y.enterocolitica</i> HA	Na	Na
<i>Y. enterocolitica</i> CUSI	7,00 ± 0,00	8,33 ± 0,00
<i>P. miriabilis</i>	9,33 ± 0,58	9,33 ± 0,58

Halos de inhibición en mm; valor promedio de 3 repeticiones; el extracto probado fue con una concentración de 2mg/10µl por sensidisco. Todas las especies bacterianas mostradas fueron sensibles al cloramfenicol (25 µg/disco), Na: No Activo.

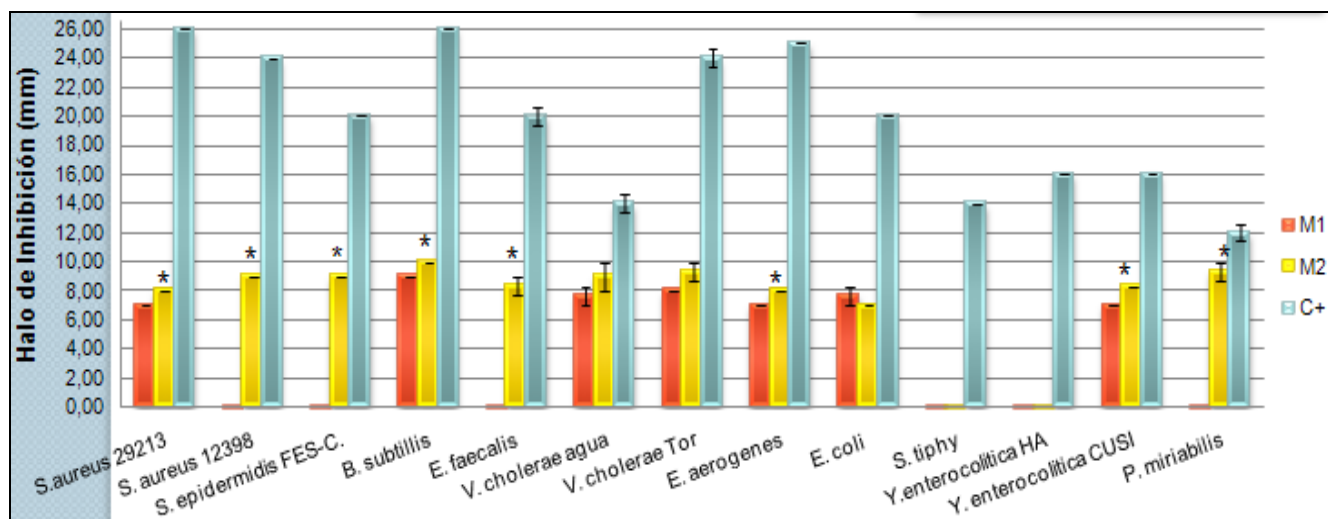


Figura 5: Halos de Inhibición del extracto M1 y M2 del fruto de *C. procera*.

Evaluación cuantitativa

Los resultados obtenidos de la determinación de la CMI y CBM de los extractos (M1 y M2) se muestran en el cuadro 6, donde se observa que para el extracto M1 la bacteria Gram negativa más sensible fue *V. cholerae* Tor pues a comparación con las otras cepas bacterianas Gram negativas requiere de concentraciones menores para inhibir su crecimiento (CMI= 4; CBM= 8mg/mL). Del grupo de bacterias Gram positivas la bacteria más sensible fue *S. aureus* 29213 ya que a comparación de las otras cepas bacterianas, se necesitan concentraciones menores para inhibir el crecimiento (CMI= 4; CBM= 6mg/mL). Las demás cepas bacterianas tanto del grupo Gram negativas y Gram positivas son las menos sensibles al requerir concentraciones mayores a 5.0 mg/mL de extracto para inhibir su crecimiento.

Con respecto al extracto M2 se puede apreciar que para inhibir el crecimiento de todas las cepas bacterianas utilizadas se necesita una menor concentración de este extracto en comparación con el extracto M1; teniendo así que tanto las bacterias Gram positivas como las bacterias Gram negativas requieren concentraciones menores del extracto M2 para inhibir su crecimiento.

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Cuadro 6: Determinación de CMI y CBM de los extractos M1 y M2 del fruto de *C. procera* en mg/mL.

Bacteria	Extractos (mg/mL)			
	M1		M2	
	MIC	CBM	MIC	CBM
<i>S. aureus</i> 29213	4	6	2	8
<i>S. aureus</i> 12398	5	6	2	5
<i>S. epidermidis</i> FES-C.		Na	6	8
<i>B. subtilis</i>	2	5	4	5
<i>E. faecalis</i>		Na	6	8
<i>V. cholerae</i> agua	4	8	5	8
<i>V. cholerae</i> Tor	4	8	4	8
<i>E. aerogenes</i>	5	8	6	8
<i>E. coli</i>	8	10	10	>10
<i>Y. enterocolitica</i> CUSI	4	8	6	8
<i>P. miriabilis</i>		Na	>10	>>10

Na: No activo

Actividad del extracto M1 y M2 sobre la curva de crecimiento bacteriano

El efecto del extracto M1 sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* 29213 y *V. cholerae* Tor se observa en las figuras 6 y 7 respectivamente. El efecto es bacteriostático para *S. aureus* 29213 pues aplicando concentraciones de 2, 4 y 6 mg/mL el crecimiento bacteriano disminuye siguiendo una línea similar a la del testigo en las concentraciones de 2 y 4 mg/mL y en la concentración de 6mg/mL, desciende la población bacteriana, manteniéndose en poblaciones por abajo del grupo testigo.

Para *V. cholerae* Tor se utilizaron concentraciones de 2, 4 y 8mg/mL. Para las concentraciones de 2 y 4mg/mL la población bacteriana crece por debajo del testigo, para la concentración de 8mg/mL desciende moderadamente la población manteniéndose a lo largo de 24 horas; por lo que el extracto M1 es bacteriostático para ambos tipos de cepas bacterianas al igual que el extracto M2 a las concentraciones de 1, 2 y 8mg/mL para *S. aureus* 29213 y para *V. cholerae* Tor a las concentraciones de 2, 4 y 8mg/mL (Figura 8 y 9).

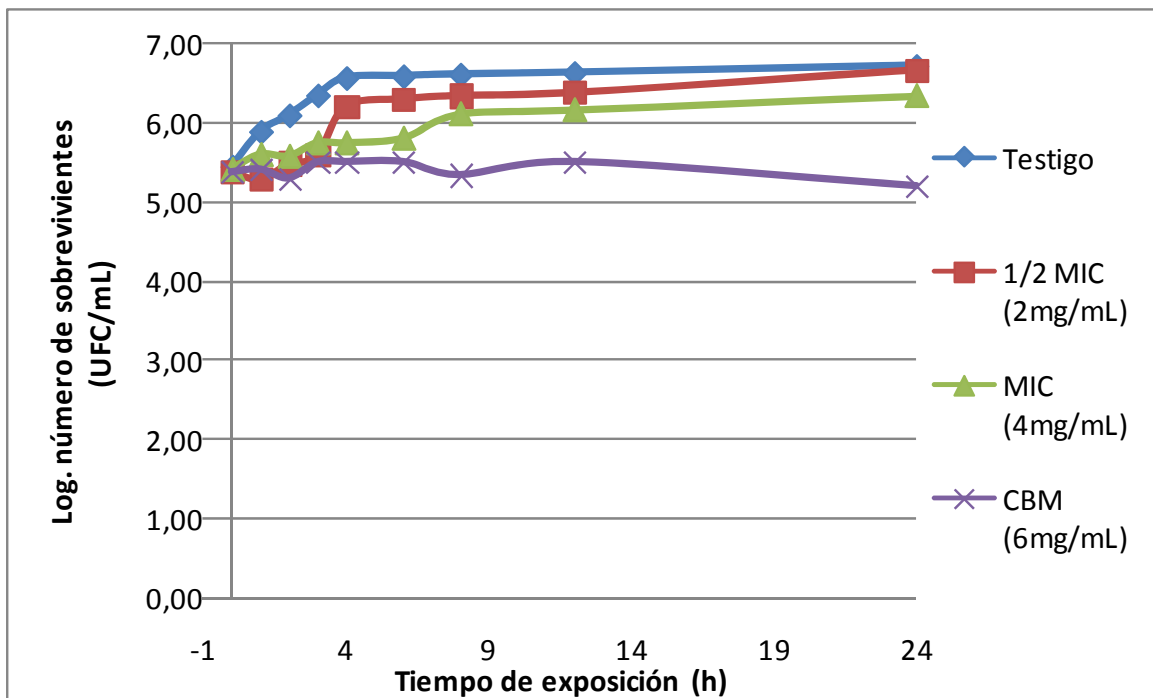


Figura 6: Actividad del extracto M1 sobre la curva de crecimiento de *S. aureus* 29213

