

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

**Evaluación de la Capacidad Antioxidante y Antimicrobiana de
los Extractos de Barchata (*Ziziphus obtusifolia*)**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Mei-Li Ayda Portela Márquez

1942

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Mei-Li Ayda Portela Márquez**, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de **Químico Biólogo Clínico**.

Dra. Norma Patricia Silva Beltrán
Directora de Tesis

Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz
Secretario

Dra. Luz Angélica Avila Villa
Vocal

Dr. Marco Antonio López Mata
Suplente

DEDICATORIA

A mi hija

Dedico esta tesis con mucho cariño a mi hija Nubia, que es la razón de ser de mi preparación y de mi esfuerzo, quién estuvo conmigo a lo largo de mi carrera. Tuvo que soportar largas horas sin mi compañía, sin poder entender a su corta edad, que todo es para ofrecerte siempre lo mejor. Ella es el impulso y la principal motivación para superarme día con día. Te amo hija mía.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, le agradezco a Dios por protegerme durante todo el camino y por haberme dado fuerzas y valor para culminar esta etapa de mi vida.

A mi hija Nubia quién fue la principal motivación y el motor para salir adelante en ésta carrera.

Agradezco también el apoyo y la confianza por parte de mi madre Ayda, que sin duda alguna en el trayecto de mi vida me ha demostrado su amor, corrigiendo mis faltas y celebrando mis triunfos.

A mi esposo Manuel por su amor, ayuda y comprensión, además por creer en mi durante este proyecto de vida que servirá para el futuro de la familia que hemos formado.

A mis hermanos Jorge y Raziel quienes siempre han estado conmigo y con los que he compartido muchos momentos tanto felices como difíciles.

A mi padre Horacio, que ha estado presente en mi vida, y que sé que está orgulloso en la persona en la cual me he convertido.

A mi abuela Socorro quien es como una segunda madre y quién junto a mis tíos Quirino y Andrés me han brindado su apoyo y cariño. Le doy un agradecimiento especial a mi tío Efraín quién con su ayuda, cariño y comprensión hizo posible esta importante etapa.

Agradezco a mi directora de tesis la Dra. Norma Patricia Silva por brindarme su ayuda, atención y paciencia a lo largo del trayecto en la realización del presente proyecto.

A mis sínodos, el Dr. Juan Carlos Gálvez, la Dra. Angélica Avila y el Dr Marco López por su gran apoyo en la elaboración de ésta tesis.

A la Universidad de Sonora por brindarme la oportunidad de estudiar esta hermosa carrera que es Químico Biólogo Clínico.

Al Centro de Investigación e Innovación en Biotecnología, Agropecuaria y Ambiental CIIBA por otorgarme el acceso a las instalaciones de éste centro y al Dr Saúl Ruíz, quién me permitió trabajar en el laboratorio de microbiología para la realización del presente proyecto.

Quiero agradecer a mis amigas Lupita, Elizabeth, Muñeca, Lizbeth y Gladys por brindarme su valiosa amistad y su apoyo incondicional durante éste importante trayecto.

CONTENIDO

FORMA DE APROBACIÓN	2
DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	13
General	13
Específicos	13
REVISIÓN DE LA LITERATURA	14
Generalidades de la Barchata	14
Distribución de la Barchata en México	14
Propiedades Terapéuticas de las Especies Pertenecientes al Género <i>Ziziphus</i>	15
Plantas Medicinales	16
Extractos Naturales	16
Compuestos Bioactivos Presentes en Extractos de Plantas	17
Métodos para Obtención de Extractos	17
Antioxidantes	18
Estrés oxidativo	19
Eritrocitos y su daño oxidativo	19
Métodos para Medir Capacidad Antioxidante	20
Método del DPPH	20
Método de ABTS	21
Prueba de hemólisis	22
Actividad Antimicrobiana	23
<i>Escherichia coli</i>	23
<i>Staphylococcus aureus</i>	25

Método para Medir Capacidad Antibacteriana (Antibiograma Disco-Placa)	26
Actividad Antiviral	26
Virus	27
Bacteriófago Av08	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Preparación de los Extractos	29
Capacidad Antioxidante	30
Inhibición del radical DPPH (2,2-diphenil-1-picryl hidrazilo)	30
Inhibición del radical ABTS (2,2'- azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)	30
Evaluación del efecto protector sobre eritrocitos humanos	31
Capacidad Antiviral	32
Identificación de bacteriófagos	32
Propagación del bacteriófago	33
Cuantificación del bacteriófago	33
Ensayo Antiviral	33
Capacidad Antibacteriana	35
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	35
Preparación de medios	35
Prueba de susceptibilidad microbiana (Disco-Placa)	35
Análisis Estadístico	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
Capacidad Antioxidante Mediante el Método DPPH y ABTS	37
Capacidad Antioxidante Mediante la Prueba de Hemólisis	39
Capacidad Antibacteriana	41
Capacidad Antiviral	43
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Capacidad antibacteriana de los extractos de <i>Z. obtusifolia</i>	42

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	<i>Ziziphus obtusifolia</i>	14
2	Zonas endémicas de <i>Z. obtusifolia</i>	15
3	Reacción del 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)	21
4	a) Formación del radical ABTS b) reacción del catión radical ABTS con compuesto fenólicos	22
5	<i>E. coli</i> (tinción Gram)	24
6	<i>Staphylococcus</i> spp (tinción Gram)	25
7	Bacteriófago Av08	28
8	a) Extracto acuoso de barchata b) Extracto etanólico de barchata concentrándose en rotavapor	29
9	Técnica de la evaluación antioxidante por el radical DPPH	30
10	Técnica de evaluación de la capacidad antioxidante por el radical ABTS	31
11	Evaluación de la capacidad protectora del eritrocito humano	32
12	Unidades formadoras de placa del bacteriófago Av08	34
13	Placas inoculadas con bacterias y extracto	35
14	Capacidad antioxidante por medio del ensayo DPPH de extractos Ac y EtOH-ac de barchata (<i>Z. obtusifolia</i>)	37
15	Capacidad antioxidante por medio del ensayo ABTS de los extractos acuosos y etanólicos de las ramas de barchata (<i>Z. obtusifolia</i>)	38
16	Capacidad antioxidante por medio del ensayo de % de inhibición de hemólisis inducida mediante AAPH de extractos acuosos y etanólicos acidificados de barchata (<i>Z. obtusifolia</i>)	40
17	Halos de inhibición causados por el extracto EtOH-ac sobre <i>E. coli</i> O157	42
18	Reducción del bacteriófago Av08 por el extracto EtOH-ac	43
19	Actividad antiviral de los extractos etanólicos de <i>Ziziphus obtusifolia</i> medida por la reducción en Log ₁₀ UFP/mL para los tiempos de contacto 0, 30 y 60 minutos a dos concentraciones 5 mg/mL y 10 mg/mL	44
20	Actividad antiviral de los extractos acuosos de <i>Ziziphus obtusifolia</i> medida por la reducción en Log ₁₀ UFP/mL para los tiempos de contacto 0, 30 y 60 minutos a dos concentraciones 5 mg/mL y 10 mg/mL	45

RESUMEN

La barchata (*Ziziphus obtusifolia*) es un arbusto muy común en el noroeste de México. Sonora es una región endémica de dicha especie. En la actualidad esta planta se utiliza para combatir diversos padecimientos gastrointestinales y degenerativos como el cáncer. Existen pocos estudios sobre esta especie. Sin embargo, la familia *Ziziphus*, ha sido ampliamente estudiada por sus capacidades benéficas a la salud humana. En el presente trabajo se evaluó la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos obtenidos de barchata. Para este estudio se realizaron extractos con diferentes solventes: etanol acidificado (EtOH-ac) y agua (Ac). A cada extracto se le evaluó la capacidad antioxidante y fue medida por medio de la inhibición del radical ABTS, DPPH y la prueba de inhibición de hemólisis. La capacidad antimicrobiana se realizó por medio de la prueba de susceptibilidad bacteriana en las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y en paralelo se evaluó el efecto antiviral utilizando al bacteriófago Av08 como modelo enteroviral. Los extractos Ac y EtOH-ac, inhibieron los radicales ABTS y DPPH mostrando valores desde 17.41 ± 0.02 a 25.03 ± 3.73 mmol/ETge, respectivamente, en la prueba de hemólisis se encontraron porcentajes más elevados en el extracto Ac con 46.3% sobre el etanólico que fue de 36.8% de inhibición. La capacidad para inhibir las bacterias *E. coli* y *S. aureus* arrojaron valores de halos de inhibición de 8.00 a 12.90 mm de diámetro para ambos extractos. En el ensayo antiviral se pudo observar que el extracto Ac en la concentración 10 mg/mL y tiempo de 60 minutos presentó una reducción de hasta $7.40 \log_{10}$ UFP/mL del bacteriófago Av08. Estos resultados sugieren la presencia de varios compuestos bioactivos con potencial antioxidante y antimicrobiano sobre bacterias y virus de interés clínico; así como, efecto protector de los extractos acuosos sobre el eritrocito humano.

INTRODUCCIÓN

El valor medicinal de las plantas se ha hecho más evidente durante las últimas décadas, debido, en gran parte, al descubrimiento de una gran variedad de metabolitos secundarios de las plantas con un potencial antioxidante (Daniels, 2011). Entre los varios componentes de las plantas, los compuestos fenólicos son un objeto de especial interés debido a su pronunciada distribución y gran capacidad antioxidante en el reino vegetal. Las plantas contienen un grupo diverso de compuestos bioactivos, incluyendo fenoles simples, flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas y muchos otros. Muchas sustancias bioactivas pueden tener propiedades relacionadas con la salud, como anti-inflamatorio (Borgia, 2008) antibacteriano (Pepeljnjak, 2005). Las enfermedades coronarias, cancerosas y neurodegenerativas (por ejemplo Parkinson y de Alzheimer), además de envejecimiento en general, son sólo algunos ejemplos de padecimientos o condiciones de salud que pueden ser efectivamente impedido a través de la ingesta regular y equilibrada de antioxidantes (Bamforth, 2002).

Ziziphus obtusifolia es comúnmente conocida como barchata y es un arbusto perteneciente a la familia de las *Rhamnaceae* muy común en el norte de México y principalmente en el estado de Sonora. No hay estudios concretos de esta especie en específico, únicamente se le clasificó con especies de alto contenido proteico como planta forrajera (Bowers y Wignall, 1993). En el 2014 Sharma y col. realizaron una revisión de las propiedades terapéuticas, de las distintas especies de *Ziziphus* y encontraron que las hojas, frutos, semillas, cortezas y raíces de esta especie tienen una enorme posición en la innovación de nuevos agentes terapéuticos para el desarrollo de fármacos. Adicionalmente existe una demanda comercial creciente para *Ziziphus* debido a su potencial aplicación en la salud humana.

Las especies pertenecientes al género *Ziziphus* contiene sustancias con poder analgésico, antiinflamatorio, antibacteriano, antioxidante, y también contiene varios fitoquímicos tales como saponinas, pectina, ácidos grasos, y alcaloides. *Ziziphus* tiene un papel significativo en el tratamiento del cáncer, la diabetes, además se ha utilizado en la medicina popular para tratar la ictericia, diarrea, úlceras, y las fiebres (Sharma y col., 2014). En este ámbito la barchata (*Ziziphus obtusifolia*) resulta una opción medicinal.

Por otro lado, las infecciones, los procesos inflamatorios, determinadas anomalías metabólicas, el consumo excesivo de ciertos fármacos, la exposición a una radiación intensa, o el contacto frecuente con determinados contaminantes ambientales, son condiciones que en

conjunto causan estrés oxidativo, el cual además de contribuir con el proceso de envejecimiento es responsable de enfermedades humanas (Mc Kee y Mc Kee, 2009).

Así mismo, los padecimientos gastrointestinales causados por bacterias y virus en México aún son prevalentes, y las estadísticas actuales señalan que el 44% de los niños menores de 5 años son los más propensos a estas infecciones entéricas ocasionadas por virus (Hernández y col., 2011). Una alternativa para el control de estos padecimientos en la población humana es la medicina etnobotánica, por lo que *Ziziphus obtusifolia* resulta una opción, ya que es una planta que se ha venido utilizando por la población indígena y su uso se ha difundido ya que se considera como una planta medicinal contra el cáncer y otros padecimientos, sin embargo, no existe suficiente información que permita establecer los efectos biológicos que son benéficos hacia la salud humana. En este sentido, se tiene la desventaja de poseer un conocimiento limitado de esta especie, ya que la mayoría de ellas se encuentran en estado silvestre y se requiere de mayor investigación y esfuerzos para profundizar en el conocimiento farmacéutico de esta especie mexicana. Esto representa una oportunidad, que permite ampliar y explorar las aplicaciones médicas de esta planta como alternativa natural para prevenir o tratar enfermedades de infecciones intestinales o degenerativas provocadas por oxidación celular.

Por lo anterior, determinar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de los extractos obtenidos de las ramas de *Ziziphus obtusifolia*. Además, la barchata (*Ziziphus obtusifolia*) es un arbusto muy común en el noroeste de México, y Sonora es una de las regiones endémicas de estas especies siendo una planta autóctona por lo que es de fácil acceso además su obtención no generaría costo alguno y de esta manera muchos serían beneficiados de sus sustancias bioactivas.

Existen pocas investigaciones que documenten la utilización de esta planta herbácea. Ramírez y colaboradores en el 2001, estudiaron un uso alternativo de esta planta medicinal y la propuso como forraje en alimentos de animales silvestres. Sin embargo aún, no existen estudios en donde confirmen el beneficio y las propiedades de esta planta en específico hacia la salud humana.

Por otro lado, se ha documentado que las especies a las que pertenece esta planta contienen numerosas capacidades terapéuticas como actividad antibacteriana, propiedades antioxidantes, anticancerígenas entre otras (Sharma y col., 2014).

También se han encontrado muchos testimonios en donde las personas utilizan infusiones acuosas y los toman como remedios alternativos para combatir algunas enfermedades degenerativas incluyendo el cáncer (Ramírez y col., 2001). Por lo que esta planta

representa una alternativa natural de obtención de constituyentes o sustancias bioactivas con beneficio a la salud humana.

OBJETIVOS

General

Evaluar la capacidad antioxidante, antibacteriana y antiviral de extractos de barchata (*Ziziphus obtusifolia*).

