

Trabajo científico

Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) I.M. Johnst del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos

Antibacterial and cytotoxic activity of *Leucophyllum frutescens* (Berl) I.M. Johnst from Northern Mexico against *Staphylococcus aureus* clinical isolates

María del Carmen Vega-Menchaca,¹ Julia Verde-Star,¹ Azucena Oranday-Cárdenas,¹ María Eufemia Morales-Rubio,¹ María Adriana Núñez-González,¹ Mario Alberto Rivera-Guillén,² Luis Benjamín Serrano-Gallardo,² Catalina Rivas-Morales¹

¹Departamento de Química, Laboratorio de Fitoquímica y Química Analítica, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León, México

²Departamento de Bioquímica y Farmacología, Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila, México

Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana y citotóxica del extracto metanólico crudo de *Leucophyllum frutescens* Var. (Berl) I.M. Johnst ("cenizo") contra la cepa de *Staphylococcus aureus* de un aislado clínico. El estudio de la actividad antimicrobiana demostró que el extracto de hojas de *Leucophyllum frutescens* presenta actividad en las tres concentraciones evaluadas 1000, 500 y 250 µg/mL, con una concentración mínima inhibitoria de 25.4 µg/mL. En el ensayo de *Artemia salina*, el extracto presentó toxicidad con una DL₅₀ 196.37 µg/mL y resultó activo sobre líneas celulares VERO encontrándose una IC₅₀ de 58.0 µg/mL. Estos hallazgos contribuyen al conocimiento científico de las plantas medicinales del Norte de México con propiedades antibacterianas.

Abstract

The aim of this work was the evaluation of the antimicrobial and cytotoxic activity of methanolic extract of crude *Leucophyllum frutescens* Var. (Berl) I. M. Johnst ("Texas Sage", "Texas Ranger" or "Silverleaf") against *Staphylococcus aureus* strain from a clinical isolate. The study of the antimicrobial activity showed that the extract has activity at three evaluated concentrations 1000, 500 and 250 µg/mL, with a minimum inhibitory concentration of 25.4 µg/mL. In the *Artemia salina* assay, the extract showed toxicity with a DL₅₀ 196.37 µg/mL and was active on VERO cell lines having an IC₅₀ of 58.0 µg/mL. These findings contribute to the scientific knowledge of medicinal plants in North of México with antibacterial properties.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, toxicidad, citotoxicidad, extracto metanólico, *L. frutescens*.

Key words: antimicrobial activity, toxicity, cytotoxicity, methanolic extract, *L. frutescens*.

Correspondencia:

M en C María del Carmen Vega Menchaca
Laboratorio de Fitoquímica y Química Analítica
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León
Av. Torre Latino #579
Fraccionamiento Las Torres CP 27085, Torreón Coahuila
Tel. (871)2033020
E-mail carmelitavega2006@yahoo.com.mx

Fecha de recepción: 25 de octubre de 2012

Fecha de recepción de modificaciones:

29 de marzo de 2013

Fecha de aceptación: 12 de mayo de 2013

Introducción

Las enfermedades infecciosas son consideradas un problema de salud pública debido a que son causa importante de mortalidad alrededor del mundo por el fenómeno de la resistencia bacteriana, sobre todo en el ambiente hospitalario, donde el uso continuo de fármacos antibacterianos ha favorecido la selección de cepas menos sensibles o de cepas portadoras de resistencia contra uno o más antibióticos.¹⁻⁴ Durante las últimas tres décadas el problema de resistencia bacteriana ha ido en aumento por la aparición de bacterias patógenas multi-drogo resistentes.⁵ La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima que el 80% de la población mundial usa la medicina tradicional para cubrir sus necesidades primarias de salud.⁴ En medicina tradicional diversas enfermedades infecciosas han sido tratadas con remedios herbolarios.^{6,7} Por este motivo la OMS promueve la búsqueda constante de nuevos antibióticos que contrarresten la resistencia de los microorganismos ya existentes y los reemergentes, por lo que se ha incrementado el interés de las plantas medicinales debido a que contienen una gran cantidad de principios activos que pueden ser útiles en el desarrollo de antibióticos.^{4,8} En las últimas décadas se ha incrementado el interés por los productos naturales y sus posibles aplicaciones en la industria farmacéutica en búsqueda de nuevos medicamentos más seguros y eficaces; aproximadamente el 30% de los fármacos empleados en los países industrializados proceden o se han sintetizado a partir de productos vegetales, por lo que los extractos de plantas son una fuente atractiva de nuevos medicamentos.^{5,9}