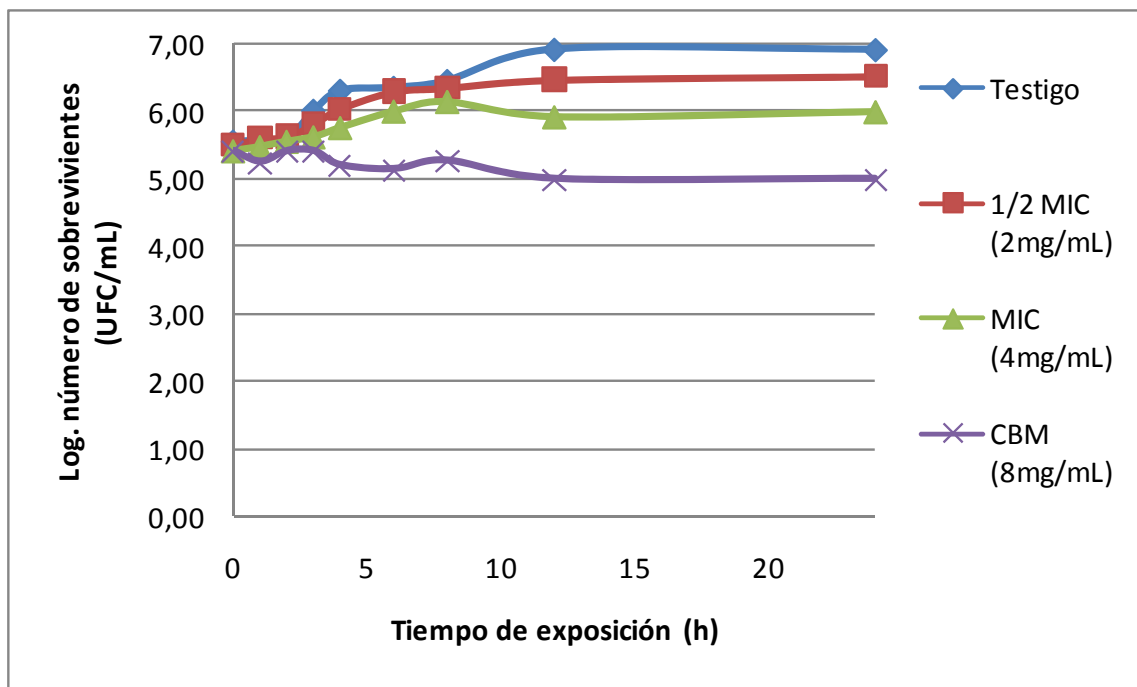


Figura 7: Actividad del extracto M1 sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* Tor.

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

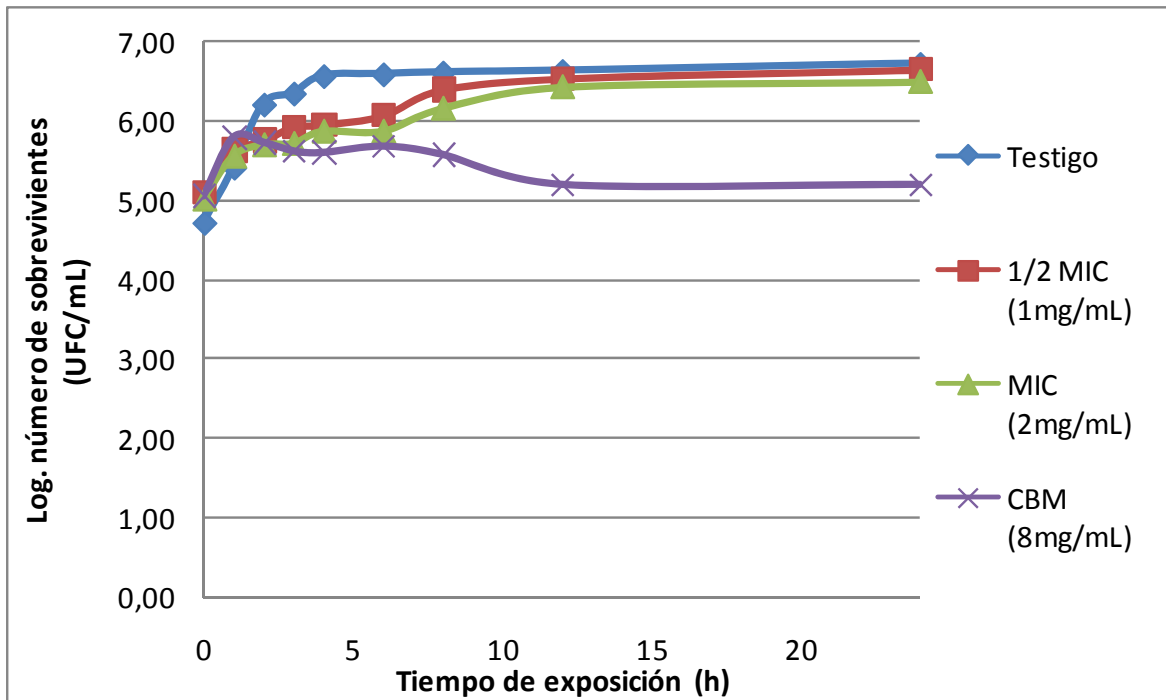


Figura 8: Actividad del extracto M2 sobre la curva de crecimiento de *S.aureus* 29213

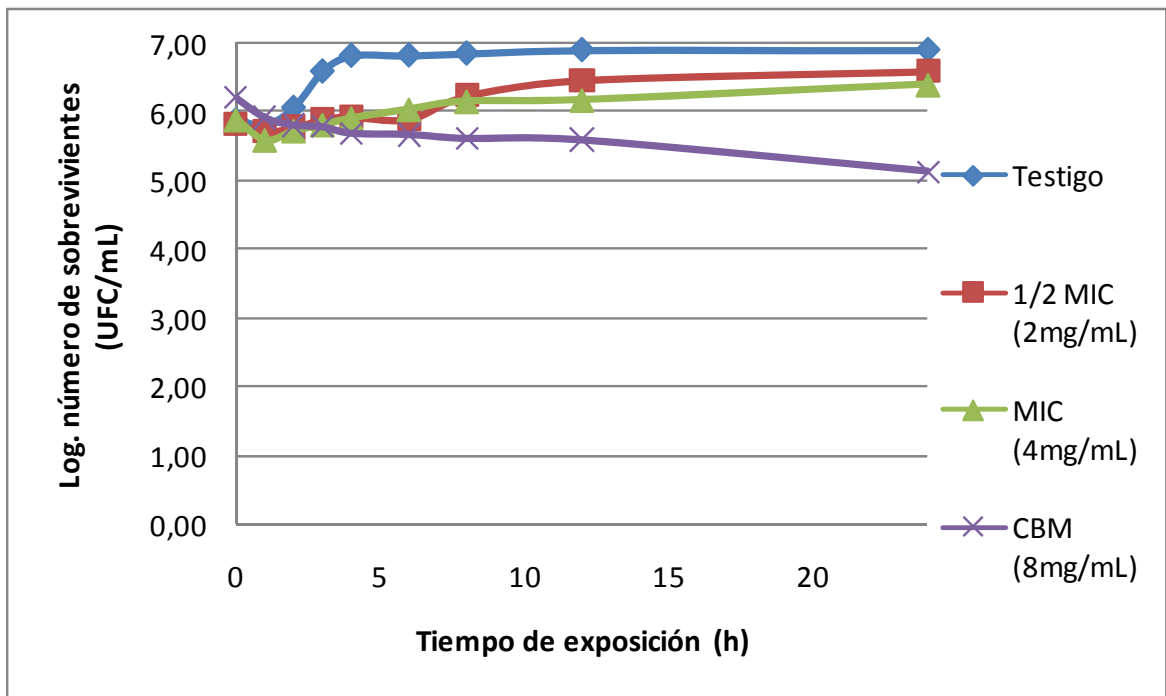


Figura 9: Actividad del extracto M2 sobre la curva de crecimiento de *V. cholerae* Tor.

Citotoxicidad de los extractos del fruto de *C. procera*.

En cuanto a la citotoxicidad los valores de la dosis letal media (DL_{50}) de los tres extractos del fruto de *C. procera* se muestran en el cuadro 7 y figura 10.

Donde se puede apreciar que el extracto más tóxico fue el extracto hexánico y el menos tóxico fue el extracto M2 y de acuerdo con los estándares del Instituto Nacional de cáncer (NCI) las concentraciones que son consideradas como activas son de $\leq 20\mu\text{g/mL}$ para los extractos y para los compuestos puros un valor de $\leq 4\mu\text{g/mL}$.

Cuadro 7: Determinación de la dosis letal media (DL_{50}) de los extractos del fruto de *C. procera*

Extracto	DL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
M1	14.86
M2	22.03
H	9.12

M1: Extracto Crudo; M2: Extracto libre de compuestos no polares; H: Extracto Hexánico

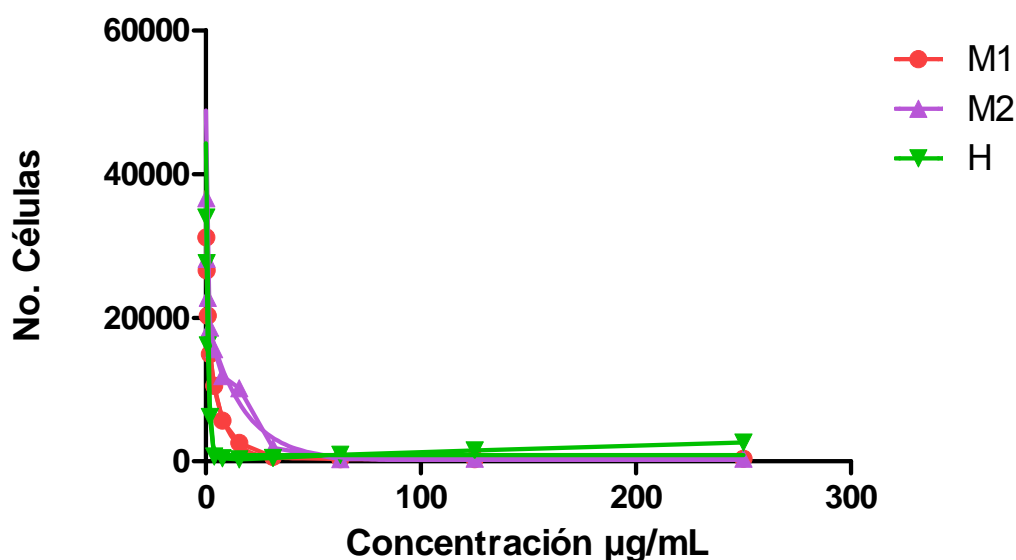


Figura 10: Determinación de la CL_{50} los extractos del fruto de *C. procera*

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Análisis químico de los extractos del fruto de *C. procera*.