Específicos

1. Obtener los extractos etanólicos y acuosos de barchata (*Ziziphus obtusifolia*).
2. Determinar la capacidad antioxidante de los extractos mediante los ensayos DPPH, ABTS y capacidad protectora sobre el eritrocito humano.
3. Determinar el efecto de los extractos sobre el modelo enteroviral Av08
4. Analizar la capacidad antibacteriana de los extractos, mediante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 65384) y *Escherichia coli* O157 (ATCC 43890).

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Generalidades de la Barchata

La bachata es un arbusto que alcanza una altura de 2 a 3 m. Los tallos son verdes grisáceos, robustos, con ranuras y muy ramificados, tienen una flor similar a la cera blanquecina o grisácea (figura 1). La hojas son alternas, simples ovaes éstas se caen durante los períodos secos. Se produce en zonas desérticas, matorrales y pastizales (Carter, 1997).

Se han encontrado ciertos beneficios en esta planta, tal como poseer un alto contenido de proteínas. Los Pimas mojaron las raíces con agua y las aplicaron a los ojos doloridos (Bowers y Wignall, 1993). Los Seris trituraron las raíces en polvo para aplicarlo a la piel y úlceras en el cuero cabelludo (Epple, 1995). Las infusiones hechas de raíces también han servido como un sustituto de jabón (Kearney y col., 1951).



Figura 1. *Ziziphus obtusifolia*. (Fuente: Nickrent, 2007)

Distribución de la Barchata en México

Existen dos variedades de esta planta que han sido descritas: variedad *obtusifolia* que es *glabrata* y variedad *canescens* que es *tomentose*. La primera es principalmente una planta del desierto chihuahuense y los bosques adyacentes, la segunda del desierto de Sonora y pastizales semidesérticos adyacentes (Turner y col., 2005). En la figura 2, se puede apreciar la distribución de esta planta herbácea.

Propiedades Terapéuticas de las Especies Pertencientes al Género *Ziziphus*

Ziziphus es un género de la familia *Rhamnaceae* y comprende alrededor de 40 especies de pequeños arbustos espinosos o pequeños árboles con propiedades medicinales. Estas plantas contienen numerosas propiedades terapéuticas como analgésico, antiinflamatorio, antibacteriano, anti-envejecimiento, anti-tumor y propiedades antioxidante. También presenta varios fitoquímicos tales como saponinas, pectina, ácidos grasos, ácidos y alcaloides. *Ziziphus* tiene un papel significativo en el tratamiento del cáncer, la diabetes y también se han utilizado en la medicina popular para tratar la ictericia, diarrea, úlceras, y fiebres (Sharma y col., 2014).

En otro estudio se encontró que el extracto acuoso de la hoja de *Ziziphus mauritiana* puede prevenir el daño hepático inducido por el alcoholismo crónico mediante la mejora de los niveles de estado antioxidante total y la inhibición de la peroxidación lipídica hepática, utilizando ratas como prueba (Dahiru y col., 2005).

Otras aplicaciones de esta planta son en los productos cosméticos, la producción de vino y conservación de alimentos debido a la presencia de compuestos antimicrobianos, también se elaboran tónicos para la mejora el sistema inmunológico. Su aceite es utilizado para promover el crecimiento del cabello (Sharma y col., 2014).

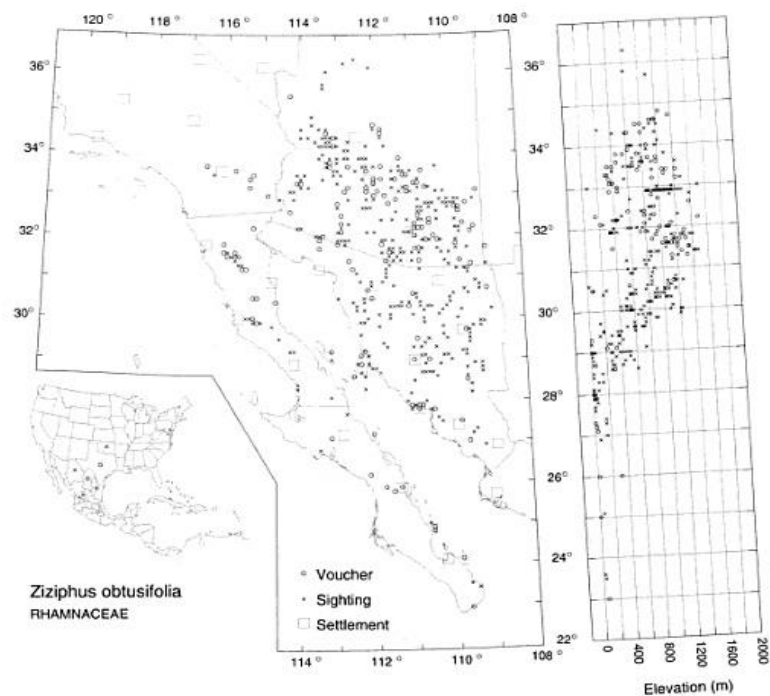


Figura 2. Zonas endémicas de *Z. obtusifolia*. (Fuente: Turner y col., 2005)

Plantas Medicinales

El consumo de plantas medicinales (hierbas medicinales) o fitoterapia constituye uno de los capítulos más importantes dentro del variado mundo de la medicina alternativa y complementaria. En la práctica supone un segmento no controlado de la terapia farmacológica, dada la posibilidad de efectos terapéuticos, tóxicos o interacciones que pueden causar los principios activos de las plantas y porque su utilización ha crecido espectacularmente en los países desarrollados (Ernst, 2000).

Las plantas medicinales se comportan como verdaderos fármacos ya que las sustancias químicas que las componen pueden tener una actividad biológica en humanos (Tres, 2006).

Extractos Naturales

Desde tiempos remotos, una gran variedad de plantas y productos vegetales han sido utilizados para prevenir enfermedades degenerativas, tanto en humanos como en animales (Tavares y col., 2008). Se ha reportado que dichas propiedades se deben a la presencia de sustancias bioactivas las cuáles pueden se pueden obtener mediante diferentes tipos de extracciones (Boulanouar y col., 2013). El uso de extractos naturales proviene de hace mucho tiempo donde se utilizaban las plantas medicinales y hoy en día son utilizados en varios ámbitos como cosmetología, química, farmacología entre otras, en las industrias alimentarias su uso es para ayudar a preservar los alimentos, en el caso de algunos que tienen características antimicrobianas y antioxidantes (García Fajardo y col., 1999).

Se conocen aproximadamente 1340 plantas como potenciales fuentes de compuestos antimicrobianos (Gião y col.,2008), además, se conocen más de 250,000 especies de plantas que contienen una gran diversidad de compuestos bioactivos (Raal y col. 2012). Los compuestos antioxidantes de los vegetales se extraen con disolventes de diferentes polaridades de acuerdo con el carácter hidrofílico o lipofílico de los compuestos que se desean evaluar. El disolvente más comúnmente utilizado en la obtención de extractos lipofílicos es el hexano. También se han utilizado el éter dietílico y cloruro de metileno, entre otros. Para la extracción de compuestos con carácter hidrofílico se ha utilizado el metanol, etanol, mezcla de etanol/agua, acetona/agua, así como metanol/agua (Pérez y Saura, 2006).

Compuestos Bioactivos Presentes en Extractos de Plantas

Los compuestos bioactivos son metabolitos secundarios producidos por las plantas para su defensa y supervivencia al medio que les rodea. Estas sustancias pueden ser colorantes (pigmentos), aromáticas, reguladores del crecimiento, protectores naturales frente a parásitos y otros, que no tienen una función nutricional claramente definida o no son considerados esenciales para la salud humana, pero que pueden tener un impacto significativo en el curso de alguna enfermedad (Biesalskiy col, 2009). A estos metabolitos se les está dando una aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria principalmente. Afortunadamente en México se tiene una gran diversidad de plantas, ya que es el cuarto país más rico del mundo en este aspecto (Jasso de Rodríguez y col., 2011).

La abundancia de las plantas ha sido una de las ventajas para su uso como materia prima en la continuación de los esfuerzos para obtener productos de origen natural. Los extractos de plantas se han utilizado desde la antigüedad como remedios contra enfermedades producidas por hongos, bacterias y virus, esto debido a su contenido de compuestos bioactivos que se logran extraer (Drago y col., 2006). Algunos de estos metabolitos son los compuestos fenólicos, los cuales tienen varias propiedades asociadas a los antioxidantes. Los beneficios para la salud incluyen la reducción de la presión arterial, los niveles de proteínas tóxicas en la enfermedad de Alzheimer, infecciones del tracto urinario, y el riesgo de desarrollo del cáncer, además que actúan como antimicrobianos aplicados en alimentos, como biofertilizantes e incluso como biofungicidas (Alves y col., 2012).

Métodos para Obtención de Extractos

Los extractos se pueden definir como la sustancia que se obtiene de hojas, tallos, flores o semillas, según sea la parte que contiene el ingrediente activo, que posee ciertas propiedades o actividad biológica. Para obtenerlos, existen diferentes métodos, algunos utilizados ancestralmente como la maceración o la cocción (Chávez-Benavides, 2008). Existen diferentes tipos de métodos de extracción, los convencionales y los no convencionales. Los más utilizados son los convencionales en los cuales existen dos tipos de procesos: la infusión-cocción y la maceración con solventes. En el primero se utiliza agua hirviendo sobre la matriz fresca o seca, se deja reposar por un tiempo y se filtra. La maceración con solventes orgánicos, consiste en someter a la estructura que corresponde de una determinada planta a la acción de un medio

líquido que puede ser agua o combinando al agua con un alcohol u otros disolventes apropiados para un mejor aprovechamiento del sistema (Camel, 2000).

El uso de disolventes como método de extracción en plantas influye significativamente en el arrastre de los compuestos activos y la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos. El disolvente debe ser capaz de disolver rápidamente todos los principios activos y la menor cantidad de materia inerte, que tenga un punto de ebullición bajo y uniforme que permita eliminarlo rápidamente (Costa y col., 2012).

Antioxidantes

Los radicales libres de oxígeno causan daño oxidativo y este se ha visto implicado en la etiología o patología de más de cien enfermedades diferentes, entre las que se encuentran distintos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas y vasculares, diabetes y desórdenes neurovegetativos. Un radical libre es cualquier molécula que contiene uno o más electrones no apareados. En las células aeróbicas existen diversas vías que conducen a la producción de radicales libres derivados del oxígeno (Martínez, 1995).

Las enzimas que en muchas ocasiones generan estrés oxidativo están asociadas al metabolismo del ácido araquidónico, como la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa y la citocromo P-450. La presencia y ubicuidad de enzimas (superóxidodismutasa, catalasa y peroxidasas) que eliminan productos secundarios de la vía univalente en las células aeróbicas sugieren que los aniones superóxidos y el peróxido de hidrógeno son productos secundarios importantes del metabolismo oxidativo (Rybczynska, 1994).

Las especies de oxígeno reactivo pueden lesionar macromoléculas como el ADN, los hidratos de carbono y las proteínas. Estas especies de oxígeno citotóxico pueden clasificarse en 2 tipos: a) los radicales libres, como el radical superóxido (O_2^-) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) y b) las especies de oxígeno no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el oxígeno singlete (O), que resulta una especie muy tóxica, el peroxinitrito ($ONOO$) y el ácido hipocloroso (Aldershvile, 1998).

Las plantas son fuentes potenciales de valor incalculable de antioxidantes, dentro de los mas importante tenemos a las vitaminas C, E, compuestos fenólicos, carotenoides y terpenoides, los cuales actúan antagónicamente contra los radicales libres en el organismo (Herodez y col., 2003). Asimismo, existen antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (BHA), y el butilhidroxitolueno (BHT) que son utilizados comúnmente en la industria de alimentos y farmacéutica, sin embargo, se han encontrado efectos secundarios, como el

aumento del colesterol, hepatomegalia e inducción de cáncer hepático, entre otras (Lorenzo, 2013). Por lo anterior, en los últimos años se ha incrementado la importancia de los antioxidantes de origen natural como alternativas de aplicación a los sintéticos, ya que se ha reportado que a bajas concentraciones pueden ejercer su acción y ser inocuos (Pisoschi, 2009).

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo ha sido asociado a la patogénesis de muchas enfermedades humanas, como: arterioesclerosis, artritis, demencia, cáncer, etc; es por ello que el uso de antioxidantes, es estudiado de forma intensiva, en farmacología; particularmente, en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares y enfermedades neurodegenerativas. Actualmente, se sabe que tanto por causas ambientales (radiación), así como por la ingesta de algún contaminante o incluso como consecuencia de nuestro propio metabolismo, surgen algunas moléculas que nos pueden provocar daño. A estas se les conoce como especies oxígeno reactivas (ROS), que se asocian a enfermedades como cáncer, problemas cardiacos o al natural envejecimiento humano (Moein y Moein, 2010).

Entre los problemas que originan figuran: destrucción de paredes celulares, inactivación de enzimas, debilitamiento de la capacidad defensiva, alteración del sistema inmunológico e incluso daño del material genético (Neira y Yuri, 2004).

Eritrocitos y su daño oxidativo

Los eritrocitos o glóbulos rojos se producen en la médula ósea y se liberan hacia la circulación periférica, donde tienen una vida media de alrededor de 120 días. Durante ese tiempo se producen varios cambios metabólicos y químicos a medida que el eritrocito envejece y pierde su capacidad para deformarse (Rodak, 2005). Adicionalmente los eritrocitos son propensos a fenómenos de lisis que se le conoce como hemólisis, este efecto también puede ser causado por factores externos ya sea por infecciones, inflamaciones, enfermedades malignas o por la oxidación celular.

Los eritrocitos son un modelo celular utilizado en la investigación del daño oxidativo en las biomembranas (Ugartondo y col., 2010). Fosfolípidos, proteínas transmembrana y colesterol en combinación con una red de proteínas del citoesqueleto son responsables de la integridad de la membrana del eritrocito (Smith, 1987), por lo que son muy propensos al ataque de especies reactivas de oxígeno (ROS), esto también se debe a la alta cantidad de contenido de

ácido graso poliinsaturado en sus membranas y a las reacciones de oxidación, debido al Fe de la hemoglobina. El ataque oxidativo de los eritrocitos es uno de los sucesos más importantes en algunas hemoglobinopatías (Hirschler y col., 2012). La autooxidación de la oxihemoglobina contribuye a la degradación de núcleo hemo, por lo que el daño inducido experimentalmente al eritrocito es un buen modelo de investigación (Vitturi y col., 2012). Los fitoquímicos pueden proteger los eritrocitos o incrementar su resistencia a las reacciones oxidativas (Mahejabeen y col., 2013).