La especie vegetal *Leucophyllum frutescens* es un arbusto que pertenece a la familia Scrophulariaceae, es conocido al Norte de México en los estados de Coahuila y Nuevo León como cenizo, crece hasta 2.5 metros de altura, ramificado y de hojas grises, las flores crecen como campana con un tamaño de 25 mm, de color lila y florece tres veces al año.¹⁰ Existen reportes de su uso en medicina tradicional para tratar infecciones pulmonares incluyendo tuberculosis, diarrea y disentería, en procesos febriles, tos, asma y desórdenes del hígado.^{8,11} Existen antecedentes de que algunas plantas del Norte de México inhiben el crecimiento de *S. aureus*.¹² En estudios recientes realizados con extractos orgánicos de 14 plantas de la flora del Norte de México usadas para el tratamiento de enfermedades respiratorias, encontraron que las hojas de *Cordia boissieri* mostraron gran actividad antimicrobiana contra la cepa de *Staphylococcus aureus*. En ese mismo estudio, los autores reportan que *Leucophyllum frutescens* mostró actividad antituberculosa contra cepas sensibles y resistentes de *Mycobacterium tuberculosis*.¹³ Se han reportado pocos estudios fitoquímicos destacando la presencia de lignanos fitotóxicos diayangambina, epiyangambina, diasesartemina y epiasantina,¹⁴ leubetanol¹⁵ y furanolignano¹⁶ con actividad antituberculosa.

Staphylococcus aureus es la principal bacteria que causa infecciones hospitalarias, además es el agente causal de diversas enfermedades, incluyendo endocarditis, osteomielitis, síndrome de shock tóxico, neumonía y abscesos, en muchos casos los trabajadores del área de la salud son la fuente de infección ya que son portadores de la bacteria.¹⁷

Dada la relevancia del uso terapéutico de la flora vegetal en México así como la persistente búsqueda de nuevas alternativas naturales para el desarrollo de nuevos fármacos basados en el aislamiento de compuestos de los extractos vegetales, que brinden mayor calidad de vida y promuevan la buena salud reduciendo los efectos secundarios de los mismos, se vuelve necesaria la realización de estudios biológicos, toxicológicos, clínicos y fitoquímicos que permitan una mayor caracterización de los extractos vegetales.^{9,18}

Los ensayos de citotoxicidad, son capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares, los efectos adversos de interferencia con estructura y/o propiedades esenciales para la supervivencia celular, proliferación y/o funciones, dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, de regulación iónica y división celular.¹⁹ Comúnmente, en los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares, se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento. Una prueba *in vitro* ideal para evaluar la proliferación celular y la citotoxicidad debe tener como características principales la simplicidad, rapidez, económica, reproducibilidad, sensibilidad y efectividad en la medida de la población celular viable y que no muestre interferencia con el compuesto a evaluar.^{20,21} Existen diferentes métodos para realizar ensayos de citotoxicidad *in vitro*: uso de colorantes como cristal violeta y sulforrodamina B, que colorean componentes específicos de las células y permiten medir residuos celulares después de un tiempo de incubación con el compuesto evaluado, detectores de liberación de componentes constitutivos celulares, que miden la actividad de enzimas tales como lactato deshidrogenasa, y finalmente, aquellos que miden la función metabólica de las células usando sales de tetrazolio.^{21,22} Cada vez hay más evidencia de la actividad farmacológica del cenizo, además de la actividad anti-*Mycobacterium tuberculosis*, se ha reportado la actividad antioxidante y antifúngica.^{12,23} Con estos antecedentes y por el interés de profundizar en el conocimiento de la flora mexicana y su posible contribución a la etnofarmacología, se realizó este trabajo con el objetivo de evaluar el potencial antimicrobiano del extracto metanólico de hojas en *Leucophyllum frutescens* recolectado en la Región Norte de México en base a la información obtenida de entrevistas etnobotánicas, y por su distribución en el semidesierto del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* causante de enfermedades infecciosas.