En los cromatogramas del análisis por GC-MS del extracto M2 y H (Figura 11 y 12) se determinaron 18 compuestos para ambos extractos, en el extracto M2.

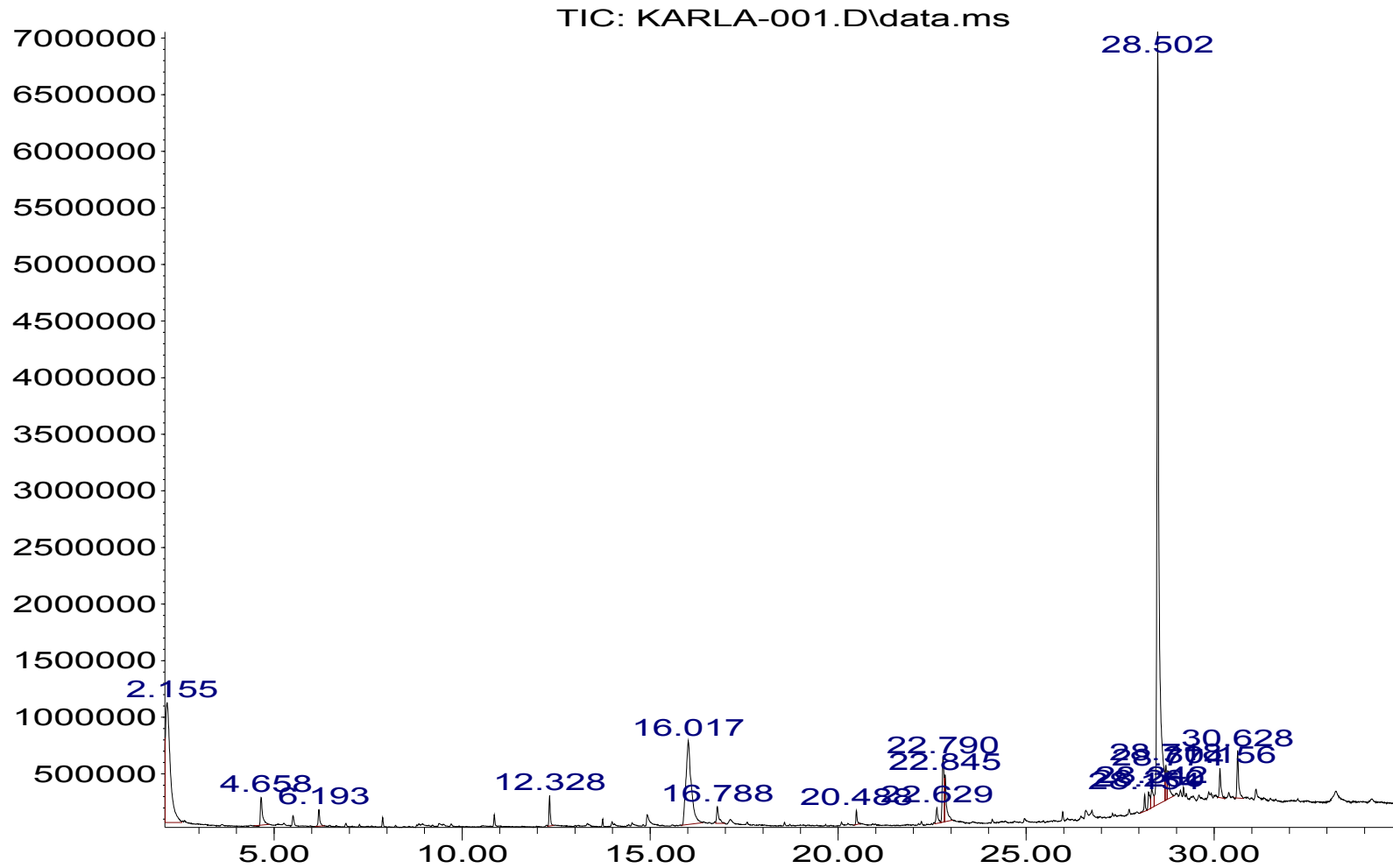
Los compuestos relevantes se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8: Compuestos de los extractos M2 y Hexánico

Extracto	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Abundancia (%)
M2	α -Ácido linoléico	22.62	0.86
	Ácido estéarico	22.78	50.81
	Quinona	28.77	1.71
Hexánico	Ácido palmítico	20.09	22.26
	Ácido linoléico	22.14	40.36
	Vitamina E	32.84	5.83

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

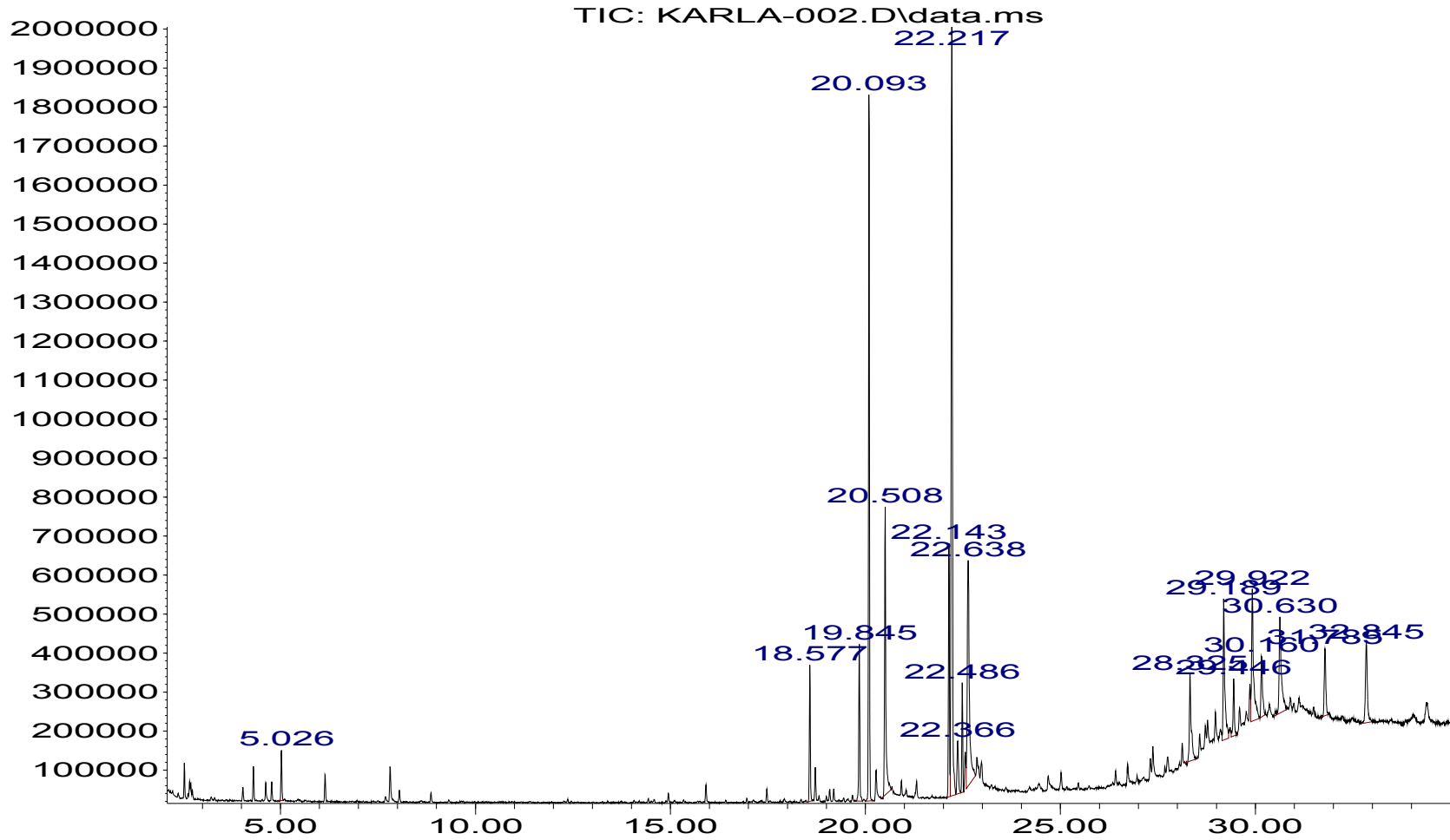
Abundance



Time-->

Figura 11: Cromatograma del extracto M2 del fruto de *C. procera*

Abundance



Time-->

Figura 12: Cromatograma del extracto Hexánico del fruto de *C. procera*

DISCUSIÓN

Del fruto de *C. procera*, en el siglo VI Francisco Hernández escribió “éste fruto es administrado contra las disenterías y las diarreas” (Argueta y Cano, 1994), la forma de administración es en infusión cociendo un puñito de la cáscara del fruto en un litro de agua y tomándolo durante cuatro días. El uso del fruto en la medicina tradicional no es exclusivo de San Rafael Coxcatlán, Puebla, sino que en otros estados de la República Mexicana también es utilizado (Canales et al., 2005 y 2006; Argueta y Cano, 1994). Los resultados obtenidos en este estudio coinciden con lo reportado dentro de la medicina tradicional, pues se encontró que el fruto además de tener buena calidad nutricional, es medicinal, por lo que se puede catalogar como un nutraceutico además de que se valida el uso medicinal tradicional de esta especie.