Métodos para Medir Capacidad Antioxidante

Los métodos de medición de la actividad antioxidante muestran extrema diversidad; muchos procedimientos usan una acelerada oxidación involucrando un iniciador para manipular una o más variables en el sistema de prueba; tales iniciadores incluyen adición de un metal de transición como catalizador, exposición a la luz para promover oxidación fotosensitizada por oxígeno singlete (Antolovich y col., 2002) y fuentes de radicales libres (Li y col., 2003).

La evaluación de la actividad antioxidante a través de fuentes generadoras de radicales libres en el sistema de prueba, asume que la oxidación es inhibida en un alto porcentaje por la captura de estos; por tanto se enfoca en monitorear la capacidad de aditivos y extractos para la captura de radicales o la inhibición de su formación. Este es el principio de los métodos más modernos de ensayo tales como los ensayos de ABTS (ácido 2,2'azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico) y DPPH (1,1-difenil-2- picrilhidrazilo) (Antolovich y col., 2002).

Ambos métodos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso ó persulfato potasio). Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico (Halliwell y Gutteridge, 1999)

Método del DPPH

Este método evalúa la actividad de compuestos específicos o extractos usando el radical libre estable 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) en una solución metanólica. La reducción del DPPH se monitorea por la disminución en la absorbancia a una longitud de onda característica. En su forma de radical libre, el DPPH absorbe a 515 nm y cuando sufre reducción por un antioxidante,

esta absorción desaparece. En consecuencia, la desaparición del DPPH proporciona un índice para estimar la capacidad del compuesto de prueba para atrapar radicales (Brand-Williams y col., 1995).

En la figura 3, se muestra un esquema de la reacción (Molineux, 2004) donde AH es un antioxidante que actúa como antirradical donando átomos de hidrógeno, dando como resultado radicales con estructuras moleculares estables que detendrán la reacción en cadena, tal es el caso de los fenoles. El nuevo radical formado puede interactuar con otro radical para formar moléculas estables (Brand-Williams y col., 1995).

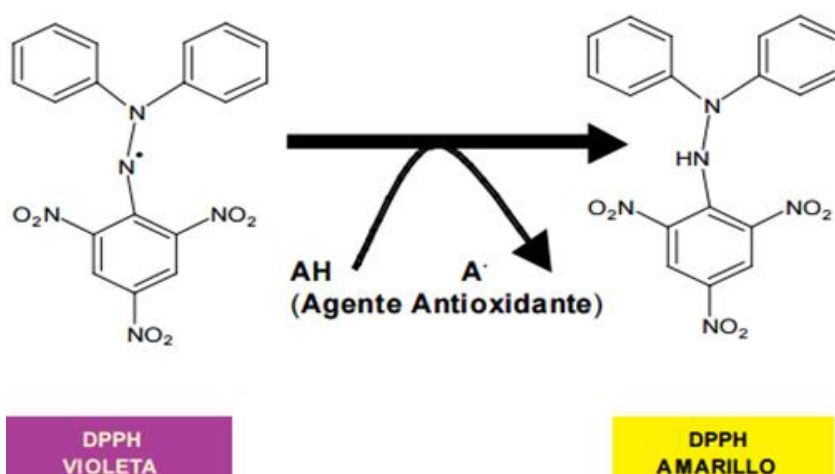


Figura 3. Reacción del 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).
(Fuente: Molineux, 2004)

Método de ABTS

En este método, el producto de oxidación del ABTS, el catión radical de larga vida ABTS, se presenta como una excelente herramienta para determinar la actividad antioxidante de sustancias donadoras de hidrógeno (capturadores de radicales en fase acuosa) y antioxidantes rompedores de cadena (capturadores de radicales peroxilo lipídicos) (Re y col., 1999).

La técnica para la generación del radical catión ABTS, implica la producción directa del cromóforo ABTS verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical pre-formado lo reduce a ABTS. De esta manera el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS está

determinado en función de la concentración y el tiempo; así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones. En este método, se mide el tiempo que tarda el radical ABTS en ser oxidado hasta el radical libre estable ABTS en presencia de compuestos antioxidantes (figura 4) como los polifenoles, que retarden dicha oxidación o bien disminuyan la absorbancia de la disolución por captura del radical (Friaa y Brault, 2006).

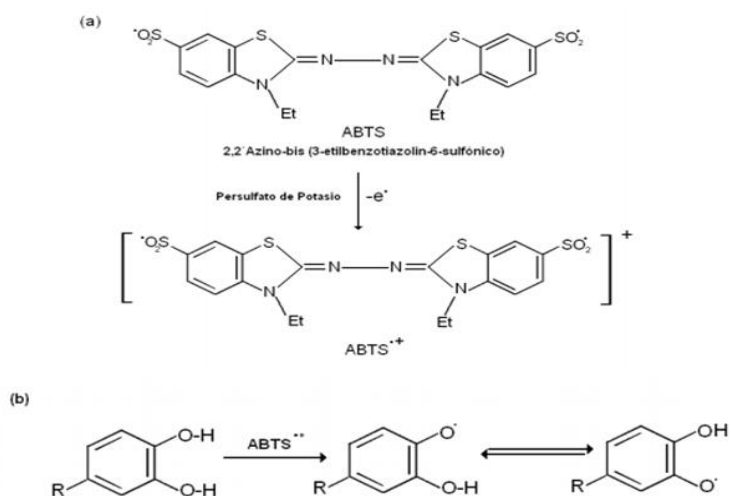


Figura 4. a) Formación del radical ABTS b) reacción del catión radical ABTS con compuestos fenólicos. (Fuente: Fria y Brault 2006)

Prueba de hemólisis

Los modelos celulares son considerados una herramienta útil en investigación de salud humana, así como, en la investigación encaminada a la validación de alimentos funcionales ricos en antioxidantes naturales ya que proporcionan información valiosa sobre los mecanismos de acción y la eficacia protectora de sustancias bioactivas puras y extractos de alimentos ricos en antioxidantes (Zhao y col., 2008).

Este ensayo proporciona información acerca del comportamiento citotóxico que pudiese tener la muestra, para posteriormente emplear aquellas concentraciones de muestra que no causen daño al cultivo celular. Posteriormente, se procede a evaluar el efecto protector frente al

estrés oxidativo en presencia de sustancias como peróxidos orgánicos e inorgánicos, sistemas oxidantes, peroxinitrito, entre otros y la sustancia bioactiva (Cruz-Silva y col., 2000).

Actividad Antimicrobiana

El modo de acción de los compuestos fenólicos no ha sido aún bien determinado, suponiendo que éstos pueden inactivar enzimas esenciales, reaccionar con la membrana celular o alterar la función del material genético, proporcionando así propiedades antimicrobianas (Rodríguez, 2011).

Asimismo, se ha observado que las grasas, proteínas, concentraciones de sal, pH y temperatura son factores que pueden favorecer la actividad antimicrobiana. Los componentes activos de los extractos pueden variar en su composición, ya que ésta puede verse afectada por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas (Rodríguez, 2011).

El mecanismo de acción de los compuestos antimicrobianos dentro de una célula puede llevarse a cabo en la pared celular, membrana celular, en la síntesis de proteína, en su genética y en la síntesis de su genética. Esto puede causar daños irreparables a una célula. Sin embargo, no se conoce aún su modo de acción, pero al actuar de forma diferente, las combinaciones de estos pueden llevar a mejores resultados (Gonzalez y col., 2010).

Existen pocos estudios enfocados a comprender el mecanismo involucrado en la inhibición microbiana por extractos y aceites esenciales. Sin embargo, se supone que dada la estructura fenólica de muchos de los compuestos con actividad antimicrobiana presentes en ellas, el modo de acción debe ser similar al de otros compuestos fenólicos. En muchos casos los antimicrobianos pueden no tener ningún efecto hasta que se rebasa una concentración crítica (Davidson, 2001).

Escherichia coli

E. coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt, 1999). Forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, está integrada por bacilos Gram negativos (figura 5) no

esporulados, móviles con flagelos peritricos o inmóviles, aerobios-anaerobios facultativos (Ewing, 1985).

Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales. En conjunto, la importancia de las enterobacterias en patología humana puede cuantificarse constatando que constituyen el 50% aproximadamente de todos los aislamientos clínicamente significativos en los laboratorios microbiológicos, y hasta el 80% de todos los bacilos Gram negativos identificados (Ewing, 1985).

Los aislados de *E. coli* tienen pocas características que puedan ser usadas para distinguir una cepa de otra; por lo que ha sido necesario implementar investigaciones epidémicas y con este fin una serie de estudios fenotípicos y genotípicos, incluyendo tipificación con bacteriófagos, factores de virulencia, genotipificación de verotoxinas, análisis de plásmidos, electroforesis de enzimas multilocus, ribotipificación. RFLP y electroforesis de campo pulsado. (Martín y col., 1996)

Las *E. coli* patógenas son caracterizadas por la expresión de factores de patogenicidad, como factores de adherencia, invasinas y cápsulas entre otras. En los últimos años se han identificado 6 categorías de *E. coli* causantes de EDA (Enfermedades Diarreicas Agudas): (Blanco y col., 1991).

- *E. coli* enterotoxigénica (ECET) genera una enterotoxina
- *E. coli* enteropatógena (ECEP) generada por adherencia íntima a la célula huésped.
- *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) por invasión a la célula.
- *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) adherencia a la íntima de la célula huésped
- *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg).
- *E. coli* enteroadherente (ECDA) generada por una producción de enterotoxina.

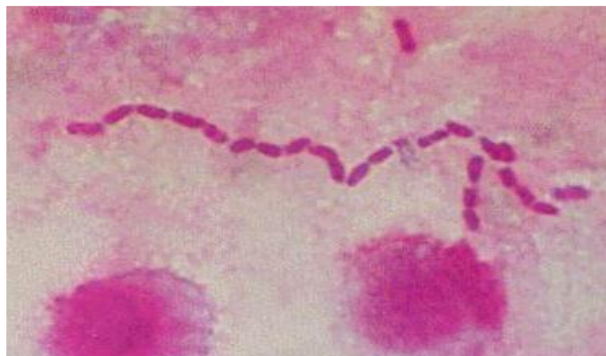


Figura 5. *E. coli* (tinción Gram). (Fuente: Santisteban, 2001)

***E. coli* enterohemorrágica O157: H7** es el serotipo más prevalente identificado en 1982 como causa de enfermedad en humanos causa diarrea sanguinolenta, produce potentes toxinas y genera lesiones típicas de adhesión y daño tisular a nivel de las microvellosidades (Besser y col., 1993).

Staphylococcus aureus

El género *Staphylococcus*, pertenece a phylum *Firmicutes*, clase III *Bacilli*, orden I *Bacillales*, familia VIII *Microcococaceae*, y tiene cerca de 38 especies (Doyle y col., 2001; Garrity y col., 2004). Solamente 18 especies de *Staphylococcus*, han sido reportadas de importancia en alimentos y con interés en la salud pública, siendo *S. aureus* la más relevante y siendo ésta indicadora de contaminación por manipulación inadecuada (Doyle y col., 2004).

S. aureus es una bacteria con morfología microscópica típica de cocos Gram positivos agrupados en racimos de tamaño entre 0,5 a 1,5 μm , no esporulada e inmóvil (figura 6). Es una bacteria ubicua y patógena que puede causar intoxicación alimentaria (Doyle y col., 2004).

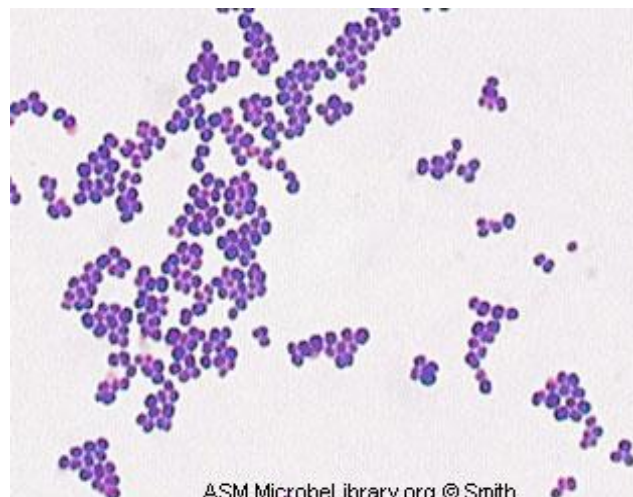


Figura 6. *Staphylococcus* spp (tinción Gram).
(Fuente: American Society for Microbiology, 2005)

Es uno de los patógenos humanos asporógenos más resistente a condiciones ambientales adversas, logrando persistir a temperaturas de congelación y descongelación

(FSAI, 2010). El principal factor de virulencia de *Staphylococcus spp.* involucrado en la IAE (Intoxicación Alimentaria Estafilocócica) es la producción de enterotoxinas termorresistentes (Mossel y col., 2003).

Los síntomas de la IAE pueden ser algunos de los siguientes: náuseas, dolor abdominal, emesis, diarrea y postración (Kérouanton, 2007). En los casos más graves se puede presentar cefalalgia y shock (ICMSF, 1998).

Método para Medir Capacidad Antibacteriana (Antibiograma Disco-Placa)

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos (García y col., 2000).

Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas. Para cuantificarla se mide el diámetro de la zona de inhibición obtenida por cada una de tales cepas, existen, por tanto, unos diámetros de inhibición, expresados en mm, estandarizados para cada antimicrobiano (García y col., 2000).

Actividad Antiviral

Las plantas medicinales con una fuerte actividad antiviral para el tratamiento de infecciones virales en humanos y animales, han sido identificadas. También se han estudiado los mecanismos de acción de nuevos agentes antivirales derivados de plantas. (Serkedjieva, 2003; Tolo y col., 2006).

Los productos naturales, ya sea extractos de plantas o compuestos puros, contienen sustancias con diversas estructuras químicas, proporcionando una fuente ilimitada de nuevas alternativas medicinales. Además, los estudios que evidencian el potencial antiviral de extractos de plantas contra las cepas virales resistentes a los agentes antivirales convencionales ponen

de manifiesto la necesidad de explorar las plantas medicinales para los componentes antivirales naturales (Serkedjieva, 2003; Tolo y col., 2006).