Material y métodos

Material Biológico

La cepa de *Staphylococcus aureus* de aislado clínico fue proporcionada por el cepario del Laboratorio de Microbiología del Hospital Infantil Universitario de la ciudad de Torreón México. La cepa de referencia *Staphylococcus aureus* (ATCC BAA44) fue proporcionada por el Laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey Nuevo León, México. *Artemia salina* (Brine ShrimpEggs® San Francisco Bay Brand, INC). Células VERO (ATCC CCL-81) proporcionadas por el Instituto de Salud Pública de Cuernavaca, México.

Preparación del material vegetal y extracción

Material vegetal

La especie vegetal se recolectó durante el mes de Mayo del año 2010 en el poblado de Tlahualilo ubicado en el semidesierto Chihuahuense que comprende la Región Lagunera en el Norte de México a una altitud de 1200 msn. El ejemplar fue autentificado por el Biólogo Eduardo Blanco Contreras de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y se depositó un ejemplar en el herbario de la misma universidad con el número de registro UAAANL007/2012.

Preparación del material vegetal y extracción

Los solventes más ampliamente usados en investigaciones de actividad antimicrobiana en plantas son el metanol, etanol y agua. Se ha encontrado que los extractos vegetales con solventes orgánicos proporcionan mejor actividad antimicrobiana comparada con los extractos acuosos.²⁴ Con base a ello se realizaron pruebas preliminares para seleccionar el mejor solvente entre el extracto acuoso y metanólico.

Las hojas de *Leucophyllum frutescens* se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de polvo y partículas extrañas, por desecación artificial se secaron en una estufa a una temperatura de 40° C, después se separaron las hojas y se trituraron en un molino (Wiley® modelo 4). Se pesaron 50 g de las hojas trituradas, se colocaron en un matraz Erlenmeyer y se adicionaron 350 mL de metanol (CTR Scientific®), se selló herméticamente, se dejó en agitación constante durante cinco días en un agitador (Dual Action Shaker Lab Line®), para luego filtrar el macerado utilizando papel Whatman No.1 (Whatman International LTD® England) en embudo Buchner y bomba al vacío (Evar® Power Electric México). El solvente se evaporó a presión reducida en un rota evaporador (Rota vapor Büchi® R-205, Switzerland) a 30 rpm y 50° C, el extracto se llevó a sequedad completa.²⁵ Para la preparación del extracto acuoso se pesaron 5 g de material vegetal y se adicionaron 100 mL de agua desionizada estéril, se dejó 10 min a temperatura de 100° C, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. El extracto se almacenó a 4° C hasta su uso.²⁶

El rendimiento de extracción se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{PE}}{\text{PI}} \times 100$$

Donde:

PE = Peso obtenido después de la extracción

PI = Peso inicial del material vegetal a extraer

Identificación, tipificación y conservación de la cepa bacteriana

La identificación y tipificación de la cepa bacteriana se realizó conforme a perfiles bioquímicos y a las recomendaciones del Manual de Microbiología Clínica.¹³ Todos los aislamientos fueron mantenidos en el medio líquido C. Rivas.²⁷

Evaluación de la actividad bacteriana por el método de difusión en disco de papel en agar