Del estudio bromatológico (Cuadro 3) que fue la cuantificación de carbohidratos, lípidos, proteínas y vitamina C, los resultados concuerdan con Villanueva (2006) pues ella hizo una caracterización parcial de la pulpa de *C. procera*; estos resultados también concuerdan con Badui (1999) ya que menciona que los frutos por lo regular contienen del 20 al 30% de carbohidratos, el $\leq 1\%$ de proteínas y $\leq 1\%$ de lípidos. En este estudio se encontró que el porcentaje de carbohidratos es del 29%, de los cuales el 3.3% es Sacarosa, el 8.8% es Glucosa y el 10.7% es Fructosa (Figura 1), estos tres azúcares son muy comunes en los frutos; los cuales son muy saludables por su rápida absorción (Badui, 1999).

La cuantificación de lípidos del fruto fue del 1% (Figura 2), los lípidos más representativos son el ácido palmítico, es un ácido graso saturado que favorece el aumento de colesterol, sin embargo este ácido graso se encuentra en bajas concentraciones además de que es muy común encontrarlo en los vegetales (Alenguer et al., 2002), ácido oléico que ejerce una acción beneficiosa en los vasos sanguíneos y corazón, pues aumenta el colesterol “bueno” (HDL) contribuyendo a reducir las enfermedades cardiovasculares (Saavedra, 2000); el escualeno, es un aceite natural que se le atribuye actividad antioxidante y antitumoral (Smith et al., 1998), también se

ha visto que tiene un efecto citoprotector sobre células hematopoyéticas pluripotenciales de la M.O (Das et al., 2003) actualmente se ha utilizado como un adyuvante en vacunas para mejorar su eficacia (Giudice et al., 2006) también el escualeno se produce en abundancia por los seres humanos, para quien sirve como un precursor del colesterol y las hormonas esteroideas (Granner, 2000); el campesterol es un fitosterol que se le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas, sin embargo, el efecto mejor caracterizado científicamente, es el hipocolesterolemizante para el colesterol total y el colesterol LDL (Valenzuela, 2006) y Vitamina E que es antioxidante (Leyva y Leyva, 2008).

Un miembro de la familia Anacardiaceae es el Mango (*Mangifera Indica*), en el cual se han descrito que contiene, campesterol, ácido palmítico y ácido oleico, también es usado en la medicina tradicional de diversos países como Cuba para aliviar las diarreas (Garrido-Garrido, 2010), los resultados de la presente investigación concuerdan ya que el fruto de la Chupandilla y el Mango pertenecen a la misma familia.

En cuanto al contenido de proteínas y vitamina C, como ya se había mencionado antes concuerda con el estudio realizado por Villanueva (2006), al encontrar 0.86% de proteína y el 0.44% de Vitamina C. Murillo (2006) determina la cantidad de vitamina C de diversos jugos de frutas entre ellas la Mora, la Guanábana y la Piña, los valores oscilan entre el 0.25% y el 0.39%, colocando al fruto de la chupandilla por arriba de estos resultados, haciéndolo un fruto rico en vitamina C al tener un 0.44% de ésta vitamina por cada 100mL de jugo.

Respecto a la actividad antioxidante del fruto, (Figura 3) la CA_{50} para el extracto M1 es de 80.6 $\mu\text{g/mL}$, para el extracto M2 es de 69.7 $\mu\text{g/mL}$, y para el extracto hexánico es de 90.1 $\mu\text{g/mL}$; el control positivo (Catequina) tuvo una CA_{50} de 3.94 $\mu\text{g/mL}$, de acuerdo con Murillo (2006) las frutas contienen gran cantidad de compuestos polifenólicos, uno de ellos es la vitamina C o ácido ascórbico, que tiene la capacidad de atrapar radicales libres previniendo el proceso de oxidación celular. Sin embargo un grupo sumamente amplio que pertenece a los polifenoles son los flavonoides, la

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

catequina que se utilizó como control positivo pertenece a este grupo, que por sus características estructurales son considerados potentes inhibidores de la oxidación (Bravo, 1998); pero en muchos estudios *in vitro* los compuestos fenólicos han demostrado alta actividad antioxidante, incluso mayor que la representada por vitaminas (Re et al., 1999), lo cual concuerda ya que el fruto de la chupandilla no sólo contiene vitamina C, sino, que también tiene vitamina E, esta vitamina se encuentra en el extracto hexánico, sin embargo éste extracto no tiene una buena actividad antioxidante comparado con el extracto M1 y M2, por lo que el extracto M2 puede tener además de vitamina C, algunos polifenoles responsables de la actividad antioxidante, pues es el que mejor actividad antioxidante presenta de los tres extractos.

El rendimiento del extracto crudo del fruto de *C. procera* fue del 23.8%, a este extracto se le hizo una partición teniendo así que el extracto M2 fue el que tuvo mayor rendimiento con un 10.12% en comparación al extracto hexánico 0.47% (Cuadro 5, Figura 5). Estos resultados indican que el fruto presenta en mayor cantidad compuestos de naturaleza polar. Esto concuerda con Eleno (2010) que reporta una mayor cantidad de compuestos polares en el extracto del fruto inmaduro y maduro del fruto de *C. procera*, encontrando polifenoles, taninos, y flavonoides.

De acuerdo a los resultados de la actividad antibacteriana el extracto hexánico no presentó actividad sobre ninguna de las especies bacterianas ensayadas. Por otro lado los extractos M1 y M2, fueron activos tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Sin embargo hay diferencias significativas ($P \leq 0.05$; $F = 5.189$) entre la actividad de los extractos M1 y M2, pues como se observa en el cuadro 6 y figura 5, el extracto M2 es activo en 11 de las 13 cepas probadas, un dato importante es que el extracto es activo en 6 de las 8 cepas Gram negativas probadas, estos resultados son relevantes pues la mayoría de las enfermedades gastrointestinales son relacionadas con este grupo bacteriano (Chart, 2002; Foster, 2000; Mims et al, 1999), concordando con el uso tradicional reportado para este fruto. Las diferencias entre la sensibilidad de los grupos bacterianos probablemente se debe a la composición estructural de las

bacterias y a la susceptibilidad de cada cepa al extracto probado, ya que los péptido glucanos en el caso de las bacterias Gram positivas se encuentran inmersos en una matriz compuesta de ácidos teicoicos, teicurónicos y lipoteicos; confiriéndole a la pared celular una carga negativa neta, que es necesaria para que la célula pueda asimilar cationes divalentes, esta característica la hace más sensible a los compuestos polares, a diferencia de las Gram negativas en las que la membrana es más resistente a los disolventes orgánicos y menos permeable a las moléculas de carácter hidrofóbico (Cimanga et al., 2002; Gros et al., 1985; Nikaido y Nakae, 1979); además de la resistencia adquirida por las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, como por ejemplo la producción de β -lactamasas (Zampini et al., 2007).

En la determinación de la CMI y CBM de los extractos M1 y M2, (Cuadros 6), resultaron ser más sensibles las bacterias *V. cholerae* Tor y *S. aureus* 29213 (CMI y CBM: 4 y 8; CMI y CBM= 2 y 8 mg/mL respectivamente) al extracto M2, esto probablemente a que los compuestos responsables de la actividad antibacteriana se encuentran en mayor concentración, resultado de la partición con Hexanos (Katzung y Trevor 1997).

De acuerdo con los resultados a las curvas de crecimiento (figuras 6 y 7) un antimicrobiano se puede clasificar según su efecto como bactericida o bacteriostático; el extracto M1 resultó ser bacteriostático frente a *S. aureus* 29213 en todas las concentraciones ensayadas (2, 4 y 6mg/mL), y en *V. cholerae* Tor, es bacteriostático a concentraciones de 2, 4 y 8mg/mL y para el extracto M2 de igual forma el efecto es bacteriostático tanto para *S. aureus* 29213 (1, 2 y 8mg/mL) como para *V. cholerae* Tor (2, 4, y 8mg/mL). De acuerdo con Davis et al., (1996) la acción bactericida depende de la lesión irreversible de un elemento celular que no puede ser sustituido, como el ADN o la cubierta celular, otro punto de acción bactericida son las proteínas requeridas para la síntesis de ARN y los ribosomas.

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Esta actividad antibacteriana se le atribuye a diferentes compuestos, ya que en el análisis químico de los extractos M2 y Hexánico (Figura 12 y 13) se determinó Ácido linoléico, Quinolinona y ácido esteárico para el extracto M2. El ácido linoléico y el ácido esteárico desestabilizan la membrana celular de las bacterias Gram positivas haciéndola más permeable causando un estrés osmótico (Dantas et. al., 2002; Greenway y Dike, 1979) y de las Quinonas su mecanismo de acción está ampliamente estudiado pues son antibióticos cuyo blanco primario son la ADN girasa en organismos Gram negativos y la topoisomerasa IV en organismos Gram positivos, ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN donde la inhibición de estas funciones conduce a una muerte celular (Leyva y Leyva, 2008). Para el extracto Hexánico se determinó ácido palmítico que es un ácido graso saturado presente en todos los frutos y que no posee actividad antimicrobiana (Alenguer et al., 2002), también se determinó Vitamina E que es un antioxidante (Fernández et al., 2002), además también se determinó ácido linoléico, sin embargo a pesar de que se le atribuye actividad antibacteriana, éste extracto no presentó actividad antibacteriana, por lo que se sugiere que la combinación del ácido linoléico, ácido esteárico y las quinonas en conjunto son los responsables de dicha actividad del extracto M2 y por ende del extracto M1 ya que es el extracto que tiene los compuestos del extracto M2 y Hexánico.

