

Trabajo científico

Estudio de mutagenicidad y actividad antibacteriana de *Erythrina herbacea*, *Zanthoxylum caribaeum* y *Dendropanax arboreus*

Mutagenicity study and antibacterial activity of *Erythrina herbacea*, *Zanthoxylum caribaeum* and *Dendropanax arboreus*

Cynthia Ordaz Pichardo,¹ Rocío Clemente Garcés,² Ma. Edith López Villafranco,³
Mireya de la Garza,⁴ Myriam Arriaga-Alba⁵

¹Laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales, Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía,
Instituto Politécnico Nacional

²Departamento de Biología Celular, Unidad Académica Multidisciplinaria Reynosa-Aztlán, Universidad
Autónoma de Tamaulipas

³Herbario Izta, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México

⁴Departamento de Biología Celular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN

⁵Laboratorio de Investigación en Microbiología, Hospital Juárez de México

Resumen

Este estudio presenta la caracterización fitoquímica y la evaluación antibacteriana y mutagénica de *Erythrina herbacea*, *Zanthoxylum caribaeum* y *Dendropanax arboreus*, que se utilizan en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de infecciones gastrointestinales y de la piel. Los extractos contienen aminos, fenoles y alcaloides principalmente al ser caracterizados por cromatografía en capa fina. El extracto acuoso de *D. arboreus* y los extractos hexánicos de *Z. caribaeum* y *E. herbacea* fueron los más activos presentando CMLs de < 0.78, 0.78 y 1.56 µg/mL, respectivamente. Ninguno de los extractos tiene propiedades mutagénicas al ser evaluados con la prueba de Ames. Estos resultados sugieren que los extractos de estas plantas tienen un buen potencial para ser usados como agentes antibacterianos.

Abstract

This study presents the phytochemical characterization and antibacterial and mutagenic evaluation of *Erythrina herbacea*, *Zanthoxylum caribaeum* and *Dendropanax arboreus*, used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal and skin infections. The extracts contained mainly amines, phenols and alkaloids when were characterized by thin layer chromatography. The aqueous extract of *D. arboreus* and the hexane extracts of *Z. caribaeum* and *E. herbacea* were the most active presenting MICs of < 0.78, 0.78 and 1.56 µg/mL respectively. None of the extracts has mutagenic properties when were evaluated by Ames test. These results suggest that the extracts of these plants have good potential for be used as antibacterial agents.

Palabras clave: Plantas medicinales, actividad antibacteriana, actividad mutagénica, *Erythrina herbacea*, *Zanthoxylum caribaeum*, *Dendropanax arboreus*.

Key words: Medicinal plants, antibacterial activity, mutagenic activity, *Erythrina herbacea*, *Zanthoxylum caribaeum*, *Dendropanax arboreus*.

Correspondencia:

Dra. Cynthia Ordaz Pichardo
Laboratorio de Biología Celular y Productos Naturales
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía
Instituto Politécnico Nacional
Guillermo Massieu Helguera No. 239 Fracc. La Escalera
Col. Ticomán, C.P. 07320, México. D.F.
Tel: 5729 6000 ext 55535 Fax: 5729 6000 ext 55561
e-mail: dra_cynthia@hotmail.com

Fecha de recepción: 24 de enero de 2014

Fecha de recepción de modificaciones: 11 de abril de 2014

Fecha de aceptación: 21 de mayo de 2014

Introducción

Las comunidades rurales en los países en vías de desarrollo emplean con frecuencia plantas medicinales como tratamiento alternativo para procurar su salud, debido a que los servicios médicos son inaccesibles para la mayoría de la población, ya sea por las largas distancias o los elevados costos.¹ Las plantas medicinales se utilizan con frecuencia en forma de cataplasmas o infusiones sin tener ningún conocimiento de sus propiedades químicas, genotóxicas, terapéuticas o sus dosis requeridas.