Para el ensayo microbiológico se vaciaron 5 mL del medio de cultivo en tubos de ensayo de 13x100 mm, se esterilizaron a 120° C y 15 Lb/15 min, los tubos se inocularon con la cepa bacteriana y se incubaron durante 18-24 h a 37° C. El ensayo se realizó por el método de difusión en placa con discos de papel filtro^{17,28} para lo cual se utilizó el medio sólido de C. Rivas (Patente IMPI MX/10892). El medio se preparó de acuerdo a instrucciones del fabricante. Para el ensayo de inhibición bacteriana, se colocaron 40 µL del extracto metanólico de *L. frutescens* a tres concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/mL previamente esterilizados por filtración con membranas de 0.25 µm en filtro Milipore®, una vez esterilizados, cada concentración se impregnó en discos de papel filtro Whatman No.1 (Whatman® International LTD England) sobre una placa de agar sólido C. Rivas previamente inoculada con 100 µL de una suspensión bacteriana de 1x10⁶ UFC de *S. aureus* de aislado clínico (AC) y una cepa de referencia ajustadas con el Nefelómetro de Mc Farland.²⁹ Se realizó un tamizaje con los antibióticos cefotaxima, gentamicina, amikacina, penicilina y sulfametoxazol trimetropim para seleccionar el antibiótico más activo; se eligió cefotaxima. Como control negativo se utilizaron 40 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) y como testigo positivo 40 µL de Cefotaxima (Sigma Aldrich®, St Louis, MO, USA). Las placas se incubaron en estufa a 37° C por 24 h, los resultados de los halos de inhibición fueron expresados en mm.^{29,30}

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La CMI se realizó por el método de microdilución. El medio usado para las diluciones fue el caldo C. Rivas. En una microplaca de 96 pozos se depositaron 100 µL de medio de cultivo líquido C. Rivas, se le agregó 50 µL del extracto a las

concentraciones de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.6, 7.8 y 3.9 μ g/mL, enseguida se adicionaron 100 μ L de la suspensión bacteriana conteniendo el inóculo 1×10^6 UFC. Posteriormente la microplaca se incubó por 24 h a 37° C. Para cada ensayo se utilizó Cefotaxima como testigo a concentración de 500 μ g/mL. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para determinar la concentración mínima inhibitoria se adicionó 10 μ L de MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) a una concentración de 2.5 mg/mL a cada pozo, se incubaron por 8 h a 37° C, posteriormente se leyó la absorbancia en un lector de microplacas a 570 nm (Dynatech®MR5000).²⁵⁻³⁰

Ensayo de Letalidad con larvas de *Artemia salina*

En un recipiente de material acrílico oscuro con 300 mL de agua de mar artificial (Coralife Scientific Grand Marine Salt) se incubaron 0.1 g de huevecillos de *Artemia salina* (BrineShrimpEggs® San Francisco Bay Brand, Inc.) durante 48 h. Una vez eclosionados se tomaron 10 nauplios en un volumen de 100 μ L de agua de mar y se colocaron en una microplaca de 96 pozos, posteriormente se adicionaron 100 μ L de las concentraciones del extracto: 1,000, 500, 100 y 10 μ g/mL. Se utilizó como control positivo dicromato de potasio a una concentración de 400 ppm, y como control negativo agua de mar. Los nauplios de *A. salina* estuvieron expuestos a las soluciones de extracto durante 24 h bajo las mismas condiciones. Después de este tiempo se contaron los nauplios vivos y muertos por concentración; primeramente se contaron los nauplios muertos con ayuda de un estereoscopio (Iroscope® WB2, EUA), posteriormente se colocaron 50 μ L de etanol (CTR®, Scientific) para inmovilizar al resto de nauplios vivos en cada pozo. Se utilizó el método estadístico Probit para determinar la DL₅₀. El criterio de toxicidad fue el siguiente: valores de DL₅₀ > 1000 μ g/mL (no tóxico), $\geq 500 \leq 1000$ μ g/mL (toxicidad débil) y <500 μ g/mL (tóxico).³¹⁻³³

Evaluación de la citotoxicidad con MTT

Para evaluar la citotoxicidad del extracto se empleó la línea celular normal de mono verde africano (VERO). Las células se propagaron en el medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Cellgro, Herndon, Sigma®) suplementado con 2 mL de glutamina (Sigma®-Aldrich, St Louis, USA), gentamicina 50 mg (Sigma®-Aldrich, St Louis, USA) y 10 % de suero fetal bovino (SFB, SIGMA®). Se utilizaron cultivos confluentes de la línea celular, realizando la exclusión con azul de tripano (Sigma®-Aldrich, St Louis, USA) para comprobar su viabilidad. Se colocaron 3,000 células/pozo en un volumen de 100 μ L de medio DMEM en microplacas de 96 pozos (Corning Inc. Costar®), posteriormente se incubaron por 24 h a 37° C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. El extracto de *L. frutescens* se disolvió en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración final de 0,001 μ g/mL.