Virus

Una partícula viral consiste en una molécula de ácido nucleico, ya sea ácido desoxirribonucleico (DNA) o ácido ribonucleico (RNA), dentro de una cubierta proteínica o cápside (a veces por una envoltura de lípidos, proteínas y carbohidratos). Las proteínas en la cápside determinan la especificidad de interacción entre un virus y su célula hospedera. La cápside protege al ácido nucleico y facilita la adhesión y la penetración en la célula hospedera por el virus. Dentro de la célula, el ácido nucleico viral toma el control de la maquinaria enzimática del hospedero para que funcione al servicio de la replicación del virus (Brooks y col., 2008).

Bacteriófagos

Los fagos son virus que invaden células bacterianas específicas, que alteran su metabolismo, y lisan la bacteria sin comprometer la viabilidad de otras especies de flora en el hábitat. Son los microorganismos más abundantes en nuestro entorno (Brüssow, 2005). Los fagos pueden proporcionar un enfoque natural, no tóxico, factible para controlar varios patógenos humanos. Un estudio en humanos con fagos específicos de *Escherichia coli* indicaron que son seguros para la administración oral (Brüssow, 2005).

Se conocen dos tipos de replicación del fago: los ciclos lisogénico y lítico. El ciclo lisogénico, también conocido como la forma profago, infecta bacterias susceptibles, y el genoma del fago se fusiona con el ADN bacteriano sin causar la lisis bacteriana. Esta forma puede persistir durante mucho tiempo hasta que el ciclo lítico se activa por factores externos como la luz ultravioleta (Campbell, 2003). El ciclo lítico provoca la lisis celular, liberando numerosa progenie de fagos (Abedon y col., 2001). Por lo tanto, se prefieren los fagos que expresan un ciclo lítico para el biocontrol de bacterias patógenas. Los fagos líticos han recibido atención como agentes terapéuticos contra bacterias patógenas humanas y animales (Alisky y col., 1998; Barrow y col., 1998; Capparelli y col., 2007), y más recientemente para reducir las bacterias transmitidas por los alimentos patógenos (Atterbury y col., 2003; Pao y col., 2004; FDA, 2006).

La mayoría de los fagos son específicos para ciertas especies bacterianas; sin embargo, algunos estudios han demostrado que los fagos han sido capaces de infectar a más de un género bacteriano (Bielke y col., 2007). Los fagos están aislados de ambientes diversos, tales

como aguas residuales y lodos de depuradora (Fiorentin y col., 2004; Pao y col., 2004; Carey-Smith y col., 2006), la carne de vacuno (Atterbury y col., 2003), productos lácteos (Capra y col., 2006), el suelo (Ashelford y col., 2003), el esputo y saliva (Bachrach y col., 2003).

Bacteriófago Av08

El fago Av08 que se observa en la figura 7, posee un genoma ADN de doble cadena que pertenece al orden *Caudovirales* de la familia *Myoviridae*. Tiene una longitud de 231 ± 7 nm, una cabeza alargada isométrica de 93 ± 3 nm por 118 ± 1 nm, y una cola rígida y contráctil de 106 ± 3 nm de longitud y de alrededor de 18 nm de diámetro (López y col., 2011).

Los fagos de la familia *Myoviridae* han sido con frecuencia iso-relacionados con los de las heces de mamíferos frescas y están asociados con el efecto lítico en *E. coli* y *Salmonella* (Abedon y col., 2003; Carey-Smith y col., 2006).

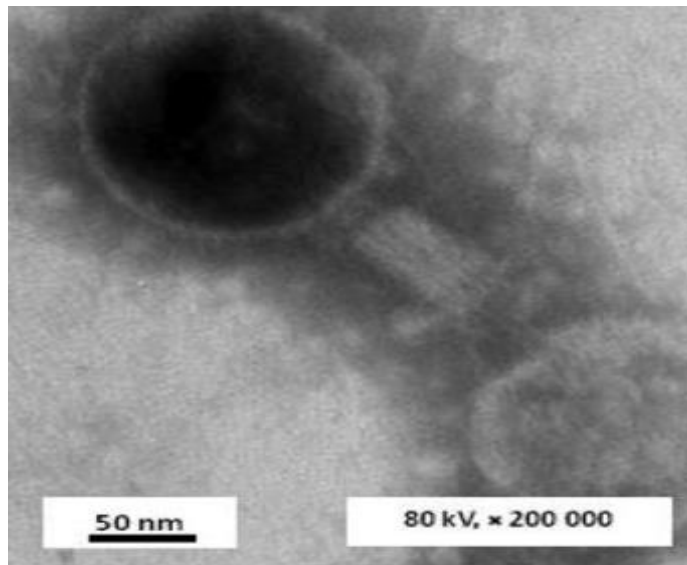


Figura 7. Bacteriófago Av08. (Fuente: López y col., 2011)

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los Extractos

Para la preparación del extracto EtOH-ac se utilizó el método según Sultana y col., 2009. Las ramas de barchata fueron secadas al sol y se pulverizaron con un molino industrial. Se añadieron 10 g del polvo obtenido de barchata a 150 mL de una solución extractora de etanol y ácido acético relación (95:5) y se mantuvo en la oscuridad durante 48 horas en maceración con agitación intermitente. Doce horas más tarde la solución se filtró a través de papel filtro Whatman No1. El extracto se concentró en rotavapor (Yamato RE301-Japón) para su posterior análisis (figura 8. a).

En las infusiones acuosas se colocó 1 gramo de las ramas de barchata pulverizada en 100 ml de agua y se hirvió por 3 minutos (figura 8. b). El extracto EtOH-Ac se diluyó con dimetil sulfóxido (DMSO) al 5% para su fácil manejo.



Figura 8. a) Extracto acuoso de barchata; b) Extracto EtOH-ac de barchata concentrándose en rotavapor

Capacidad Antioxidante

Inhibición del radical DPPH (2,2-diphenil-1-picryl hidrazilo)

Se midió la capacidad antioxidante de los extractos para inhibir el radical DPPH según Moein y Moein. (2010), con algunas modificaciones. Una alícuota de 280 μL de la solución del radical DPPH (0.025 mg/mL en metanol) se mezcló con 20 μL del extracto, la reacción se dejó reposar por 30 min en completa oscuridad y se leyó la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas usando un espectrofotómetro Fluostar Omega spectrophotometer (BMG Labtech, Chicago, IL, USA). La actividad antioxidante se calculó usando una curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron como μmol Equivalente Trolox/g de extracto (μmol ET/ge). En la figura 9, se puede observar el color característico de este radical, así como, la inhibición de su color.

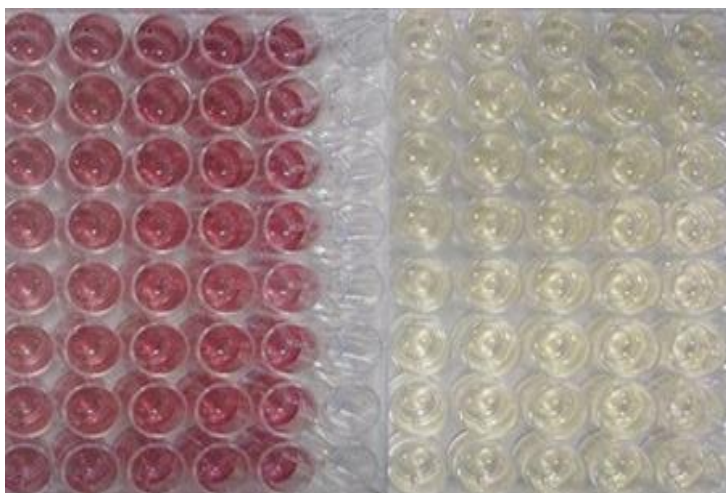


Figura 9. Técnica de evaluación antioxidante por el radical DPPH (2,2-diphenil-1-picryl hidrazilo).

Inhibición del radical ABTS (2,2'- azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)

Se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Re y col. (1999). El radical ABTS se preparó al mezclar 19 mg en 5 mL de agua destilada. Por otro lado, se preparó una solución de persulfato de potasio (37.8 mg/mL en agua destilada). Se tomaron 88 μL del radical ABTS

preparado y se le añadieron a la solución de persulfato de potasio, dicha mezcla se dejó reposar por 12-16 h a temperatura ambiente. De esta solución incubada se tomaron 500 μL y se diluyeron en 30 mL de etanol para posteriormente ajustar la absorbancia a 0.7 ± 0.02 en lector de microplacas a 750 nm. Finalmente se colocaron 295 μL de radical y 5 μL del extracto. La actividad antioxidante se calculó usando una curva de calibración de Trolox y los resultados se expresaron como μmol equivalente Trolox/g de extracto ($\mu\text{mol ET/g}$). En la figura 10, se puede observar el color azul característico de este radical, así como, la inhibición de su color.

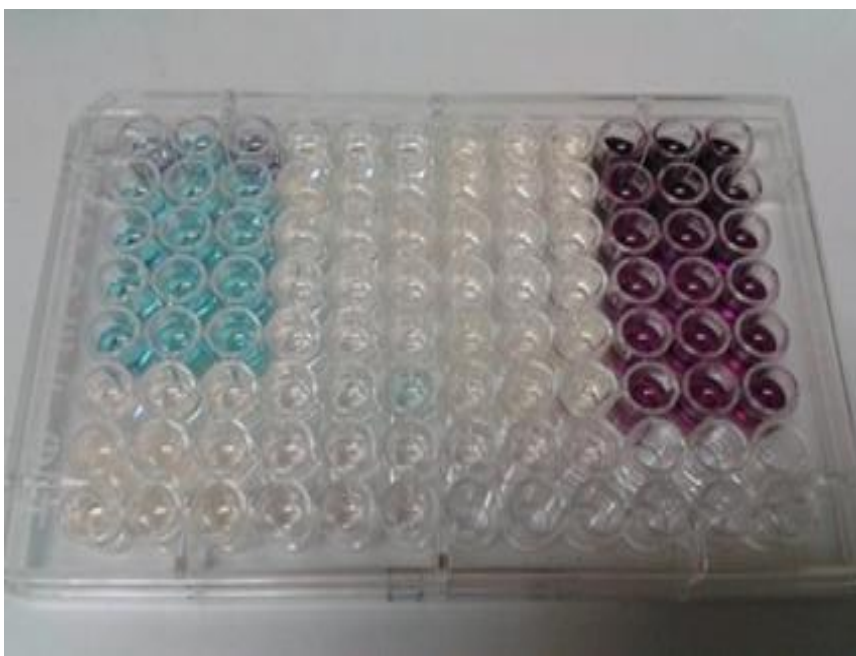


Figura 10. Técnica de la evaluación de la capacidad antioxidante por el radical ABTS (2,2'- azino-bis(3- etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)

Evaluación del efecto protector sobre eritrocitos humanos

La hemólisis fue inducida por el radical AAPH (2-2'- Azobis (2 - methylpropionamide) dihydrochloride) de acuerdo a la metodología de Luy col. (2010). Los eritrocitos fueron lavados en 3 tiempos con buffer salino (PBS) a pH de 7.4. Una vez lavados se preparó una suspensión de eritrocitos humanos al 5% en PBS. Para el ensayo se colocaron en un tubo eppendorf 50 μL de la suspensión de eritrocitos, 50 μL del extracto a evaluar y 200 μL del radical AAPH, se

mezcló e incubó a 37°C en baño maría con agitación (30 rpm) durante 3 h. Una mezcla de reacción similar se preparó sin extracto como control (hemólisis completa). Terminada la incubación se agregó 1 mL de PBS y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min y se midió la absorbancia en lector de micro placas a 540 nm. El resultado se expresó en porcentaje de inhibición, la cual se calculó mediante la fórmula: $((\text{Abs Control} - \text{Abs Final}) / \text{Abs Control} * 100)$. En la figura 11, se puede observar los eritrocitos mezclados con los extractos al ser sometidos con el radical AAPH.

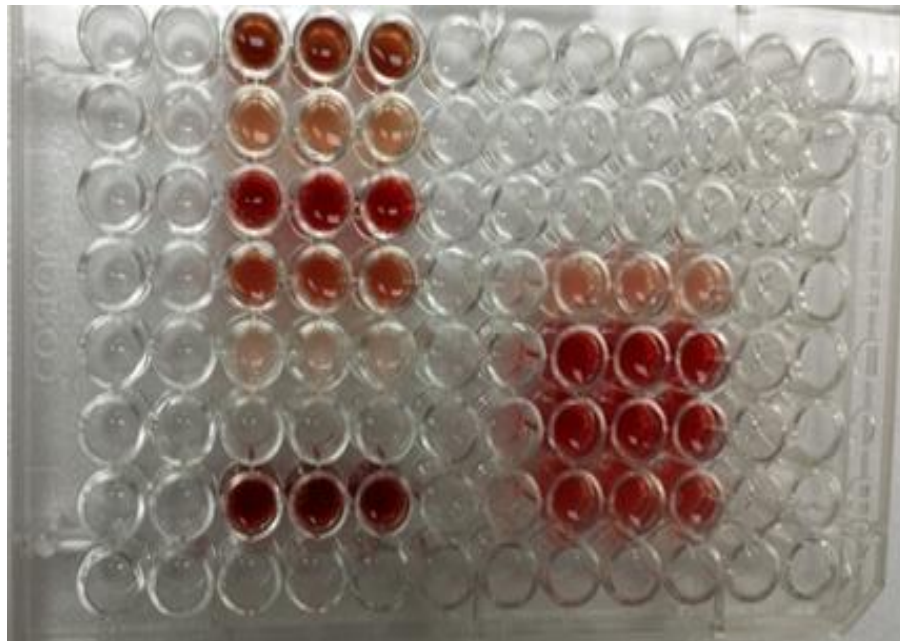


Figura 11. Evaluación de la capacidad protectora del eritrocito humano

Capacidad Antiviral

Identificación de bacteriófagos

Preparación de cepas hospederas. Se utilizó la cepa *E. coli* O157 la cual se inoculó en tubos con 10 mL de TSB Caldo de Soya Tripticasa. Se dejó incubar durante 24 horas a 36 °C.