Con respecto a la citotoxicidad, se utilizaron células Caski que es una línea celular derivada de carcinoma cervicouterino con secuencias integradas de HPV 16 y de acuerdo con los resultados se necesitan concentraciones menores del extracto hexánico del fruto de *C. procera* en comparación del extracto M1 y M2, pues con 9µg/mL, se alcanza la concentración letal media. Estos resultados concuerdan con Martínez (2009) y Rodríguez et al. (2006), pues ellos encontraron que el extracto hexánico de la corteza del árbol de donde proviene este fruto es tóxico y aunque utilizaron otro modelo biológico para probar sus extractos pues determinaron la toxicidad utilizando *Artemia salina* II, los resultados concuerdan (Cuadro 7 y Figura 8). Por lo que los resultados de citotoxicidad del fruto de *C. procera* de acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer (NCI) las concentraciones que son consideradas como

activas son de $\leq 20 \mu\text{g/mL}$ para los extractos y para los compuestos puros un valor de $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ (Vega-Ávila et al., 2009) y la citotoxicidad del extracto M1 es de $14.86 \mu\text{g/mL}$ y de M2 de $22.03 \mu\text{g/mL}$ así como del extracto hexánico antes mencionado entran dentro de los rangos de actividad, sugiriendo así que el extracto M1 y Hexánico son tóxicos, con lo cual se pueden proponer estos dos extractos como candidatos para realizar protocolos de cáncer y así referir otra propiedad del fruto de *C. procera* como anticancerígeno.

Por lo antes mencionado es posible catalogar al fruto de la Chupandilla como un nutraceutico ya que sus propiedades alimenticias son óptimas y presenta actividad antibacteriana, antioxidante y probablemente anticancerígena, validando así el uso etnomedicinal.

CONCLUSIONES

- El fruto de la Chupandilla posee carbohidratos, lípidos, proteínas y vitaminas en concentraciones adecuadas por lo que puede ser considerado como un alimento nutritivo.
- El extracto M1 y M2 del fruto inhibe el crecimiento bacteriano mostrando actividad bacteriostática sobre cepas Gram positivas y Gram negativas.
- El extracto M2 es estadísticamente más activo que el extracto M1.
- El extracto Hexánico no posee actividad antibacteriana.
- El extracto M2 no es tóxico de acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer.
- El Fruto de *C. procera* posee propiedades medicinales y nutricionales que lo hacen ser un producto nutraceutico.

PERSPECTIVAS

Es importante continuar el estudio del fruto de *C. procera* debido a que su uso no solo se limita a ser utilizado como alimento y medicinal, sino que se podría utilizar para otro tipo de afecciones, por lo que se propone realizar los siguientes estudios.

1. Seguir realizando estudios para la evaluación de otras actividades biológicas como antitumoral, cicatrizante y antiparasitarios.
2. Realizar una cromatografía para obtener la fracción más activa y determinar los compuestos responsables de la actividad antibacteriana
3. Complementar el estudio toxicológico utilizando otras líneas celulares, para implementar un estudio *in vivo*.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

Descripción botánica de la planta estudiada.

***Cyrtocarpa procera* (Kunth).**

Nombre común:

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

Botánica y ecología:

Árbol de 6 metros de altura o más alto, cubiertos con vellos. Las hojas parecen plumas; tienen un soporte que las une a los tallos, alados. Presentan racimos de flores blancas. Los frutos están cubiertos de pelos y miden 2 cm. de largo (Argueta y Cano, 1994) (Figura 13).

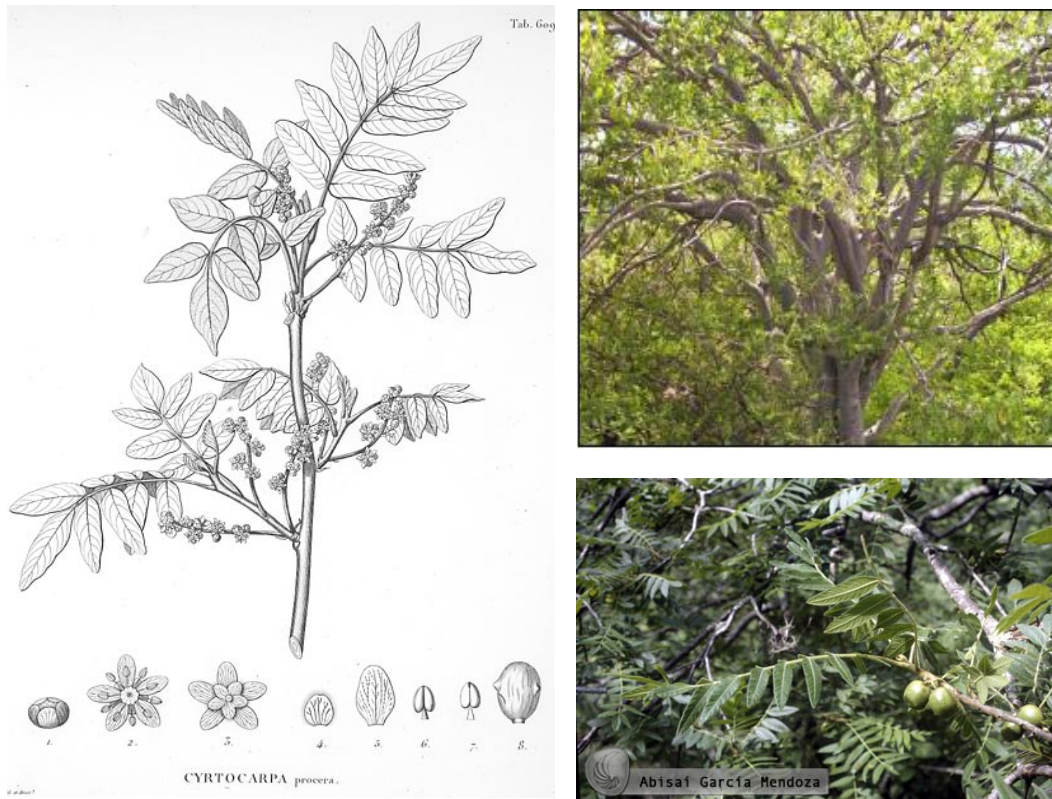


Figura 13: *Cyrtocarpa procera*

Originario de México. Habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado entre los 600 y los 1100 msnm. Planta silvestre, asociada a bosques tropicales caducifolio y subcaducifolio, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino y de pino (Argueta y Cano, 1994) (Figura 14).

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth



● Estados donde se localiza *C. procera*

Figura 14: Mapa de la distribución geográfica de *Cyrtocarpa procera*.

Etnobotánica y antropología:

Se usa comúnmente, en el Estado de México para resolver trastornos del aparato digestivo, tales como diarrea rebelde y disentería. La corteza es la parte de la planta que más se utiliza. Preparada en cocimiento junto con cuachalalate (*Juliania adstringens* (Schltdl) Schltdl) se emplea para lavar heridas y llagas, y lograr una cicatrización más rápida; administrada por vía oral, se usa para quitar el dolor de cintura en Nayarit. Se recomienda masticarla para curar el dolor de muelas y la tos, en Michoacán. Otros usos medicinales que recibe se refiere a bajar la fiebre y contra la lepra. Se le atribuyen propiedades afrodisíacas y astringentes (Argueta y Cano, 1994).

Historia:

En el siglo XVI, Francisco Hernández relata: “el fruto es muy astringente y destila una baba sumamente glutinosa; ésta, untada, cura las fiebres, se administra contra las disenterías y las diarreas. Para el siglo XX Maximino Martínez la mencionó como eficaz contra la lepra (Argueta y Cano, 1994) (Figura 15).



Figura 15: Fruto maduro de *C. procera*

Existen varios datos que sugieren que *Cyrtocarpa procera* tiene un efecto antidiarreico, antiinflamatorio, contra la tos, etc. la población la utiliza para estos malestares y otros (Argueta y Cano, 1994).

APÉNDICE 2:

Zona de colecta

El fruto de *C. procera* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m. (Figura 16).