Posteriormente se prepararon diluciones del extracto en DMEM

a una concentración final de 3.12, 6.25, 12.0, 25.0, 50.0 y 100.0 μ g/mL, se adicionaron 100 μ L/pozo de cada dilución y el ensayo se realizó por cuadruplicado. El DMSO se utilizó como control negativo y se evaluó individualmente para citotoxicidad de forma similar a los extractos, las placas se incubaron durante 72 h en atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C. Luego de 72 h se adicionaron 20 μ L MTT (sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma®-Aldrich, St Louis, USA) al cabo de 4 h en atmósfera de 5% de CO₂ a 37° C se decantó el medio, se adicionaron 200 μ L/pozo de DMSO y se leyó la densidad óptica (DO) en un lector de microplacas de ELISA (Dynatech®MR5000) a 560 nm y 630 nm como referencia.^{34,35}

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE) de ensayos independientes con 3 réplicas. Las comparaciones de las medias del efecto de inhibición de la concentración del extracto sobre *S. aureus* se hicieron mediante la prueba *t de Student*, considerando como antibiótico de referencia la cefotaxima. Para los ensayos de inhibición del crecimiento se utilizó un modelo bivariado de regresión lineal para el extracto y bacteria en estudio, considerando la dosis inhibitoria. Se utilizó el paquete estadístico STATA versión 11.0 Stata Corporation, Texas, USA)³⁶ considerando la diferencia estadística significativa a una P < 0.05, mientras que para el ensayo de letalidad con *A. salina* la DL₅₀ se obtuvo con el estadístico Probit. Los valores de IC₅₀ (citotoxicidad) del extracto se determinaron a partir de las curvas de concentración-efecto (y = porcentaje de viabilidad, x = logaritmo) mediante el análisis de regresión lineal utilizando el paquete estadístico SPSS versión 15.

Resultados y discusión

La planta utilizada en este estudio fue seleccionada por su uso en medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades respiratorias. Los resultados obtenidos corroboran que el metanol puede considerarse buen solvente para la extracción de sustancias con actividad antimicrobiana de manera similar a otro estudio³⁷. El resultado del rendimiento de la extracción metanólica y acuosa de las hojas de *Leucophyllum frutescens* fue de 17.2% y 8.3% respectivamente. En esta investigación, la actividad antimicrobiana del extracto metanólico y acuoso de las hojas de *L. frutescens* fue evaluada contra cepas de *S. aureus* de aislado clínico y de referencia. El extracto metanólico mostró actividad antimicrobiana relevante a las concentraciones probadas a diferencia del acuoso que no mostró efecto antibacteriano. La inhibición de *S. aureus* (AC) por difusión en disco con el extracto metanólico fue de 12 mm a las concentraciones de 1000 y 500 μ g/mL y 10 mm a la

concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$. La cepa de referencia mostró inhibición de 15 mm a la concentración de 1000 y 500 $\mu\text{g/mL}$, en cambio a la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ no inhibió el crecimiento bacteriano. El solvente dimetil sulfóxido (DMSO) se utilizó como control negativo el cual no mostró inhibición del crecimiento bacteriano con el extracto probado, mientras que la cefotaxima que se usó como control positivo, mostró inhibición del crecimiento bacteriano con el extracto metanólico a las tres concentraciones de prueba en un rango de 15 mm (Tabla 1). De acuerdo al análisis estadístico, por cada microgramo del extracto aplicado se observó un efecto inhibitorio de 0.00114 mm (Tabla 2). Al comparar las medias del efecto de inhibición y la concentración aplicada sobre el cultivo bacteriano considerando como referencia el control positivo, empleando la prueba *t-Student* se observó una $P<0.01$ lo cual se considera altamente significativa.