Propagación del bacteriófago

Para la propagación del bacteriófago se utilizó el método descrito por Jamalludeen y col., 2009. Se mezcló 100 µL del bacteriófago Av08 con 1 mL de la bacteria (*E. coli* O157) hospedera en un tubo con 3 mL de TSB-agarosa 0.4%. La mezcla se vertió sobre cajas Petri con 10 mL de TSA (Agar de Soya Tripticasa); una vez solidificado el medio de cultivo, la caja se incubó durante 18-24 horas a 37 °C.

Después de la incubación se le añadieron 6 mL de una solución amortiguadora llamada buffer SM (el cual se compuso de MgSO₄·7H₂O 8 mM, NaCl 100mM, gelatina porcino 0.002% C P/V) y se agitó por oscilación durante 3 horas. La capa suave de la superficie se recuperó por remoción con un asa bacteriológica y el diluido resultante se vació en un tubo falcon, enseguida se centrifugó a 10,000 RPM durante 15 minutos a 4 °C para eliminar los detritus de la bacteria.

El sobrenadante se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa (Whatman, USA) con tamaño de poro 0.45 µm, el filtrado se centrifugó a 10,000 RPM durante 15 minutos a 4 °C. Se obtuvo una pastilla la cual se conservó en buffer SM.

Cuantificación del bacteriófago

Para la cuantificación del bacteriófago se hicieron diluciones decimales por duplicado, en buffer SM. A cada dilución se le adicionó 1 mL del fago Av08. Se tomaron 50 µL del fago diluido, 500 µL de bacteria *E. coli* O157 y se colocaron en 1.5 mL de TSB-agarosa. La mezcla se vertió en la caja Petri con TSA correspondiente a la dilución. Se incubó a 37 °C durante 24 horas, transcurrido el tiempo se procedió a leer las placas contando las UFP (Unidades Formadoras de Placa) de cada caja las cuales se pueden observar en la figura 12. Las UFP, se calcularon con la siguiente fórmula:

$$UFP = \frac{\bar{X} (\# \text{placas})(10^{-10})}{0.1 \text{ ml}}$$

Ensayo Antiviral

Se midieron los efectos antivirales de los extractos EtOH-ac y Ac contra bacteriófagos Av08 (ADN). Los extractos se disolvieron en 5% de DMSO y se esterilizaron a través de un filtro de

membrana de 0.45 micras. Las concentraciones ensayadas fueron 5 y 10 mg/mL. Una alícuota de 100 μ L del fago se confrontó con 3 mL del extracto. Se evaluaron 3 tiempos de contacto: 0, 30 y 60 min. Al finalizar cada tiempo la reacción se detuvo añadiendo una solución neutralizante de acuerdo con la Secretaria de Comercio y Fomento Industrial (1999). A continuación, se prepararon las siguientes diluciones decimales disueltas en buffer: 10^2 , 10^4 , 10^6 , 10^8 , 10^{10} y 10^{12} . En tubos que contenían 3 mL de TSB suplementado con 0.4% w / v de agar (en un estado líquido y a una temperatura por debajo de 45 °C), se añadieron 50 μ L de cada dilución, además se añadió 500 μ L del hospedero. Las mezclas se agitaron suavemente y se depositarán en placas de Petri que contenían 1,5% de la TSA con neutralizante. Las placas de Petri se incubaron a 37° C durante 24 h y se midió la UFP/mL para cada muestra. Los efectos sobre Av08 se determinaron por separado. Se incluyó un control (control absoluto) que consistía en 100 μ L de bacteriófago y 3 mL de tampón de fosfato 0.1 M. También incluimos un 5% de control negativo DMSO.

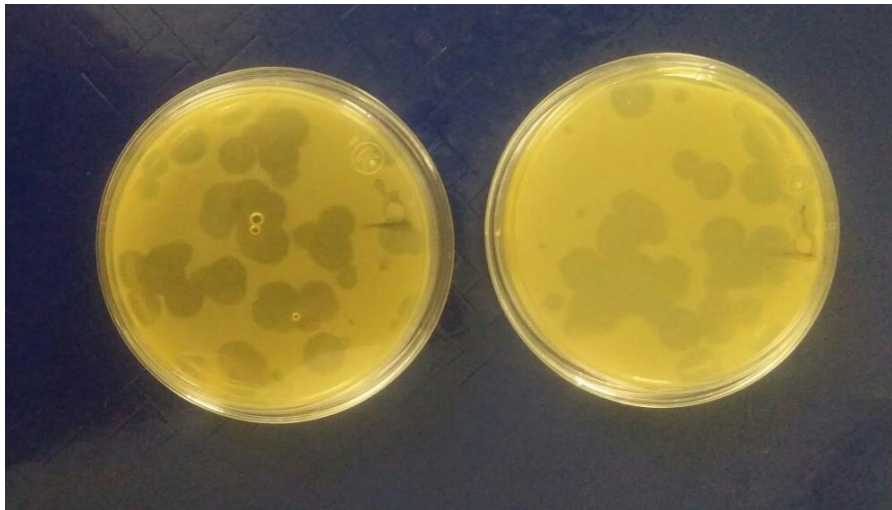


Figura 12. Unidades Formadoras de placa del bacteriófago Av08

Capacidad Antibacteriana

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Los microorganismos se obtuvieron del laboratorio de Inocuidad Alimentaria del Centro de Investigación e Innovación en Biotecnología, Agropecuaria y Ambiental (CIIBA) de ITSON.

Las bacterias Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 65384) y Gram negativa *Escherichia coli* O157 (ATCC 43890) se mantuvieron en caldo de soya tripticaseína (TSB) con glicerol (20%) a -40 ° C hasta su uso. Un asa de siembra de bacterias se transfirió a 10 mL de TSB y se incubó a 37 ° C por 24 horas para su uso en los ensayos de inhibición.

Preparación de medios

El ensayo se realizó en agar Müeller Hinton, se colocó 10 mL de dicho agar a cada placa.

Prueba de susceptibilidad microbiana (Disco-Placa)

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la observación de zonas de inhibición de crecimiento bacteriano descrito por Andrews (2001). Las placas de agar Müeller Hinton se inocularon con 100 µL de suspensión bacteriana la cual se homogenizó mediante perlas de vidrio estériles, se colocó 40 µL de extracto correspondiente (EtOH y Ac) en discos estériles de papel filtro (5 mm de diámetro, Whatman N °1) los cuales estaban sobre las placas inoculadas como se muestra en la figura 13. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas para su observación. Los tratamientos de control consistieron en discos impregnados con DMSO (5%).

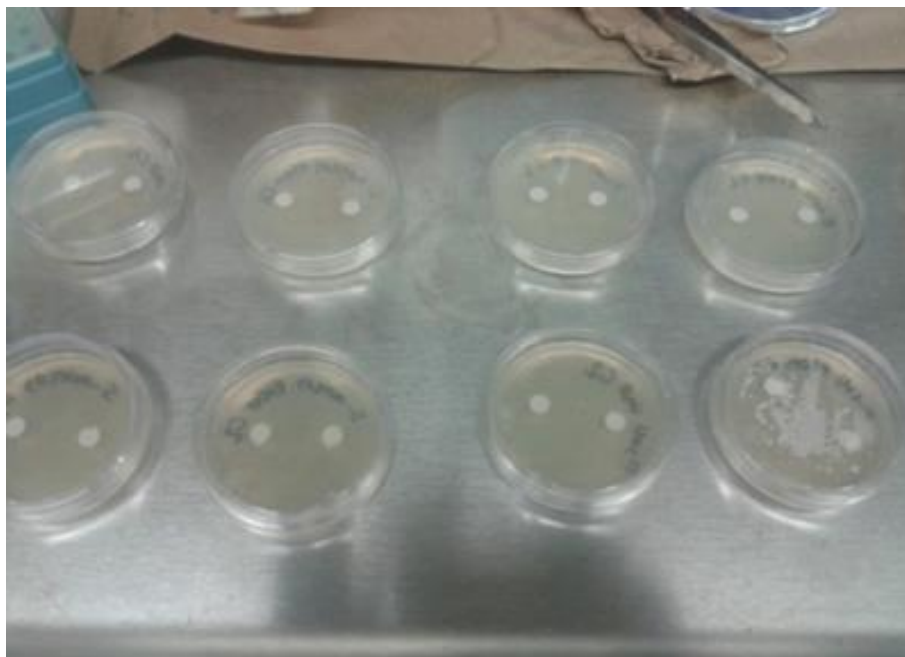


Figura 13. Placas inoculadas con bacterias y extracto

Análisis Estadístico

La evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de los extractos se realizó a través de experimentos independientes para cada tipo de extracto y de las especies microbianas estudiadas. El diseño estadístico fue asignado completamente al azar con tres repeticiones. En el análisis de los distintos tratamientos se asumió ($P < 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico Stat Graphics versión 15.

El análisis estadístico utilizado para evaluar la supervivencia de los fagos fue al azar y considerado tres factores. Los factores fueron el extracto, ya sea EtOH-ac o Ac; la concentración, ya sea 5 o 10 mg /mL, y el tiempo de contacto, es decir, 0, 30 y 60 min. La reducción viral se expresó como título de fago \log_{10} . Los tratamientos se llevaron a cabo por duplicado con dos repeticiones cada una. Se utilizó Statgraphic para V.4.0 Windows® para realizar el ANOVA y $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capacidad Antioxidante Mediante el Método DPPH y ABTS

El método de DPPH está basado en la capacidad que tiene dicho radical para reaccionar con donantes de hidrógeno. El DPPH es un radical libre y estable, de coloración violeta en solución metanólica y contiene un electrón desapareado, el cual es estabilizado en presencia de antioxidantes, resultando una decoloración en la solución la cual aumenta con respecto al número de electrones donado. Además, se ha demostrado que este ensayo puede ser utilizado para la evaluación de la actividad captadora de radicales libres en matrices complejas como los extractos vegetales (Jiménez y col., 2005).

En este estudio se evaluó la capacidad de los extractos EtOH-ac y Ac de barchata para inhibir el radical DPPH. En la figura 14 se muestra la inhibición del radical. Se pueden observar valores de inhibición de 25.03 ± 3.73 mmol ET/ge y 23.06 ± 0.24 mmol ET/ge para los extractos Ac y EtOH-ac respectivamente. Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$), entre los tratamientos, lo cual nos indica que la capacidad antioxidante de estos extractos está influenciada por la naturaleza química de los solventes en la extracción de sustancias con actividad biológica.

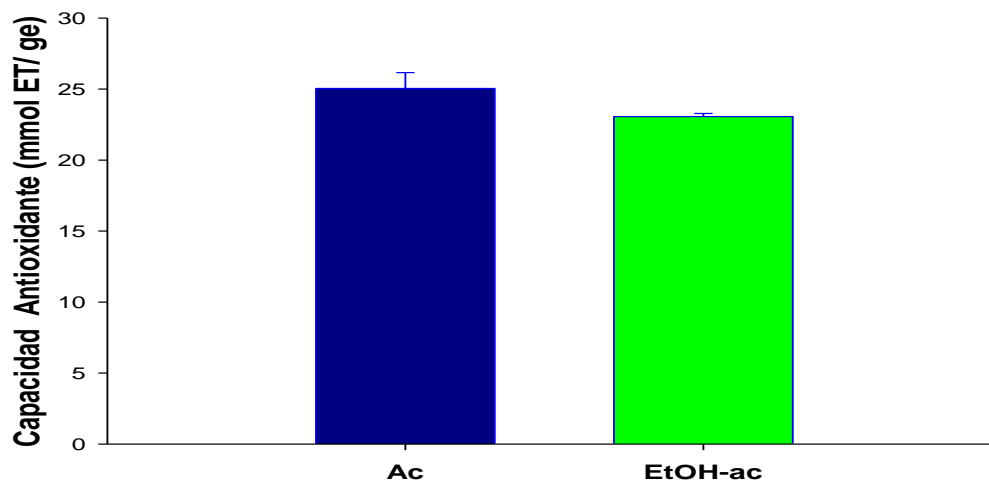


Figura 14. Capacidad antioxidante por medio del ensayo **DPPH** de extractos Ac y EtOH-ac de barchata (*Z. obtusifolia*). Los valores son la media \pm desviación estándar ($n=3$). ET, Equivalente Trolox (homólogo de la vitamina C) ge, gramo de extracto.

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo descrito por Kang y col. (2003), donde realizaron ensayos de capacidad antioxidante de extractos naturales con diferentes solventes tanto polares como no polares y concluyeron que en efecto la capacidad antioxidante se ve influenciada por la polaridad del solvente utilizado ya que ciertas sustancias bioactivas son más afines a ciertos solventes.

Actualmente, no existen investigaciones que documenten las propiedades antioxidantes de *Z. obtusifolia* medidas por inhibición de radicales sintéticos como DPPH. Sin embargo, Dias y col. en el 2013, observaron que extractos etanólicos de especies de *Ziziphus* poseen agliconas que presentan capacidades de reducción de radicales libres hasta un 25%, lo que nos permite suponer que los extractos presentan alta concentración de saponinas glucosiladas que reducen la actividad del extracto. Así mismo, Navas y Carrasquero (2012), estudiaron la actividad antioxidante que proporcionaban los extractos de *Ziziphus mauritiana* en el aceite refinado de soya a altas temperaturas, observando una alta protección al aceite por dicho extracto, y atribuyeron la actividad a la presencia de biofenoles, flavonoides y taninos. En esta investigación se realizaron estudios preliminares de fenoles y flavonoides totales en los extractos de *Z. obtusifolia* en donde se detectó la presencia de dichos componentes, sin embargo, estos hallazgos aún siguen en estudio como una segunda etapa de la investigación.

Por otro lado, en este estudio también se midió la capacidad de los extractos para inhibir el radical ABTS. Se fundamenta en la cuantificación de la decoloración del radical ABTS, debido a la interacción con especies donantes de hidrógeno o de electrones. El radical catiónico ABTS es un cromóforo que absorbe a cierta longitud de onda y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis- (3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) con persulfato de potasio (Re y col., 1999).