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

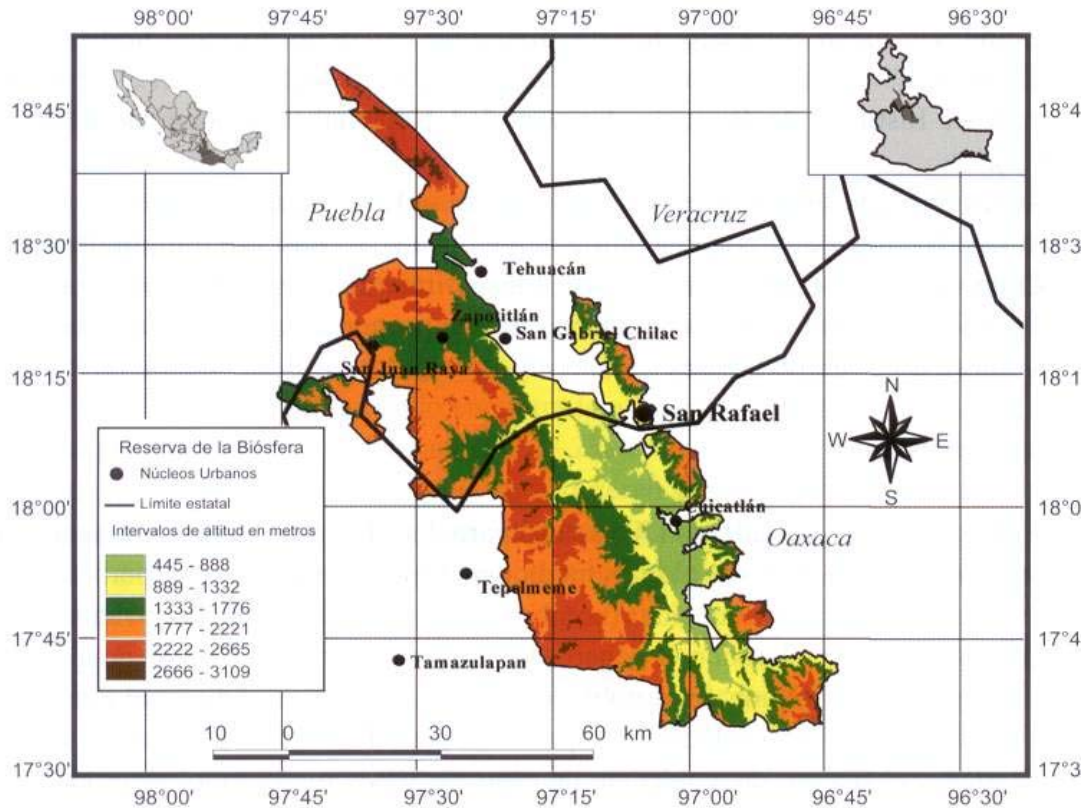


Figura 16: Ubicación geográfica del poblado de San Rafael

Clima

El clima es de tipo Bs (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.

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Fouqueria con especies dominantes como *Fouqueria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba 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.

La población.

La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) (Secretaría de Salud, 2001). La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importante es la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

APÉNDICE 3

Cuantificación de carbohidratos

(González y Peñalosa, 2000).

Extracción de carbohidratos de una muestra vegetal

Tejido Seco

1. Pesar 25 mg de muestra seca de fruto en un tubo de centrifuga de 50mL y se le agregan unas gotas de etanol al 80%.
2. Dispersar cuidadosamente en 5 mL de agua destilada
3. Extraer los compuestos solubles de bajo peso molecular con 25 mL de etanol al 80%.
4. Agitar, mantener en reposo por 5 minutos y centrifugar a 10 000 rpm por 15 minutos, extraer 3 veces más con 10mL de etanol caliente al 80%
5. Concentrar los sobrenadantes combinados.

Tejido fresco

1. Se pesan 100 µg de la pulpa del fruto y se le agregan 2mL de etanol frio al 80%
2. Se enfría en un baño de hielo por 15 minutos para precipitar proteínas.
3. Se centrifuga a 10000 rpm por 15 minutos, se decanta el sobrenadante y se evapora en vacío a sequedad.
4. Reconstituir en 5mL de agua destilada

Cuantificación de carbohidratos por el método de Nelson-Somogy

(González y Peñalosa, 2000).

Se hace reaccionar un azúcar reductora (como glucosa) se forma óxido cuproso de color rojo, debido a la donación de electrones del reductor al oxidante (el ión Cu^{2+} se transforma en ión Cu^+). Ya que el óxido cuproso precipitado insoluble no puede valorarse fotométricamente, por lo que se trata con reactivo de arsenomolibdato para transformarse a un ión verdoso que se mide en el fotocolorímetro.

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Al estar los reactivos en exceso el agente reductor es el factor limitante; por lo cual se puede usar para determinar la cantidad de Cu_2O que es proporcional a la cantidad de glucosa originalmente presente. La sensibilidad es de 25 a $250\mu\text{g/mL}$.

1. Se construye la siguiente serie de tubos:

	1	2	3	4	5	6
Patrón de glucosa (mL).	--	0.25	0.50	0.75	1.0	--
Agua destilada (mL).	1.0	0.75	0.50	0.25	--	--
Problema (mL).	--	--	--	--	--	1.0
Reactivo de cobre (mL).	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

2. Se tapan los tubos con papel aluminio y se colocan en baño maría hirviendo por 20 minutos, enfriar con agua corriente.
3. Se agrega a cada tubo 1mL del reactivo de arsenomolibdato.
4. Agregar a cada tubo 7.5mL de agua destilada.
5. Mezclar por inversión cada tubo y leer en el fotocolorímetro a 565nm utilizando el tubo 1 como blanco.
6. Se construye una curva patrón y se interpola la absorbancia de los tubos problema.

Patrón de glucosa (200 $\mu\text{g/mL}$).

Disolver $600\mu\text{g}$ de glucosa en 3mL de agua destilada.

Reactivo de Cobre

400mL de agua destilada + 40g de carbonato de sodio anhidro y disolver. Agregar 7.5gr. de ácido tartárico y disolver otra vez. Enfriar si es necesario. Agregar 4.5g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y disolver. Aforar a 1L y envasar en frasco ámbar. Dejar madurar por 2 semanas.

Reactivo de Arsenomolibdato

Disolver 50gr. de molibdato de amonio en 900 mL de agua destilada, agregar 42mL de H_2SO_4 concentrado lentamente y añadir 50 mL de solución de ortoarseniato disódico al 12% (NaHA_5O_4). Mezclar bien e incubar a 37°C durante 24 a 48 horas. Envasar en frasco ámbar.

APÉNDICE 4

Determinación de Carbohidratos por cromatografía de alta resolución (HPLC).

La cromatografía es una técnica de separación extraordinariamente versátil que presenta distintas variantes. En toda separación cromatográfica hay dos fases (sólida, líquida o gas) una móvil y otra estacionaria, que se mueven una con respecto de la otra manteniendo un contacto íntimo. La muestra se introduce en la fase móvil y los componentes de la muestra se distribuyen entre la fase estacionaria y la móvil. Los componentes de la mezcla a separar invierten un tiempo diferente en recorrer cada una de las fases, con lo que se produce la separación.

Para esta determinación se pesan 0.01gr de muestra seca del fruto y se agregan 5ml de agua destilada, se homogeniza muy bien, se centrifuga a 14000 rpm por 2 minutos, se inyectan 30µl del sobrenadante al HPLC, el cual tiene una columna para carbohidratos (SUPELCOGEL™ Ca) de 30cm x 7.8 mm, la fase móvil es agua y está acoplado a un detector de refracción de la luz.

El cromatograma es comparado con muestras patrón, en este caso fueron utilizadas Fructosa, Sacarosa, Maltosa, Inulina y Glucosa, estos patrones se prepararon pesando 1mg diluyéndolo en 1mL de agua destilada y se inyectaron de igual forma 30µL al HPLC.

Para determinar si estaban presentes estos patrones en la muestra del fruto, se solaparon los cromatogramas con ayuda del programa Instrument (On line) Method & Run control, se compararon los tiempos de retención y longitud de refracción y finalmente se calculó el contenido de cada compuesto con la altura de cada pico.

APÉNDICE 5

Cuantificación de Proteínas por el método de Bradford.

(González y Peñalosa, 2000).

Para la extracción de proteínas se pesan 10gr del fruto (cáscara y pulpa) y se homogeniza en un mortero con 2mL de la solución Tris-HCl 50mM a pH=7.3 con PVP al 0.1%, depositar en un tubo microcentrífuga y centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos.

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Se recupera el sobrenadante para realizar la cuantificación por el método de Bradford, se prepara la siguiente serie de tubos.

	1	2	3	4	5	6	7
Patrón de BSA (mL).	--	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	--
Agua destilada (mL).	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	1.0
Problema (mL).	--	--	--	--	--	--	100 μ L
Reactivo de Bradford (mL).	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

BSA: *álbumina bovina sérica*

Mezclar bien cada tubo y leer en el espectrofotómetro a 595nm.

Reactivo de Bradford

Pesar 100mg. de Azul de Commasie G250 y disolver en 50mL de etanol al 96%, agregar 100mL de ácido fosfórico al 85% y aforar a 1L con agua destilada, filtrar y almacenar en frasco ámbar, madurar durante 12 horas.

APÉNDICE 6

Determinación del ácido Ascórbico (Vitamina C).

(Murillo, 2006).

Principio

El ácido ascórbico es determinado por titulación con el indicador 2, 6-diclorofenolindofenol, el cual es reducido por el ácido ascórbico a una forma incolora

Reactivo

Solución de 2,6 –diclorofenolindofenol: Disuelva 800mg del indicador en cerca de 500 ml de agua caliente recientemente hervida. Si es necesario filtre y complete 1l con agua destilada. Guarde bajo refrigeración en una botella oscura. Use dentro de 7 días.

Ácido Acético 10%

Patrón de ácido ascórbico: se diluyen 100 mg. de ácido ascórbico en 100 mL de agua destilada.

Procedimiento

Pipetee 2mL de la solución patrón de ácido ascórbico en un Erlenmeyer de 250mL, adición 10mL de ácido acético al 10% y 50 mL de agua destilada. Titule el contenido de Erlenmeyer con la solución de 2,6 diclorofenol indofenol, hasta que un color ligeramente rosado persista por 15 segundos. Calcule los mg. de ácido ascórbico que son equivalentes con 1mL de indicador. Titule 10mL del jugo de la fruta de la misma manera que el patrón. Calcule la cantidad de ácido ascórbico en 100mL del jugo de la fruta.