Tabla 1. Actividad biológica del extracto metanólico de *L. frutescens* sobre *S. aureus* (ac)

Compuesto	Concentración $\mu\text{g/mL}$ / Halo de inhibición (mm)		
	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$
<i>L. frutescens</i>	10 mm	12 mm	12 mm
Cefotaxima	15 "	15 "	15 "
DMSO	0 "	0 "	0 "

AC: cepa de aislado clínico; DMSO: solvente dimetil sulfóxido (control negativo) cefotaxima (control positivo).

Tabla 2. Comparación de medias del efecto de inhibición de *S. aureus* (ac) y concentración del extracto de *L. frutescens* considerando como referencia el control positivo Cefotaxima (antibiótico)

Compuesto	Concentración $\mu\text{g/mL}$ / Halo de inhibición (mm)			
	250 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$	1000 $\mu\text{g/mL}$	$P<0.05$
<i>L. frutescens</i>	10 mm	12 mm	12 mm	<0.01
Cefotaxima	15 "	15 "	15 "	
DMSO	0 "	0 "	0 "	

AC: cepa de aislado clínico; DMSO: solvente dimetil sulfóxido (control negativo) cefotaxima (control positivo). p significativa (tres repeticiones)

Debido a que el extracto presentó actividad antimicrobiana con la técnica de difusión en disco, se evaluó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) sobre las cepas de *S. aureus* de aislado clínico y de referencia, resultando una buena actividad antimicrobiana (MIC) de 25.4 $\mu\text{g/mL}$ y 20.2 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Estos resultados concuerdan con reportes de otras especies vegetales, donde evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de *Calophyllum brasiliense* contra *S. aureus* resultando una MIC de 32 $\mu\text{g/mL}$,³⁴ además otro estudio con la especie *Piper regnelli*

con una MIC de 7.7 $\mu\text{g/mL}$.³⁸ En el reporte la especie *Cyperus alternifolius* fue activa con una MIC de 62.5 $\mu\text{g/mL}$.¹² En otros investigaciones donde evaluaron plantas del desierto mexicano, reportaron que el extracto metanólico de *Amphypteringium adstringens* inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.³⁹ De acuerdo a los resultados en los cuales se trabajó con cuatro plantas del norte de México, los extractos metanólicos de *Lysiloma acapulcensis*, *Miconia mexicana*, *Hibiscus sabdariffa* y *Loeselia mexicana* fueron activos contra *S. aureus* y *S. faecalis*.⁴⁰ Otros estudios demostraron la actividad antibacteriana de *L. frutescens* sobre *Mycobacterium tuberculosis* drogo-resistente¹³ y sobre hongos causantes de micosis pulmonares.²³

Debido a que uno de los objetivos del trabajo fue analizar el riesgo de toxicidad aguda del extracto de *L. frutescens*, se realizó la determinación de la dosis letal media (DL₅₀) con el ensayo de *Artemia salina* considerado como de selección o descarte de extractos tóxicos para sistemas biológicos.^{31,33} En este trabajo se encontró para el extracto una DL₅₀ de 196.37 $\mu\text{g/mL}$, moderadamente tóxico, según la escala reportada por Déciga y colaboradores.³²

Con base a los resultados obtenidos sobre la toxicidad, en este estudio se demostró la actividad citotóxica de las hojas de *L. frutescens* con la línea celular VERO, el extracto evaluado mostró una IC₅₀ de 58.0 $\mu\text{g/mL}$. Un extracto crudo que tiene una IC₅₀ con un valor superior de 30 $\mu\text{g/mL}$ puede ser considerado para fraccionarlo y aislar los compuestos con actividad.^{41,42}

Conclusiones

Los resultados de este estudio indican que el extracto metanólico de las hojas de *Leucophyllum frutescens* tiene actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, esto corrobora el uso de esta planta en medicina tradicional para el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas, sin embargo se requieren estudios adicionales para determinar los compuestos responsables del efecto antimicrobiano de esta planta. El té de cenizo se ha empleado para algunos trastornos respiratorios y digestivos sin efectos aparentemente tóxicos, nuestros resultados indican toxicidad moderada, aún así futuros estudios podrían ser útiles en la búsqueda de posibles compuestos anticáncer. Es importante el estudio de las especies nativas de las zonas áridas del Norte de México ya que son útiles en Medicina Tradicional para la atención primaria de la salud y son fuente potencial de nuevos antimicrobianos.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) México por la Beca No. 341796. Los autores agradecen el apoyo técnico de la Q.F.B. Angela Diluvina Hernández Mungaray.