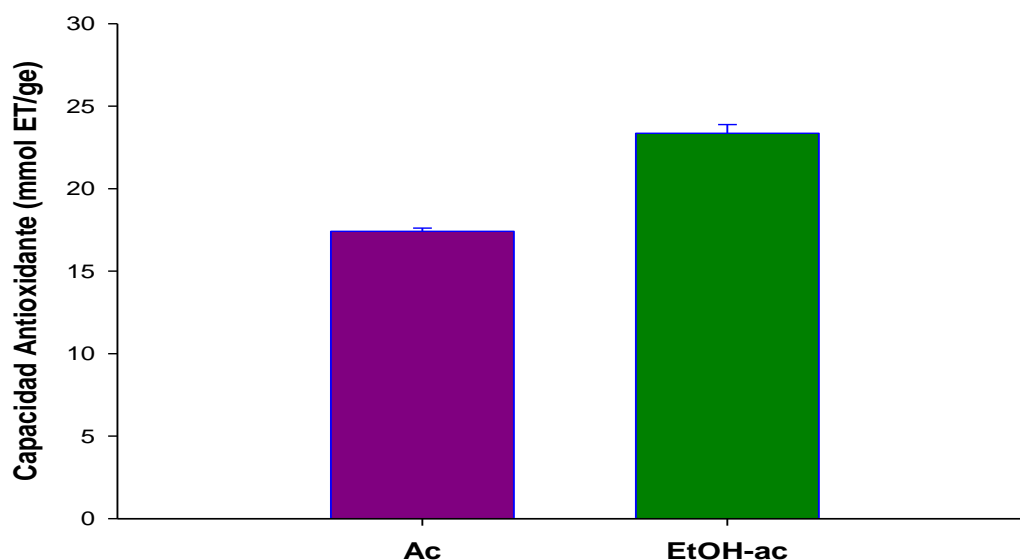


Figura 15. Capacidad antioxidante por medio del ensayo ABTS de extractos Ac y EtOH-ac de barchata (*Z. obtusifolia*). Los valores son la media \pm desviación estándar (n=3). ET en Equivalente Trolox (homólogo de la vitamina C) ge, gramo de extracto.

La figura 15, muestra la capacidad antioxidante para los extractos en la reducción del radical ABTS y se observan valores de 17.41 ± 0.01 mmol ET/ge y 23.35 ± 0.02 mmol ET/ge para los extractos Ac y EtOH-ac respectivamente. Así mismo, se observa que los extractos etanólicos acidificados mostraron mayor capacidad para inhibir este radical. Dorta y col. (2013) han observado que los sistemas ácidos son más efectivos en la recuperación de compuestos bioactivos, y que se favorece la hidrólisis de muchos enlaces como los glucosídicos, lo que permitiría aumentar la actividad biológica de algunos compuestos en los extractos de barchata, tales como el ácido glutámico y ácido aspártico los cuales se encuentran en la planta de barchata (Moran y col., 2014) y de acuerdo con Wu. (2009) estas sustancias activas presentan actividad antioxidante.

Capacidad Antioxidante Mediante la Prueba de Hemólisis

La peroxidación lipídica mediada por radicales libres es una de las causas más importantes en la destrucción y daño en las membranas, debido a que los ácidos poli-insaturados de la

membrana celular son degradados a través de este proceso oxidativo con el consecuente rompimiento de la integridad de la membrana (Ahn y col., 2007). Recientemente se han estado utilizando medios biológicos como eritrocitos humanos, con la finalidad de determinar la capacidad antioxidante de diversas sustancias bioactivas sobre la peroxidación lipídica de las células. Este método está basado en la formación de hemólisis generada por el radical AAPH [Dihidrocloruro de 2, 2-azobis (2-metil-amidinopropano)]. Este radical provoca la liberación del hierro desde la hemoglobina, actuando como pro-oxidante. La liberación del hierro desde los hematíes puede aumentar el efecto pro-oxidante de hidroperóxidos provenientes de la reacción del oxígeno y el AAPH (Velioglu y col., 1998).

La figura 16 muestra la capacidad protectora de los extractos Ac y EtOH-ac sobre el eritrocito humano. Se observó, que el porcentaje de inhibición de hemólisis fue de 46.3% y 32.6% para los extractos Ac y EtOH-ac, respectivamente. Actualmente no existen estudios donde evalúen la capacidad de los extractos de barchata para proteger al eritrocito humano, así mismo, no existen antecedentes de la especie *Ziziphus* donde se haya evaluado esta misma propiedad. Para fines de esta investigación se comparan los resultados con trabajos semejantes.

Magalhaes y col. en el 2009, analizaron el porcentaje de inhibición de hemólisis de extractos metanólicos de la cáscara y pulpa de membrillo y reportaron valores de 70 y 75%, respectivamente. Por otro lado, se ha demostrado que compuestos como el ácido gálico, elálgico, clorogénico, quercetina, catequina, rutina, carotenoides entre algunos otros poseen un efecto protector contra la hemólisis inducida de hasta 99% en eritrocitos humanos (Chirinos y col., 2008; Hapner y col., 2010). Asimismo, se ha reportado que extractos de hojas de plantas (*Toona Sinensis*) presentan valores de inhibición (75 a 85%) (Hseu y col., 2008).

En general, se observa que los diversos reportes muestran valores en el orden del 30% al 40% superior a los encontrados en nuestro estudio. Esta divergencia se puede explicar a la diversidad de técnicas utilizadas para obtener los extractos, o bien, a la composición de los mismos.

Diaz y colaboradores en el 2013 reportaron que especies de *Ziziphus* contienen saponinas, las cuales son capaces de causar hemólisis en los eritrocitos (Martínez, 2001), dicha actividad se atribuye a la interacción de las saponinas con los esteroides de la membrana eritrocitaria, que induce un aumento de la permeabilidad de la membrana y un movimiento de iones provocando la entrada en exceso de agua y la salida del potasio, por lo que la membrana explota, permitiendo de este modo la salida de la hemoglobina (Bruneton, 2001).

Capacidad Antihemolítica

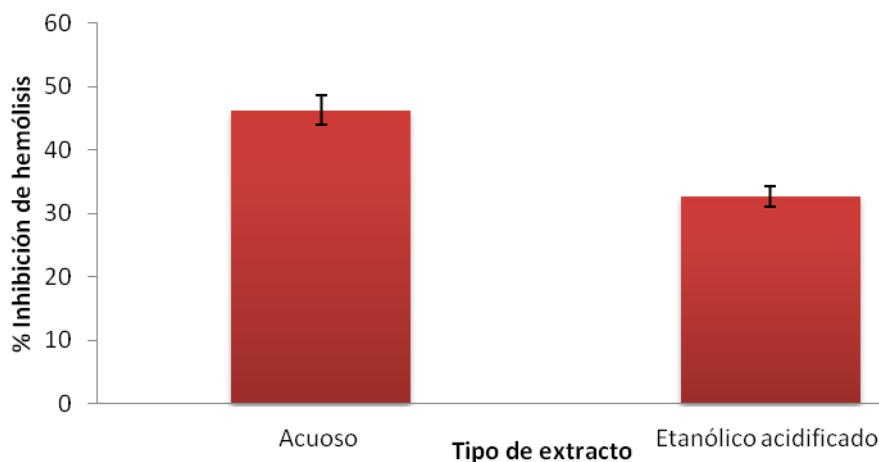


Figura 16. Capacidad antioxidante por medio del ensayo de % de inhibición de hemólisis inducida mediante AAPH de extractos acuosos y etanólicos acidificados de barchata (*Z. obtusifolia*).

Capacidad Antibacteriana

La tabla 1 muestra la actividad antibacteriana presente en los extractos EtOH-ac y Ac, medida en mm por halos de inhibición los cuales se observan en la figura 17. Se utilizaron dos concentraciones 5 y 10 mg/mL. La capacidad para inhibir la bacteria *E. coli* O157 en el extracto etanólico arrojó valores de 7.83 a 10.16 mm de diámetro, mientras que en el extracto acuoso los valores de inhibición fueron de 7.83 a 8.00 mm. Para la bacteria *Staphylococcus aureus* el extracto EtOH-ac mostró resultados de 8.00 a 9.00 mm de diámetro y en el extracto Ac se obtuvo una inhibición de 8.00 a 9.06 mm. En un estudio similar de extractos de *Zanthoxylum* se mencionan los halos de inhibición obtenidos de algunos antibióticos como tetraciclina con 9.00 mm para *S. aureus* y 10.00 mm para *E. coli*; antraciclina con 12.00 mm para *S. aureus* y 10.00 mm para *E. coli*; y kanamicina con 9.00 mm para *S. aureus* y *E. coli* (Patiño y col., 2011). En general los resultados obtenidos de los dos tipos de extracto fueron muy similares por lo que los dos tipos de extractos son considerados como buenos agentes antibacterianos para las bacterias estudiadas.

Por otro lado, también se observa que al aumentar la concentración del extracto la actividad contra las cepas evaluadas también incrementa. Lo cual nos indica que la actividad antibacteriana de los extractos es dependiente de la concentración.

Tabla 1. Capacidad antibacteriana de los extractos de *Z. obtusifolia*. Cada valor representa la media de tres datos.

Extracción	Concentración mg/mL	<i>E. coli</i> O157 Mm	<i>S. aureus</i> mm
EtOH-ac	5	7.83	8.00
	10	10.16	9.00
Ac	5	7.83	8.00
	10	8.00	9.06
Control: DMSO 5%	5	SA	SA
	10	SA	SA

SA= Sin actividad; DMSO Dimetil sulfóxido

La barchata contiene sustancias bioactivas tales como los aminoácidos vanila o leucina (Moran y col., 2014). A estos compuestos se les clasifica como bacteriocinas los cuales son efectivos contra microorganismos patógenos importantes como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp (Beristain y col., 2012), por lo que es posible que estas sustancias pudieran estar contribuyendo en la inhibición de las bacterias patógenas que se utilizaron en este estudio.

Por otro lado, en uno de los estudios realizados sobre especies a la que pertenece esta planta se detectaron ciertas sustancias como taninos, saponinas, resinas, polifenoles y glucósidos cardíacos (Abalaka, 2010). Así mismo, se ha informado que estos compuestos tienen actividad antimicrobiana (Moran y col., 2014), lo que nos permite suponer también que estas sustancias contribuyen en la inhibición de los microorganismos utilizados en este estudio, los cuales son organismos patógenos de interés en la salud pública. Además, es conocido que en los países en desarrollo, donde la medicina tiene alto valor en la economía, la investigación

de las actividades antibacterinas de plantas etnomedicinales siguen siendo una necesidad para atacar estos tipos de patógenos, lo cual representa un área de oportunidad para tratar padecimientos originados por estos organismos.

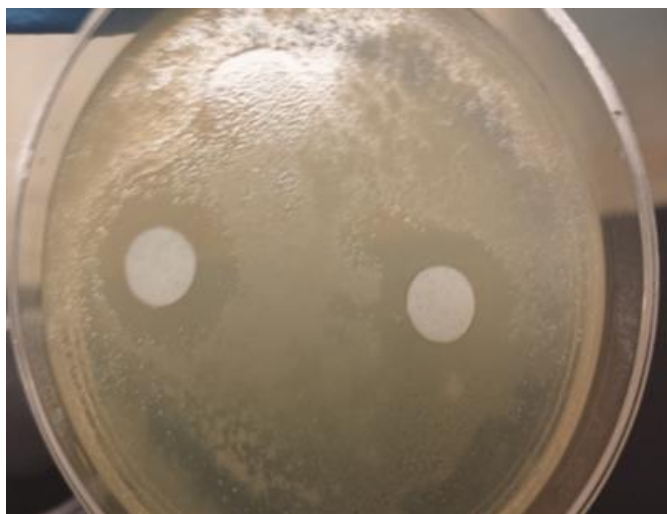


Figura 17. Halos de inhibición ocasionada por el extracto EtOH-ac sobre *E. coli* O157

Capacidad Antiviral

Los extractos Ac y EtOH-ac fueron aplicados al bacteriófago Av08 para determinar la tasa de supervivencia del virus y la dosis efectiva en el tiempo requerido y así observar la reducción del virus causado por el efecto de los extractos. Las reducciones de las unidades formadoras de placas en los distintos tratamientos se pueden observar en la figura 18.

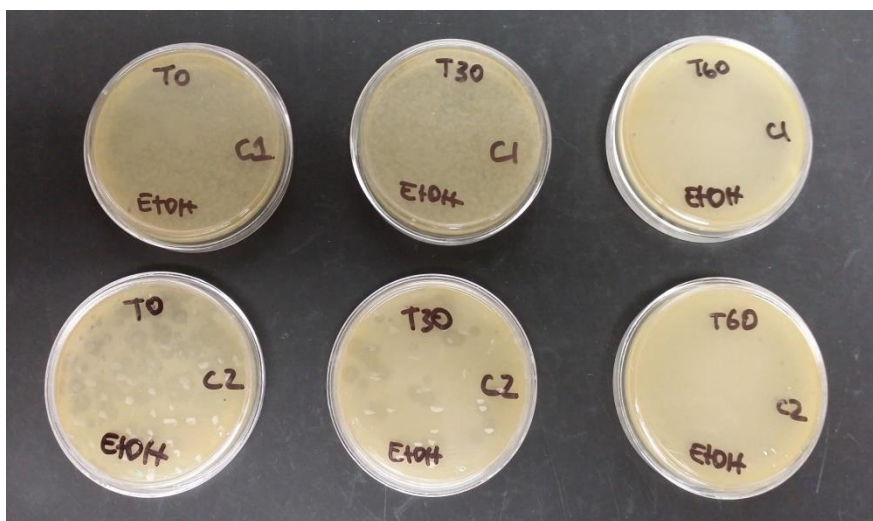


Figura 18. Reducción del bacteriófago Av08 causada por el extracto EtOH-ac.

Las reducciones logarítmicas se pueden observar en la figura 19 para los extractos EtOH-ac y figura 20 para los extractos Ac, los cuales muestran la reducciones del virus expresadas en Log_{10} UFP/mL para tres tiempos de contacto: 0, 30 y 60 minutos, utilizando dos concentraciones de 5 y 10 mg/mL. Así mismo, se puede observar que en ambos extractos en el tiempo 0 minutos, no hubo una reducción significativa en comparación con el valor del control ($p < 0,05$), sin embargo, a los 30 minutos de tiempo de contacto se observa una reducción significativa.