APÉNDICE 7

Método de difusión en agar de Kirby-Bauer

(Vanden Berghe y Vlietinck, 1991)

Este método se utiliza para evaluar cualitativamente la actividad antibacteriana de los extractos y de las fracciones obtenidas de las cromatografías.

Medio.

Se utiliza como medio de cultivo estándar el agar Müller-Hinton. Es importante que el medio alcance en la placa un espesor uniforme de 4 mm. Si es más fino, los 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.

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 Muller-Hinton, 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, o hasta que la turbidez del medio sea

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

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 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 640 nm.

Una vez logrado esto, se sumerge un hisopo de poliéster, estéril y seco en la suspensión de levadura, antes de retirarlos se elimina el exceso de líquido haciendo rotar el hisopo contra la pared interna del tubo. Con este hisopo se inocula la superficie de una placa con agar de Müller-Hinton. Previamente, se deja que la placa alcance temperatura ambiente; 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.

Aplicación de sustancias.

Se utilizaron sensidiscos de 5 mm de diámetro hechos de papel Whatman del N° 5. En todos los casos se hacen diluciones para que los sensidiscos lleven la cantidad deseada de producto. Se utilizan 2 mg de los extractos disueltos en 10 mL del solvente correspondiente a cada extracto. Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad, los discos impregnados con las sustancias a evaluar se colocarán en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril y deben colocarse por lo menos a 22 mm uno de otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los sensidiscos se deben presionar suavemente con la punta de la pinza, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar. Sobre cada sensidisco se coloca la concentración de cada extracto a evaluar. Los sensidiscos se preparan 24 horas antes del bioensayo.

Control negativo.

Sensidiscos a los que se les agrega $10 \mu\text{L}$ del solvente empleado para disolver el problema.

Control positivo.

Se evalúa la sensibilidad de las cepas experimentales con sensidiscos impregnados con 25 µg de cloranfenicol.

Incubación.

Una vez preparadas convenientemente las placas para la prueba de susceptibilidad, se colocan en una incubadora a 36 °C, sin mayor tensión de CO₂. Es preciso evitar presión de CO₂ debido a que se puede formar ácido carbónico en la superficie humedecida del agar, provocando un descenso de pH. El desarrollo de algunos microorganismos es debido al pH ácido, lo cual tiende a estrechar falsamente la zona de inhibición. Así mismo, la actividad de diversos antibióticos puede aumentar o disminuir con la caída del pH, produciéndose diferencias en las velocidades de difusión y alteraciones de las zonas de inhibición.

Interpretación de resultados.

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

Propiedades Nutraceuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

APÉNDICE 8

Microtécnica de dilución en caldo

(Koneman, 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).

Medio.

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

Inóculo.

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

Control negativo.

Como control negativo se coloca 50 µL de caldo Müller-Hinton con el solvente empleado para disolver el problema.

Testigo.

El testigo se prepara colocando 50 µL de caldo Müller-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 durante la incubación. Todas las placas se incuban a 35°C durante 24 horas.

Interpretación de resultados.

Después del tiempo de incubación se añade a cada concavidad 50µL 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 color rojo visible, produciendo un botón rojo en el fondo de la concavidad. Donde no hay desarrollo, la solución permanece clara.

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

APÉNDICE 9

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 y las fracciones de las cromatografías sobre el crecimiento bacteriano, basándose en las CMI y CBM y así determinar los impactos necesarios para que se produzca la inactivación.

Medio.

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

Propiedades Nutraceuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Inóculo.

Se prepara el inóculo con aproximadamente 1×10^8 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 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 CO_2 .

Aplicación de sustancias.

Se prepara en tubos con 10 mL de caldo Müller-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: T_0-0 , T_1-1 , T_2-2 , T_3-3 , T_4-4 (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.

Testigo.

Se prepara un tubo sin extracto como testigo.

Incubación.

Las cajas se incuban durante 24 hrs 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, se prolonga la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su inserción con el eje de las ordenadas.

APÉNDICE 10

Método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH)

(Okusa et al., 2007)

La actividad antioxidante se evalúa midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (2-100 ppm), por medio de espectrometría UV-VIS.

Aplicación de sustancias.

En una placa de ELISA se adicionan 50 µl de la solución problema a diferentes concentraciones (2-30 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 517 nm en un lector de ELISA.

Control negativo.

Pozos con 200 µl de metanol.

Control positivo.

Se utiliza quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Interpretación de resultados.

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

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

En donde:

C= Absorbancia del control positivo

E= Absorbancia del experimental (Mezcla DPPH + compuesto problema)

APÉNDICE 11

Citotoxicidad

La citotoxicidad se realiza mediante la técnica de cristal violeta, en la cual se utilizan células CASKI (células epiteliales tumorales de cérvix) éstas se ponen a proliferar en medio de cultivo RPMI enriquecido con suero fetal Bovino al 10% y 0.5mL de antibiótico (GIBCO 15240), una vez saturada la caja de cultivo se despegan las células con 1mL de tripsina-verseno al 0.05%, se centrifugan para ser cultivadas en placas de Elisa de 96 pozos, con 30 000 células por pozo, las cuales se dejan reposar por 2 horas para que se adhirieran a la placa a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de CO₂ del 5% y 95% de aire una vez que se adhirieron a la placa se le añaden concentraciones seriadas de los extractos del fruto de 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.81, 3.90, 1.95, 0.97, 0.48, 0.24 µg por pozo y se dejaron interactuar por 24 hrs, posteriormente se lavan con PBS 1x, y se fijaron con 30 µL por pozo de glutaraldehído al 1.1% por 10 minutos, las placas fueron lavadas y secadas al aire. Se añadieron 50µL/pozo del colorante cristal violeta al 0.1% en solución amortiguadora de ácido fórmico pH 6.0 y se mantuvieron por 10 minutos en agitación. Después de la tinción se lavan 3 veces las cajas de cultivo con agua de tal manera que el colorante no

asimilado sea retirado de los pozos. Posteriormente se añaden 50µl/pozo de ácido acético al 10% dejando en agitación constante por 20 minutos a temperatura ambiente para desteñir las células y que el colorante quede en suspensión de forma homogénea. Posteriormente se tomaron las lecturas de cada pozo en un lector de placas de ELISA (Elx800; Bio-Tek) a 595nm. Como dato importante TODO se hace en condiciones de esterilidad.

Preparación del colorante cristal violeta

La solución de cristal violeta se prepara al 0.1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200mM pH 6; la cual consiste en agregar 3.96gr de NaOH y 4.28 mL de ácido fórmico aforados a 500mL con agua bidestilada. Una vez preparada la solución de cristal violeta es filtrada y posteriormente usada.

Tripsina al 0.5%

La tripsina se utiliza para desprender a las células de las placas de cultivo. Éste se prepara disolviendo 0.025g de tripsina (Sigma, USA) en 500mL de verseno, todo en condiciones de esterilidad.

Verseno

Generalmente, esta solución se emplea para disolver la tripsina y poder desprender a las células adherentes. Sus componentes son los siguientes:

Tris base	3.04g
Cloruro de sodio	8.00g
Cloruro de potasio	0.40g
Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA)	0.40g

Los reactivos se disuelven en 800mL de agua destilada, el pH se ajusta a 7.7 con HCl y se afora a 1L. esta solución se esteriliza con autoclave.

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Desactivación del la tripsina

Se toma una botella de suero fetal de Bovino (Hyclone, USA) y se coloca en baño de agua a temperatura ambiente para ser descongelada, posteriormente se pasa a un baño maría a 57°C durante 30min. Posteriormente es trasvasado en alícuotas de 10mL para su mejor uso, y se agrega 1mL para desactivar la tripsina.

REFERENCIAS

- Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, S., Jacquez, P. y López, M. E.** 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. IMSS. México.
- Alenguer, A. O., Vásquez, R. C., Abel, del C., Wilson, G.** 2002. Extracción y caracterización de ácidos grasos de la Especie *Grias neuberthii* macht (sachamango). Revista Amazónica de Investigación Alimentaria. 2: 103-106.
- Argueta, V. A. y Cano, A. J.** 1994. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista, México. 1193 pp.
- Alenguer,
- Ávila, J. G.** 1996. Actividad anti-*Vibrio cholerae* de dos plantas utilizadas en la medicina tradicional purépecha. Tesis de maestría. FES-Cuatitlán. UNAM. México.
- Badui, D. S.** 1999. Química de los alimentos. 3era Edición. Ed. Pearson Educación. México, D.F. 646 pp.
- Bermúdez, A. y Velásquez, D.** 2002. "Etnobotánica médica de una comunidad campesina del estado de Trujillo, Venezuela: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas". Revista de la Facultad de Farmacia 44 (1): 2-6.

Biruete, G. A., Juárez, H. E., Sieiro, O.E., Romero, V. R., Silencio, B. J. L. 2009. Los nutraceuticos. Lo que es conveniente saber. *Revista Mexicana de Pediatría* 76 (3):136-145.

Boletín de Epidemiología. 2010. Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Aparato Digestivo. Dirección de Información Epidemiológica. México. 28 pp.

Bravo, L. 1998. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56: 317-326

Cáceres A, Fletes L, Aguilar L. 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. *Journal of Ethnopharmacology* 38: 31-8.

Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., Romo de Vivar, A., Avila, G., Duran, A., Lira, R. 2005. Informal consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 429–439.

Canales, M. M. M. 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.

Chart, H. 2002. Escherichia. Greenwood, D., Slack, C. B. R y Peutherer F. J. En: *A guide to microbial infections: medical Microbiology pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control*. Edición 16°. Editorial. Churchill Livingstone. 265-267 pp.

Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers. S., De Bruney, T., Hermans, N., Totté, J., Pieters, L. y Vlietinck, A. J. 2002. Correlation between chemical composition and

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocarpa procera* Kunth

antibacterial activity of essential oils some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republica of Congo. Journal of Ethnopharmacology 79, 213-220.

Dantas D. S., L. L., Nascimento, M., Siqueira, S. D. H., Furlan, M., da Silva, B. V. 2002. Antibacterial activity of a stearic acid derivative from *Stemodia foliosa*. *Planta Medica* (12), 1137-9

Das, B., Yeger, H., Baruchel, H., Feedman, M. H., Koren, G., Baruchel, S. 2003. In vitro citoprotective activity of squalene on a bone marrow versus neuroblastoma model of cisplatin-induced toxicity: implications in cancer chemotherapy. *European Journal of Cancer* 39, 56-65

Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N y Ginsberg, H.S. 1996. Tratado de Microbiología. 4ª edición. Editorial Masson, S.A. Barcelona. 1559 pp.

Dominguez, A. X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Primera edición. Editorial Limusa. México. 3-17 pp.

Eleno, M. G. 2010. Actividad antibacteriana, antioxidante y toxicidad del fruto (en diferentes estados de maduración) y la hoja de *Cyrtocarpa procera* Kunth (Chupandilla). Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Edo. De Méx. 89 pp.

Feresin, G.E., Tapia, A.A., y Bustos, D.A. 2000. Antibacterial activity of some medicinal plants from San Juan, Argentina. *Fitoterapia* 71, 429- 432.

Fernández, B. Ma. N. 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis de maestría. UNAM, México. 98 pp.

- Fernández, F. C., Soto, F. C. Saldaña, B. A., García, T. B. E.** 2002. Funciones de la Vitamina E, Actualización. Revista Cubana de Estomatología. 39: 28-32.
- Foster, T. J.** 2000. *Staphylococcus*. En: Samuel Baron. Medical microbiology. Section I bacteriology. Capítulo 12. Cuarta edición. Graduate school of biomedical sciences. University of Texas Medical Branch. USA.
- García, E.,** 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koopen. Instituto de Geografía, UNAM, México. 252 pp.
- Garrido-Garrido, G.** 2010. *Mangifera Indica* (Mango). Ed. Universidad de Cuba. La Habana Cuba. 3 pp.
- Giudice, G., Fragapane, E., Bugarini, R., Hora, M., Henriksson, T., Palla, E., O'Hagan, D., Donnelly, J., Rappuoli, R., Podda, A.** 2006. Vaccines with the MF59 Adjuvant Do Not Stimulate Antibody Responses against Squalene. Clinical Vaccine Immunology 13, 1010–1013.
- González, M. S., Peñalosa, C. I.** 2000. Biología (Métodos de Análisis). Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Izatacala, Edo. De México. 256 pp.
- González, M. S., Peñalosa, C. I., Perales, V. H. V., Salcedo, M. O., Sánchez, C. S., Vázquez, M. J., Quintanar, Z. R., Delfín, A. I., Chino, V. S., Moreno, C. R.** 2007. Biomoléculas (Manual de Laboratorio). UNAM, FES-Iztacala. Edo. Méx. 123 pp.
- Granner, D. K.** 2000. Hormones of the adrenal cortex, *In*: R. K. Murray, D. K. Granner, P. A. Mayes, and V. W. Rodwell. Harper's biochemistry. 25th edition. Ed. Appleton and Lang, Stanford, Conn. 575-587 pp.

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocapa procera* Kunth

Greenway, D. L. A., Dyke, K. G. H. 1979. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Microbiology* 115, 233-245.

Gros, G. E. Pomilio, A. Burton, G. 1985. Introducción al estudio de los productos naturales. Secretaría general de los Estados Americanos. Programa de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington. 147 pp.

Jagota, S., Dani, H. 1982. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin Phenol Reagent. *Anal Biochemistry*. 127: 178-182.

Joyeux, M., Lobstein, A., Anton, R. y Mortier, K. 1995. Comparative antilipoperoxidant, antinecrotic and scavenging properties of terpenes and biflavones from *Ginkgo* and some flavonoids. *Planta Medica*. 61(2):6-129.

Katzung, G. B., Trevor. J. A. 1997. *Farmacología: auto evaluación y repaso*. 2ª edición. Editorial. El manual moderno. México. México. 851 pp.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R. y Sommers, H. M. (1985). *Diagnóstico microbiológico*. Ed. Médica Panamericana, México. 909 pp.

Leyva S., Leyva, E. 2008. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Boletín Sociedad Química de México*. 2 (1): 1-13.

Maiga, A., Malterud, K.E., Diallo, D., Paulsen, B. S. 2006. Antioxidant and 15-lipoxygenase inhibitory activities of the Malian medicinal plants *Diospyros abyssinica* (Hiern) F. White (Ebenaceae), *Lannea velutina* A. Rich (Anacardiaceae) and

Crossopteryx febrifuga (Afzel) Benth. (Rubiaceae). Journal of Ethnopharmacology 8, 132-137.

Martínez, E. K. S. 2009. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la corteza de *Cyrtocarpa procera* Kunth (Chupandilla). Tesis de Licenciatura. Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México. 62 pp.

Mathiesen, L., Malterud, K.E. and Sund, R.B. 1995. Antioxidant activity of fruit exudates and C-methylated dihydrochalcones from *Myrica gale*. Planta Médica. 61(6): 515-518.

McLaughlin, J.L. 1991. Crown gall tumors on potato disc and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In: Dey, P.M., Harborne, J.B., Hostettman, K. (Ed.), Methods in plant Biochemistry Assays for Bioactivity, 6. Academic Press, San Diego, pp. 1-32.

Medina, S. J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis Licenciatura Biología. UNAM, Facultad de Ciencias, México. 1-6, 35 pp.

Mims, C., Playfair, J., Roitt, I., Wakelín, D., Williams, R. 1999. Microbiología Medica. Ed. Harcourt. Barcelona. España. 430-540 pp.

Montes, A. L. 1966. Bromatología. Vol. 1. Ed. Universitaria de Buenos Aires. Argentina.

Murillo, F. 2006. Actividad antioxidante «in vitro» de las bebidas de frutas. Revista Tecnología. Alfa Editores Técnicos. 20-27 pp.

Propiedades Nutracéuticas del Fruto de *Cyrtocarpa procera* Kunth

Muroi, M., Shiragami, N., Nagao, K., Yamasaki, M. y 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.

Nikaido, H y Nakae, T. 1979. The outer membrane of gram-negative bacteria. *Advances in microbial physiology* 20, 163-250.

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.

Ojewole, J. A. 2005. Antiinflammatory, analgesic and hypoglycemic effects of *Mangifera indica* Linn. (Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27(8), 547-54.

Pijoan, M. 2003. *Medicina y etnobotánica Aztecas*. *Offarm.* 22 (9): 128-136

Rabe, T. y Van Staden, J. 1997. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *Journal of Ethnopharmacology* 56, 81-87.

Ramírez, G. X. S., 2009. Alimentos funcionales, etnobotánica y nutrición. *Ide@s CONCYTEG* 4 (49), 1-5.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231-1237.

Rodríguez-López, V., Aguirre-Crespo., Salazar, R., Estrada-Soto, S. 2006. Identification of fatty acid esters and hydrocarbon derivatives from *Cyrtocarpa procera* Kunth by GC–MS. *Natural Product Research* 20 (1), 1-7.

- Rosas, L. R.** 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Tlalnepantla, México. 94 pp.
- Saavedra, S.** 2000. Ácidos grasos. Importancia. Ed. Facultad de Agronomía. España. 11 pp.
- Salcedo-Sánchez, B.** 1997. Insectos precortesianos de la cuenca de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de licenciatura, Biología, UNAM. Facultad de Ciencias. 6-10 pp.
- Smith, T. J., Yang, G.Y., Seril, D. N., Liao, J., Kim, S.** 1998. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis* 19, 703-706.
- Valenzuela, A.** 2006. Los fitoesteroides: Aliados naturales para la protección de La salud cardiovascular. Ed. Universidad de Chile. Chile. 9 pp.
- Valiente, B. L.** 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis UNAM, México. 65 pp.
- Valiente- Banuet, A., Alcántara, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arizmendi, M. C., Ortega-Ramírez, J., Soriano, J. A.** 2000. La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 67, 25-75.
- Vanden Berghe, D. A., Vlietinck, A. J.** 1991. Screening methods for antibacterial agents from higher plants. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol. 6 "Assays for Bioactivity". Edited by Hostettmann, K. Series editor Dey P. M. Academic Press. New York, USA. 47-71 pp.

Propiedades Nutraceuticas del Fruto de *Cyrtocarpa procera* Kunth

Vega-Avila, E., Espejo-Serna, A., Alarcón-Aguilar, F. and Velasco-Lezama, R. 2009. Cytotoxic Activity of Four Mexican Medicinal Plants. Proceedings of the Western Pharmacology Society. 52: 78-82.

Villanueva, C. C. 2006. Caracterización parcial y evaluación de la estabilidad de la pulpa del fruto de *Cyrtocarpa procera* conservada por métodos combinados. Tesis de Licenciatura. Ingeniería en Alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Oaxaca. 74 pp.

Zampini, I. C., Cudmani, N., Islas, M. I., 2007. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales Argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. 41 (003): 385-393.

Zeola, B. T., y Ramos, C. A. 2008. Nutraceuticos. Revista de la Organización de Farmacéuticos Ibero-Latinoamericanos.18(3):37-42.