México ocupa el cuarto lugar en el mundo en diversidad de plantas y se ha informado que de las 26 000 especies de plantas que se encuentran en todo el mundo, 9 500 son endémicas de México. Se cree que el 15% de estas plantas (1 425 especies) tienen propiedades terapéuticas, sin embargo, sólo se han realizado estudios genotóxicos, farmacológicos y químicos a aproximadamente el 5 % del total de éstas. En el Estado de Tamaulipas, en el noreste de México, las plantas han sido utilizadas tradicionalmente por sus propiedades nutritivas y terapéuticas.²

Por otro lado la resistencia bacteriana a los antibióticos de mayor uso, se ha convertido en una grave consecuencia del mal uso de estos fármacos. De hecho, se ha reportado resistencia bacteriana a compuestos beta- lactámicos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos y otros compuestos.³ Además, muchos de estos antibióticos tienen efectos adversos o pueden ser genotóxicos para el ser humano. Por lo tanto, es necesario evaluar y descubrir nuevos antibióticos que sean más eficientes y seguros y que sean potencialmente más baratos para los pacientes. Es este aspecto, las plantas medicinales pueden ofrecer nuevos compuestos con propiedades antibióticas que deben ser evaluadas.

El objetivo de este trabajo fue realizar la caracterización fitoquímica y la evaluación antibacteriana y genotóxica de los extractos de las plantas, *Erythrina herbacea* L. (Leguminosae), *Zanthoxylum caribaeum* Lam. (Ulmaceae) y *Dendropanax arboreus* (L) Dacae y Planch. (Araliaceae), utilizadas tradicionalmente por los nativos del Estado de Tamaulipas en México para tratar infecciones gastrointestinales y de la piel. Este trabajo establece si estos extractos de plantas son una buena alternativa a la terapia antibiótica tradicional. El conocimiento científico de las propiedades antibacterianas de los extractos acuosos de estas plantas dará validación y confianza a las comunidades rurales para utilizar estos extractos. Además, los tres nuevos extractos podrían ser estudiados en futuros tratamientos clínicos.

Material y métodos

Colección e identificación del material vegetal

Las raíces de *E. herbacea* y las cortezas y tallos de *Z. caribaeum* y *D. arboreus* fueron colectadas en 2010 en la comunidad rural

de Gómez Farías, en el centro del Estado de Tamaulipas. Estas plantas se encuentran a 350 m de altitud y crecen a temperaturas que oscilan entre los 7 °C en invierno y 25 a 35 °C en verano.⁴ Después de su colección, las plantas se secaron a 40 °C y se identificaron por la M. en C. María Edith López Villafranco en el "Herbario Izta" ubicado en el campus Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en donde se asignaron los siguientes números de registro: *E. herbacea* (No. 1650), *Z. caribaeum* (No. 1651) y *D. arboreus* (No. 1652).

Preparación de los extractos

25 gramos de material vegetal seco y libre de polvo, se suspendieron en 250 mL de agua destilada, acetona (Golden Bell 30200) o hexano (Golden Bell 31220). Los extractos acuosos se filtraron y se liofilizaron (Ultra dryer EVO40FXDW) por 96-120 h a -1 °C. Los extractos con acetona y hexano se filtraron y se secaron completamente en un rotavapor (Büchi R200/205). Alícuotas de 1 mg de extracto de las plantas se almacenaron a -20 °C hasta su uso.⁵

Caracterización de los extractos por cromatografía de capa fina (ccf) y espectrometría de masas por impacto electrónico (EM-IE)

Alícuotas de 250 µL de una solución de 1 mg de extracto/mL se colocaron cuidadosamente en placas de gel de sílice (Merck 105554) y se eluyeron con una mezcla de hexano-acetato de etilo (80:20 v/v).

Las placas se revelaron con reactivo de Dragendorff-Munier: mezcla de cloruro férrico (Sigma F134) y ferrocianuro de potasio (Sigma P3289); 2,4 dinitrofenilhidrazina (Sigma D19,930-3); vainillina (Sigma V2375); yodo (Sigma 207 772) y luz ultravioleta para detectar alcaloides, aminas, fenoles, esteroides, aldehídos, grupos cetona, aminoácidos, ácidos grasos y grupos cromóforos, respectivamente.^{6,7}

Los espectros de masas por impacto electrónico fueron obtenidos en un equipo Jeol AX-505 HA mass spectrometer a 70 eV.

Cultivo de bacterias y reactivos

Cepas empleadas en la prueba de actividad antibacteriana de los extractos vegetales

Las cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) y *Escherichia coli* (ATCC25922) fueron cultivadas en caldo Müeller-Hinton (M-H) (Becton Dickinson, Cockeysville, MD) en un baño de agua con agitación a 37 °C durante 24 h. Los controles positivos utilizados para la inhibición del crecimiento fueron clindamicina (Cli) (Sigma C5269) para *S. aureus* y trimetoprima-sulfametoxazol (T-S) (Bactelan, Wyeth SA de CV, México) para *E. coli*.