Referencias

- Egwaikhide P, Okeniyi S, Gimba C. Screening for anti-microbial activity and phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *J Med Plants Res.* 2009; 3 (12): 1088-1091.
- Ortiz F, Morales I, Gil A, Reyna J, Benítez A, Aldrete J, Luna D. El reto de la Resistencia bacteriana en México: los beneficios de contra con una nueva alternativa de manejo antimicrobiano eficaz. *Med Int Mex.* 2009; 25(5): 361-71.
- Padrón B, Oranday A, Rivas C, Verde J. Identificación de Compuestos de *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomum zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos. *Ciencia UANL.* 2003; 6(3): 333-338.
- OMS. Quality control methods for medicinal plants. Geneva, World Health Organization. 2004.
- Kahkashan P, Najat AB, Soliman DAW. Antibacterial activity of *Phoenix dactylifera* L. leaf and pit extracts against selected Gram negative and Gram positive pathogenic bacteria. *J Med Plants Res.* 2012; 6(2): 296-300.
- Mehrotra S, Srivastava AK, Nandi SP. Comparative antimicrobial activities of Neem, Amla, Aloe, Assam Tea and Clove extracts against *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Plants Res.* 2010; 4(22): 2393-2398.
- Wadud A, Prasad P, Rao M, Narayama A. Evolution of drug: a historical perspective. *Bull Indian Inst Med Hyderabad.* 2007; 37(1): 69-80.
- Adame J, Adame H. Plantas curativas del Noreste Mexicano, México: Editorial Castillo. 2000.
- Céspedes C, Avila J, Martínez A, Serrato B, Calderón J, Salgado R. Antifungal and antibacterial activities of Mexican Tarragon (*Tagetes lucida*). *J Agric Food Chem.* 2006; 54 (10): 3521-3527.
- UNAM. 2009. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Consultada en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>, 30 de Agosto de 2012.
- Gordon D, Moreno S, López R. Compendio Fitoquímico de la Medicina Herbolaria de Sonora. Editorial Universidad de Sonora. 1996.
- Salazar-Aranda R, Pérez-López LA, López-Arroyo J, Alanís-Garza BA, Waksman de Torres N. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from Northeast México. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011: 536139.
- Molina GM, Pérez A, Becerril P, Salazar R, Said S, Waksman N. Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. *J Ethnopharmacol.* 2007; 109 (3): 435-41.
- Balderas-Rentería I, Camacho- Corona MR, Carranza-Rosales P, Lozano- Garza H, Castillo- Nava D, Alvarez-Mendoza FJ, Tamez- Cantú EM. Hepatoprotective effect of *Leucophyllum frutescens* on Wistar albino rats intoxicated with carbon tetrachloride. *Ann Hepatol.* 2007; 6(4): 251-254.
- Molina-Salinas GM, Rivas-Galindo VM, Said-Fernández S, Lankin DC, Muñoz MA, Joseph-Natan P, Pauli-Guido F, Waksman N. Stereochemical analysis of leubethanol, an anti-TB-active serrulatane, from *Leucophyllum frutescens*. *J Nat Prod.* 2011; 74(9):1842-1850.
- Alanís-Garza B, Salazar-Aranda R, Ramírez-Durón R, Garza-González E, Waksman de Torres N. A new antimycobacterial furanolignan from *Leucophyllum frutescens*. *Nat Prod Commun.* 2012; 7(5):597-598.
- Hernández J, García E, Giono S, Aparicio G. *Bacteriología Médica Diagnóstica.* México DF, Ediciones Cuéllar. 2003.
- Sher A. Antimicrobial Activity of Natural Products from Medicinal Plants. *J Med Sci.* 2009; 7(1): 72-78.
- Arencibia DF, Rosario LA, Curveo DL. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Rev Toxicol.* 2003; 40-52.
- Anoopkumar-Dukie S, Carey JB, Conere T, O'Sullivan E, Van Pelt FN, Allshire A. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *Br J Radiol.* 2005; 78 (34): 945-947.
- Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez-Barrio A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Tripanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res.* 2006; 99 (2): 103-107.
- Escobar L, Rivera A, Aristizábal FA. Estudio comparativo de los métodos de rezasurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. *Vitae* 2010; 17(1): 67-74.
- Alanís-Garza BA, González-González GM, Salazar-Aranda R, Waksman de Torres N, Rivas-Galindo VM. Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *J Ethnopharmacol* 2007; 114(3): 468-471.
- Parekh J, Karathia N, Chanda S. Screening of some traditionally used medicinal plants for potential antibacterial activity. *Indian J Pharm Sci.* 2006; 68(6): 832-834.
- Rodríguez R, Morales ME, Verde MJ, Oranday A, Rivas C, Núñez MA, González GM, Treviño J. Actividad antibacteriana y antifúngica de las especies de *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) (Cactaceae). *Rev Mex Cienc Farm.* 2010; 41 (1): 57-58.
- Romero CD, Fontenelle S, Buck G, Martínez E, García M, Bixby L. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. *J Ethnopharmacol.* 2005; 99: 253-257.
- Rivas C, Salinas C, Galán L, Medrano R. Operación unitaria para la propagación de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 para la producción de proteasas con potencial biotecnológico. Patente IMPI MX/10892. 2007.
- Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC, Woods GL. *Koneman Diagnóstico Microbiológico* Edición: 6^a Médica Panamericana. 2008.