Por otro lado, en el extracto EtOH-ac en los primeros 30 minutos de contacto del fago Av08 con el extracto, mostró reducciones de 1.5- 1.8 Log_{10} UFP/mL, para las concentraciones 5 y 10mg/mL respectivamente. En los tiempos máximos de contacto del extracto con el fago se, observó una reducción de 4.30 Log_{10} UFP/mL al tiempo de contacto de 60 minutos para la concentración de 5 mg/mL, y en la concentración 10 mg/mL al mismo tiempo, mostró una reducción de 4.82 Log_{10} UFP/mL (figura 18).

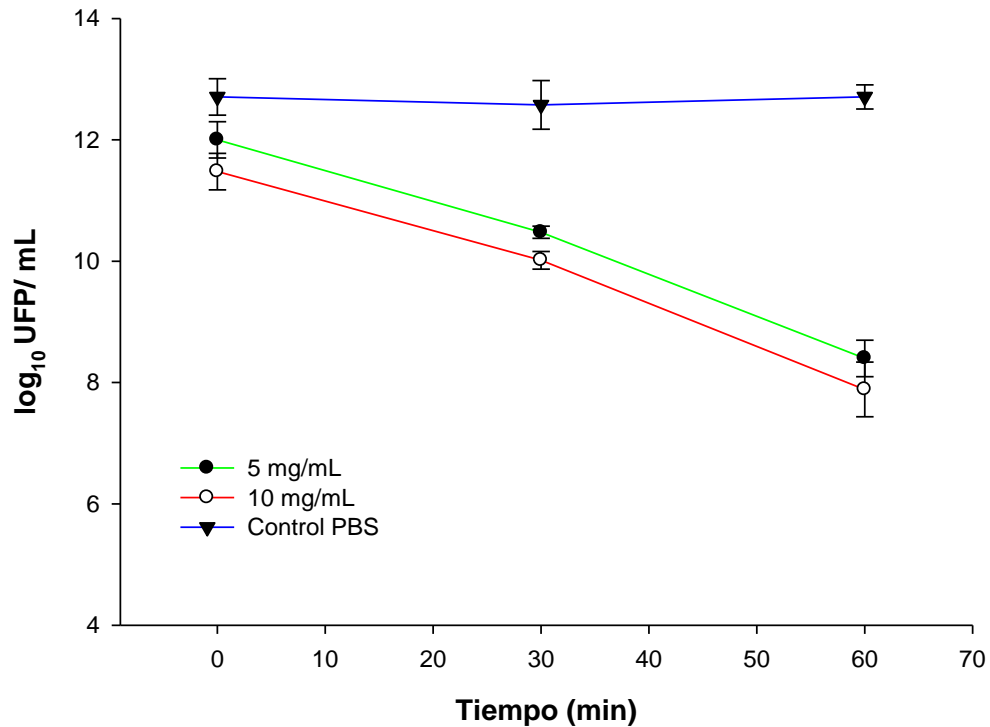


Figura 19. Actividad antiviral de los extractos EtOH-ac de *Ziziphus obtusifolia* medida por la reducción en Log₁₀ UFP/mL para los tiempos de contacto 0, 30 y 60 minutos a dos concentraciones 5 mg/mL y 10 mg/mL.

Para el extracto Ac en ambas concentraciones 5 y 10 mg/mL durante los primeros 30 minutos no mostraron reducciones significativas, arrojando valores de reducción por el orden de 0.70 Log₁₀ UFP/mL y fue hasta los 60 minutos que disminuyó 1.50 logaritmos en 5 mg/mL. Sin embargo, la reducción no es alta al compararlo con la reducción mostrada a los 10 mg/mL, posiblemente se debió al agotamiento y reducción de la biodisponibilidad de los metabolitos activos o compuestos después de 30 min del tiempo de contacto con los extractos. Investigaciones similares donde han estudiado la reducción de colifagos con extractos naturales a bajas concentraciones, evaluando la tasa de supervivencia del colifago Av05, también han encontrado que la mayor reducción en el título viral se produce en los primeros 20 minutos de tratamiento, después de lo cual la reducción disminuye (Silva y col., 2014).

También se observa que al aumentar la concentración a 10 mg/mL en el tiempo máximo de contacto 60 minutos se observó una reducción de 7.40 Log₁₀ UFP/mL. Dicha reducción fué la más alta observada en este estudio antiviral con barchata (figura 20).

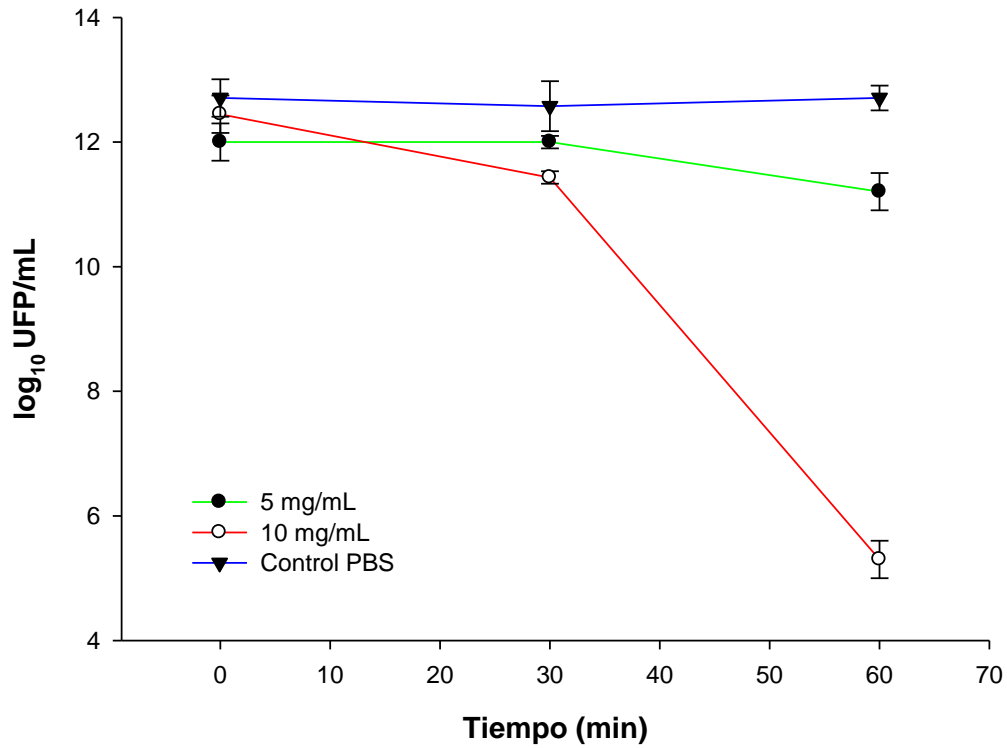


Figura 20. Actividad antiviral de los extractos acuosos de *Ziziphus obtusifolia* medida por la reducción en Log₁₀ UFP/mL para los tiempos de contacto 0, 30 y 60 minutos a dos concentraciones 5 mg/mL y 10 mg/mL.

El bacteriófago ADN Av08, utilizado en este estudio fue previamente aislado de las heces de aves de corral. Algunos estudios han demostrado que los bacteriófagos aislados de aves de corral son parte de la microbiota del medio ambiente, lo que demuestra la ocurrencia natural de fagos en el tracto intestinal. Así mismo, con ello se justifica su uso como modelo enteroviral (López y col., 2011).

En un estudio de determinación de aminoácidos, se encontró que barchata contiene alanina, valina y leucina (Moran y col., 2014) los cuáles son sustancias que se le atribuye capacidad antimicrobiana propias de algunas plantas (Beristain y col., 2012), por lo que éstas sustancias pudieran ser la causa de la reducción viral encontrada en el presente estudio. Eun-Hye y col. en el 2015, encontraron que los ácidos betulínicos derivados de *Ziziphus jujuba* mostraron actividad antiviral contra el virus de la influenza A/PR/8 inducido en ratones. Además, en un estudio donde se evaluó la actividad antiviral de plantas medicinales frente al virus del Hepatitis B (VHB) en líneas celulares se encontró que extractos de *Eucalyptus* spp. mostraron la mayor actividad antiviral de las plantas estudiadas, donde se dice que los compuestos fenólicos son los responsables de dicha actividad inhibitoria y en el presente estudio se encontró la presencia de éstos compuestos. Por lo que no se descarta la actividad de estos compuestos como antiviral.

CONCLUSIONES

- Los extractos EtOH-ac y Ac de *Z. obtusifolia*, mostraron valores altos de capacidad antioxidante al inhibir los radicales DPPH y ABTS.
- Los extractos EtOH-ac y Ac, presentaron una actividad media anti hemolítica, contra la hemólisis inducida por el radical AAPH.
- Los extractos acuosos presentaron la mayor actividad biológica inhibiendo bacterias patógenas como *E. coli* y *S. aureus*.
- Los extractos EtOH-ac y Ac, mostraron efectividad en la reducción del modelo enteroviral Av08.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar el análisis de los componentes individuales de los extractos EtOH-ac y Ac, con el fin de comprobar de manera individual cuales son las sustancias que provocan la actividad biológica encontrada en esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abalaka ME, Daniyan SY, Mann A. 2010. Evaluation of the antimicrobial activities of two *Ziziphus* species (*Ziziphus mauritiana* L. and *Ziziphus spinachristi* L.) on some microbial pathogens. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4(4):135-139.
2. Abedon ST, Herschler TD, Stopar D. 2001. Bacteriophage-latent period evolution as a response to resource availability. *Applied Environmental Microbiology*. 67(9):4233–4241.
3. Abedon ST, Hyman P, Thomas C. 2003. Experimental examination of bacteriophage latent-period evolution as a response to bacterial availability. *Applied Environmental Microbiology*. 69(12):7499– 7506.
4. Andrews J. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 48(1):5-16.
5. Ashelford KE, Day MJ, Fry JC. 2003. Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Applied Environmental Microbiology*. 69(1):285–289.
6. Ahn J, Kim Y, Seo E, Choi Y, Kim H. 2007. Antioxidant effect of natural plant extracts on the microencapsulated high oleic sunflower oil. *Journal Food Engineering*. (84): 327 – 334 p.
7. Alisky, J., Iczkowski, K., Rapoport, A., Troitsky, N. 1998. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *Journal and Infections*. 36 (1): 5 –15 p.
8. Alves A, Bragagnolo N, Da Silva M, Skibsted L, Orlien V. 2012. Antioxidant protection of high-pressure processed minced chicken meat by industrial tomato products. *Food and Bioproducts Processing*. 90:499-505.
9. Aldershvile J, Ambrosio G, Bayés de Luna A, Badimon L, Bertrand ME, Cleand J. 1998. Estrés oxidativo (especies de oxígeno reactivo), patología cardiovascular (Parte I). *European Cardiology J3*. 72.
10. American Society Microbiology. 2005. Gram Stain: Gram-Variable Rods and Cocci. [Internet]. *MicrobeLibrary.org*. [citado 2015 sep 22]. Disponible en: <http://lib.jiangnan.edu.cn/asm/116-introduce.htm>
11. Antolovich M, Prenzler P, Patsalides E. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *The royal society of chemistry*. 127:183-198.
12. Atterbury RJ, Connerton PL, Dodd CER, Rees CED, Connerton, IF. 2003. Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied Environmental Microbiology*. 69(10):6302– 6306.

13. Bachrach G, Leizerovici-Zigmond M, Zlotkin A, Naor R, Steinberg D. 2003. Bacteriophage isolation from human saliva. *Letter Applied to Microbiology*. 36(1):50–53.
14. Bamforth CW. 2002. Nutritional aspects of beer, a review. *Nutrition Research*. 22: 227–237.
15. Barrow P, Lovell M, Berchieri A. 1998. Use of lytic bacteriophage for control of experimental *Escherichia coli* septicemia and meningitis in chickens and calves. *Clinic Diagnostic Laboratory Immunology*. 5(3):294–298.
16. Beristain SC, Palou E, López A. 2012. Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 6(2):67-78.
17. Besser R, Lett S, Weber J, Doyle M, Barret T, Wells J. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *E.coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *Journal of the American Medical Association*. 269:2217-2220.
18. Bielke L, Higgins S, Donoghue A, Hargis BM. 2007. *Salmonella* host range of bacteriophages that infect multiple genera. *Poultry Science*. 86(12):2536–2540.
19. Biesalski H, Dragsted L, Elmadfa I, Grossklaus R, Muller M, Schrenk D, Walter P, Weber P. 2009. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*. 25(11-12): 1202-1205.
20. Blanco J, Blanco M, Blanco J, Alonso M, Escribano A. 1993. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico de las infecciones producidas por *Escherichia coli* enterohemorrágicos productores de verotoxinas. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 11:324-334.
21. Borgia W, Reciob MC, Ríosb JL, Chouchanea N. 2008. Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam South African *Journal of Botany*. 74:320–324.
22. Boulanouar B, Abdelaziz G, Aazza S, Gago C, Miguel M. 2013. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*. 46: 85-96.
23. Bowers JE, Wignall B. 1993. *Shrubs and Trees of the Southwest Deserts*. Southwest Parks and Monuments Association Tucson Arizona. 140.
24. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 28:25-30.
25. Brooks GF, Carroll KC, Butel, JS, Morse SA. 2008. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 19 ed. El Manual Moderno.

26. Bruneton, J. (2001). Saponósidos. In Farmacognosia, Fotoquímica, Plantas Medicinales. 2nd. Zaragoza, España. Acribia. 664-709 p.
27. Brüsow H. 2005. Phage therapy: the *Escherichia coli* experience. Microbiology. 151(7):2133–2140.
28. Camel V. 2000. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. Trends in Analytical Chemistry. 19(4):229-248.
29. Capparelli R, Parlato M, Borriello G, Salvatore P, Lannelli D. 2007. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 51(8):2765– 2773.
30. Capra ML, Quiberoni AL, Ackermann, HW, Moineau S, Reinheimer JA. 2006. Characterization of a new virulent phage (MLC-A) of *Lactobacillus paracasei*. Journal. Dairy of Science. 89(7):2414–2423.
31. Campbell, A. 2003. The future of bacteriophage biology. Natures. Review. Genetic. 4 (6): 471–477 p.
32. Carey GV, Billington C, Cornelius AJ, Hudson JA, Heinemann JA. 2006. Isolation and characterization of bacter-iophages infecting *Salmonella* spp. FEMS Microbiology of Letter. 258 (2):182–186.
33. Carter JL. 1997. Trees and Shrubs of New Mexico. Johnson Books, Boulder, CO. 534 p.
34. Chávez A. 2008. Extractos vegetales con efecto fungicida, insecticida o nematicida. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Gobierno de Costa Rica.
35. Chirinos R, Campos D, Wamier M, Pedreschi R, Rees J, Larondelle Y. 2008. Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological *in vitro* assays. Food Chemistry. 111: 98-105.
36. Costa, P., Goncalves, S., Valentao, P., Andrade, P., Coelho, N. & Romano, A. 2012. Thymus lotocephalus wild plants and *in vitro* cultures produce different profiles of phenolic compounds with antioxidant activity. Food Chemistry. 135(3):1253-1260.
37. Cruz M, Madeira V, Almeida L, Custódio B. 2000. Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. Biochemical Biophysica Acta.1464(1):49-61.
38. Dahiru D, Williams ET, Nadro MS. 2005. Protective effect of *Ziziphus mauritiana* leaf extract on carbon tetrachloride-induced liver injury. African Journal of Biotechnology. 4(10):1117-1179.
39. Daniels CW, Rautenbach F, Mabusela WT, Valentine AJ, Marnewick JL. 2011. Comparative antioxidant capacity and content of leaves, bulbs, roots, flowers and fruit of

- Gethyllis multifolia* L. Bolus and *G. villosa* Thunb. Species South African Journal of Botany. (77):711–717.
40. Davidson PM. 2001. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. Food Microbiology: and Fundamentals and frontiers. (29): 593-627.
 41. Dias R. y col. 2013. Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. (436):736-743.
 42. Dorta E, Lobo MG, González M. 2013. Optimization of factors affecting extraction of antioxidants from Mango seed. Food and Bioprocess Technology. 6(2):1067-1081.
 43. Doyle M, Beuchat L, Montville T. 2001. Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras. Acribia. Zaragoza, España. 371-393 p.
 44. Drago M, López M, Saínz T. 2006. Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 37(4):58-68.
 45. Epple AO. 1995. A Field Guide to the Plants of Arizona. Falcon Publishing Inc., Helena, MT. 347 p.
 46. Ernst E. 2000. Herbal medicines: where is the evidence? Growing evidence of effectiveness is counterbalanced by inadequate regulation. Br Med J. 321: 395-396.
 47. Ewing WH. 1985. Identification of Enterobacteriaceae. 4th. Ed, Elsevier.
 48. Eun-Hye H, Jae H Kyo B, Sang H, Hyun-Jeong K, Heejung Y. 2015. Anti-Influenza Activity of Betulinic Acid from *Zizyphus jujuba* on Influenza A/PR/8 Virus. Biomolecules and Therapeutic. 23(4):345-349.
 49. FSAI. (The Food Safety Authority of Ireland). *Staphylococcus aureus*. Disponible en: http://www.fsai.ie/publications/factsheet/factsheet_Staphylococcus_aureus%20.pdf. (Fecha de acceso: 20 de septiembre de 2015).
 50. Fiorentin L, Vieira ND, Barioni W, Barros S. 2004. *In vitro* characterization and in vivo properties of *Salmonella* lytic bacteriophages isolated from free-range layers. Brazilian Journal of Poultry Science. 6(2):121–128.
 51. Food and Drug Administration. 2006. FDA approval of Listeria-specific bacteriophage preparation on ready-to-eat (RTE) meat and poultry products. CFSAN / Office of Food Additive Safety College Park, Md., USA. Disponible en: http://www.enq.ufsc.br/disci/eqa5217/material_didatico/fda_bacteriofagos.htm (Fecha de acceso: 5 de marzo de 2015).

52. Friaa O, Brault D. 2006. Kinetics of the reaction between the antioxidant Trolox and the free radical DPPH[·] in semi-aqueous solution. *Organic & Biomolecule Chemistry*. 4:2417-2423.
53. García JA, Ramos M del R, Mora J. 1999. Estructura de la semilla de aguacate y cuantificación de la grasa extraída por diferentes técnicas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 5: 123-128 p.
54. García JA, Cantón R, García JE, Gómez MA, Martínez L, Rodríguez C, Vila J. 2000. Métodos Básicos para el Estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed. Juan J. Picazo. 4-54 p.
55. Garrity G, Bell J, Lilburn T. 2004. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, release 5.0. New York, Springer.
56. Gião M, Pereira C, Pintado M, Malcata F. 2008. Effect of technological processing upon the antioxidant capacity of aromatic and medicinal plant infusions: From harvest to packaging. *Food Science and Technology*. 50:320-325.
57. Gonzalez M, Marioli J. 2010. Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104: 209-213.
58. Gonzalez RL, Roque A, Morier R, Rodríguez L. 2006. Evaluación de la actividad antiviral de plantas medicinales frente al virus de la hepatitis B (VHB) en células PLC/PRF/5. *Revista Cubana Medicina*. 58(2):103-108.
59. Haidarim M, Ali M, Ward S, Madjid M. 2009. Pomegranate (*Punicagranatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*. 16: 1127-1136.
60. Halliwell B, Gutteridge J. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press. 3rd ed. New york.
61. Hapner C, Deuster P, Chen Y. 2010. Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. *Chemico-Biological Interactions*. 186(3): 275-279.
62. Hernández C, Aguilera M, Castro G. 2011. Situación de los problemas gastrointestinales en México. 140.
63. Herodez S, Hadolin M, Skerget M, Knez Z. 2003. Solvent extraction study of antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *Food Chemistry*. 80(2):275-282.

64. Hirschler-Laszkiwicz, I, Zhang W, Keefer K, Conrad K, Tong Q, Shu-jen C. 2012. Trpc2 depletion protects RBC from Oxidative Stress Induced Hemolysis. *Exp Hematology*. 40(1):13.
65. Hseu Y, Chang W, Chen C, Liao J, Huang C, Lu F, Chia Y, Hsu H, Wu J, Yang H. 2008. Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leave extract using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology*. 46:105-114.
66. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1998. *Microorganismos de los Alimentos: Características de los Patógenos Microbianos*. Ed Acribia España.
67. Jasso D, Rodriguez R, Hernandez F, Aguilar C, Sáenz A, Villareal J, Moreno Z.. 2011. In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*. 34: 960–96.
68. Jiménez M, Navas J, Jimenez R. 2005. Evolución de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, el agente de la Fusariosis vascular del garbanzo, en razas patogénicas y patotipos. *Vegetales y plagas*. 31: 59-69 p.
69. Kang D, Yun C, Lee H. 2003. Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*. 87(2-3):231-236.
70. Kearney TH, Peebles R. 1960. Supplement. *Arizona Flora*. University of California Press, Berkeley, CA. 1,085 p.
71. Kérouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, De Buyser ML. 2007. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal Food Microbiology*. 115(3):369-75.
72. Labieniec M, Gabryelak T. 2005. Measurement of DNA damage and protein oxidation after the incubation of B14 Chinese hamster cells with chosen polyphenols. *Toxicology and Letters*. 155 (1):15-25.
73. Li C, Yue W, Cheng C. 2003. Antibacterial and DPPH free radical scavenging activities of ethanol extract of propolis collected in taiwan. *Journal of Food and Drugs Analysis* 11(4): 277-282.
74. López O, Castro N, León J, Valdez B, Chaidez C. 2012. Evaluation of bacteriophage AV-08 for simultaneous biocontrol of *Salmonella montevideo* and *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally contaminated chicken skin. *Journal of Food Safety*. 32(3):305-310.

75. Lorenzo J, González R, Sánchez M, Amado I, Franco D. 2013. Effects of natural (grape seed and chestnut extract) and synthetic antioxidants (butylatedhydroxytoluene, BHT) on the physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of dry cured sausage "chorizo". *Food Research International*. 54: 611-620.
76. Magalhaes A, Silva B, Pereira J, Andrade P, Valentao P, Carvalho M. 2009. Protective effect of quince (*Cydonia oblonga Miller*) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*. 47(6): 1372-1377p.
77. Mahejabeen F, Kumar R, Misra K, Syed IR. 2013. Protective effect of the aflavin on erythrocytes subjected to in vitro oxidative stress. *Biochemistry Res. International*
78. Martin IE, Tyler SD, Tyler KD, Khakhria WM. 1996. Evaluation of ribotyping as epidemiologic tool for typing *Escherichia coli* serogroup O157 isolates. *Journal Clinoc Microbiology*. 34: 720-723.
79. Martínez M. 1995. Oxygen free radicals and human diseases. *Biochemical*. 77:147-61 p.
80. McKee T, McKee J. *Bioquímica, las bases moleculares de la vida*. 2009. 4ta ed. Mc Graw Hill.
81. Moran EF, Tortoledo O, Yañes GA, Zamora LA, Sthepens NA, Soñanez JG, Ochoa LM, Rosas JA. 2014. Determination of Amino Acids in Medicinal Plants from Southern Sonora, Mexico. *Tropical Journal of Pharmacology*. 13(4): 604.
82. Moein S, Moein, MR. 2010. Relationship between antioxidant properties and phenolics in *Zhumeriamajdae*. *Medicinal Plants*. 4(7):517-521.
83. Molyneux P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal Science Technology*. 26(2):211-219.
84. Mossel D, Moreno B, Struijk C. 2003. *Food Microbiology*. *Acribia*. 25(3)15-26.
85. Navas PB, Carrasquero A. 2012. Estudio cinético y termodinámico de la autooxidación del aceite refinado de soya en presencia de un extracto de ponsigué (*Ziziphus mauritiana*). *Interciencia*. 37(10):757-761.
86. Neidhardt FC. 1999 *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular Biology. 2nd ed. ASM Press, Washington.
87. Nickrent DL. 2007. Flowering shoots of Lotebush. USA: TX: Kirkpatrick Ranch, 5 miles S of Post. Disponible en: http://phytoimages.siu.edu/imgs/psor/Rhamnaceae_Ziziphus_obtusifolia_5544.html (Fecha de acceso: 16 de octubre de 2015).

88. Pao S, Randolph SP, Westbrook EW, Shen H. 2004. Use of bacteriophages to control of Salmonella in experimentally contaminated sprout seeds. *Journal of Food Science*. 69(5): 127–130.
89. Pepeljnjak S, Kalodera Z, Zovko M. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids from *Pelargonium radula* (Cav.) L' Hérít *Acta Pharmaceutica*. 55:431–435.
90. Pérez J, Saura C. 2006. Effecto of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assay. *Food Research International*. 39: 791-800.
91. Pisoschi A, Cheregi M, Danet A. 2009. Antioxidant capacity of some commercial fruit juices: electrochemical and spectrophotometrical approaches. *Molecules*. 14: 480-493.
92. Proestos C, Lytoudi K, Mavromelanidou K, Zoumpoulakis P, Sinanoglou V. 2013. Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants*. 2: 11-22 p.
93. Raal A, Orav A, Püssa T, Valner C, Malmiste B, Arak E. 2012. Content of essential oil, tepenoids and polyphenols in commercial chamomile (*Chamomillarecutita L. Rauschert*) teas from different countries. *Food Chemistry*. 131: 632-638.
94. Ramirez RG, Haenlein GFW, Nuñez MA. 2001. Seasonal variation of macro and trace mineral contents in 14 browse species that grow in northeastern Mexico. *Small Ruminant Research*. 39(2):153-159.
95. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26(9):1231-1237.
96. Rodak. 2005. *Hematología*. 2a ed. Panamericana
97. Rodríguez EN. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*. 7(1): 154-170.
98. Rybczynska M. 1994. Biochemical aspects of free radical mediated tissue injury. *Postepy Hig Med Dows*. 48(4):419-41.
99. SCFI. 1999. NMX-BB-040-SCFI. 1999. General methods for analysis-antimicrobial activity. México: Norma Oficial Mexicana, Secretaria de economía, Diario Oficial de la Federación.
100. Santisteban, J. Curso de Tópicos en Enfermedades Infecciosa. Enlace Hispano Americano de la Salud. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/ehas/medicina/enfermedades%20infecciosas/Semana%203-6.htm> (Fecha de acceso: 25 de enero de 2015).

101. Serkedjieva J. 2003. Influenza virus variants with reduced susceptibility to inhibition by a polyphenol 364 extract from *Geranium sanguineum* L. *Pharmazie*. 58: 53–57.
102. Sharma M, Bhatnagar SK, Parmar K, Gupta S, Goyal P. 2014. *Ziziphus*: A prospective multi application fruit tree.
103. Silva NP, Ruíz S, Chaidez C, Ornelas J, López MA, Márquez E, Estrada MI. 2014. Chemical constitution and effect of extracts of tomato plants byproducts on the enteric viral surrogates. *International Journal of Environmental Health Research*. 25(3): 299-311.
104. Smith JE. 1987. Erythrocyte membrane: structure, function, and pathophysiology. *Vet Pathology*. 24(6):471-476.
105. Tavares L, Santos M, Viccini L, Moreira J, Miller R, Franco O. 2008. Review: Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. (29): 1842-1851 p.
106. Tolo F. M, Rukunga GM, Muli FW, Njagi ENM, Njue W, Kumon K, Mungai GM, Muthaura CN, Muli JM, Keter LK, Oishi E, Kofi MW. 2006. Anti-viral activity of the 371 extracts of a Kenyan medicinal plant *Carissa edulis* against herpes simplex virus. *J. Ethnopharmacology*. 372 (104): 92–99.
107. Tres, JC. 2006. Interacción entre fármacos y plantas medicinales. *Centro de Farmacovigilancia de Navarra*. 29 (2): 233-252 p.
108. Turner RM, Bowers JE, Borgess TL. 2005. *Sonora Desert Plants*. 1a edition The university of Arizona Press Copyright
109. Ugartondo V, Mitjans M, Lozano C, Torres JL, Vinardell MP. 2006. Comparative study of the cytotoxicity induced by antioxidant epicatechin conjugates obtained from grape. *J Agric Food Chem*.54 (18): 6945-6950 p.
110. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. 2009. *Amino Acids*. 37: 1-17.
111. Zhang H, Zhang X, Yang X, Qiu N. 2013. Microwave assisted extraction of flavonoids from cultivated *Epimedium sagittatum*: extraction yield and mechanism, antioxidant activity and chemical composition. *Industrial crops and Products*. 50: 857-865.
112. Zhao F, Liu Z, Wu D. 2008. Antioxidative effect of melatonin on DNA and erythrocytes against free-radical-induced oxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*. 151(2): 77–84.