29. Clinical and Laboratory Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement M100-S17. Wayne, USA. 2006.
30. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. XII Informational Supplement. M100-S12. Wayne, Pennsylvania. 2002.
31. Molina GM, Fernández SA. Modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). Pharmacologyonline 2006; 3: 633-638.
32. Déciga M, Rivero I, Arriaga M, Castañeda G, Angeles G, Navarrete A, Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2007; 110 (2): 334-342.
33. Bastos M, Lima M, Conserva L, Andrade V, Rocha E, Lemos R. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; 8:16.
34. Kakuko Y, Fumiko A, Ariaki N, Hikaru O, Lozada L, López E, Estrada E, Aguilar A, Reyes R. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones. *J Ethnopharmacol.* 2005; 97(2): 293-299.
35. Drummond AJ, Waigh RD. The development of microbiological methods for phytochemical screening. Recent research developments. *Phytochemistry* 2000; 4:143-152.
36. STATA. Version 11.0. Paquete estadístico (Stata Corporation, Computing Resource Center, College Station, Texas) <http://www.stata.com>.
37. Singh M, Gurgar I, Ali S, Akhtar M, Suraj K. Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences* 2012; 3(3): 425-433.
38. Barbieri-Holetz F, Pessini GL, Sanches-Neviton R, García-Cortez DA, Vataru C, Prado-Dias B. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine of the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97(7): 1027-1031.
39. Ruiz E, Velázquez C, Garibay A, García Z, Plascencia J, Cortez M, Hernández J, Robles R. Antibacterial and antifungal Activities of Some Mexican Medicinal Plants. *J Med Food.* 2009; 12(6): 1398-1402.
40. Navarro V, Rojas G, Zepeda G, Aviles M, Fuentes M, Herrera A, Jiménez E. Antifungal and Antibacterial Activity of Four Selected Mexican Medicinal Plants. *Pharm Biology.* 2006; 44(4): 297-300.
41. Kalaivani T, Rajasekaran C, Suthindhiran K, Lazar M. Free Radical Scavenging, Cytotoxic and Hemolytic Activities from Leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex. Delile subsp. *indica* (Benth.) Brenan. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011; 2011:274741.
42. Chetan A, Rajesh P, Sanjay D, Jitesh J. In vitro citotoxicity study of *Agave americana*, *Strychnos nuxvomica* and *Areca catechu* extracts using MCF-7 Cell line. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010; 1(12): 245-252.