Cepas empleadas para la prueba de actividad mutagénica

Se prepararon cultivos en fase estacionaria de las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 y TA102 en caldo nutritivo (Oxoid-No. 2) en un baño de agua con agitación a 37 °C durante 16 h. Estas cepas fueron amablemente proporcionadas por el doctor B.N. Ames de la Universidad de California (Berkeley, CA).

Reactivos

La ampicilina (Amp) (A9393), tetraciclina (Tet) (T3258), D-biotina (B4501), sal dipotásica de D-glucosa 6-fosfato (G6P) (G7375), sal sódica de β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP) (N0505), ácido picrolónico (AP) (P5628), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) (129941), mitomicina C (MC) (69824-1EA), 2-amino-antraceno (2AA) (A38800) y la ciclofosfamida (CP) (C0768) fueron adquiridas en Sigma Chemical Co. (St Louis, MO., EUA). El dimetil sulfóxido (DMSO) (D7941) y la L-histidina (H6034) fueron adquiridas en E. Merck (Darmstad, Alemania). Mientras que la fracción hepática S9 se preparó como se ha descrito por Maron y Ames en 1983,⁸ induciendo con Aroclor-1254 (Analab Inc., Reino Unido).

Ensayo de actividad antibacteriana

Las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* ATCC25922 se cultivaron en caldo M-H en un baño de agua con agitación a 37 °C durante 24 h hasta alcanzar una turbidez de 5 en la escala de McFarland. Posteriormente, las cepas se inocularon en placas de agar M-H usando un hisopo estéril y se colocaron cilindros estériles sobre el agar, que fueron cargados con los extractos a las concentraciones de 25, 50 o 100 µg/cilindro. Se utilizó un control positivo apropiado para la inhibición del crecimiento (Cli o T-S) a 10 µg/mL y como control negativo, se emplearon 100 µL de disolvente (agua destilada, acetona o hexano). Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 a 24 h y posteriormente se midieron los halos de inhibición. Los halos de 7 mm o superiores se consideraron como zonas de sensibilidad bacteriana (S) y las zonas inferiores se consideraron como zonas de resistencia (R).^{9, 10}

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se realizó en placas de 96 pozos, agregando 100 µL de las cepas bacterianas preparadas como se ha descrito anteriormente y añadiendo alícuotas de los extractos hasta llegar a las concentraciones entre 0.78 y 250 µg/mL. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 a 24 h y la densidad óptica (DO) se midió a 630 nm en un espectrofotómetro (ELx808, Bio-Tek).

Ensayo de actividad mutagénica

Alícuotas de 100 µL de las cepas de *S. typhimurium* TA98, TA100 ó TA102 fueron expuestas a concentraciones entre 1 y 200 µg de extracto/placa o a un control positivo adecuado para cada cepa: MC (2 ng/placa), 2AA (10 µg /placa), AP (50 µg/placa),

MNNG (10 µg /placa) o CP (500 µg /placa) y como control negativo se utilizó el disolvente (DMSO). Los ensayos se realizaron en presencia y ausencia del activador metabólico S9, mezclando el contenido del tubo con ayuda de un vortex y colocándolo en placas de Vogel-Bonner que se incubaron durante 48 h a 37 °C. Las colonias revertantes de histidina (His⁺) se contaron con un contador de colonias Fisher.⁸

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado en tres estudios independientes y los resultados se analizaron en los programas Microsoft Excel y Statgraphics Plus versión 4.0.

Resultados y discusión

Caracterización fitoquímica por ccf

En la Tabla 1 se resumen los compuestos químicos que se encontraron en los tres extractos de las plantas estudiadas. El extracto *hexánico* de *E. herbacea* presentó la mezcla más compleja de compuestos, que consiste en ácidos grasos, aminos, fenoles, esteroides y alcaloides. En comparación, los extractos acuoso y acetónico mostraron una menor cantidad de compuestos.

Tabla 1. Compuestos presentes en los extractos de las especies estudiadas

	Revelador	Tipo de compuesto	<i>Erythrina herbacea</i>	<i>Zanthoxylum caribaeum</i>	<i>Dendropanax arboreus</i>
Agua	Reactivo de Dragendorff	Alcaloides	++	+	+
Acetona			+	+	+
Hexano			+++	++	++
Agua	FeCl ₃ + KCN	Aminas, fenoles y esteroides	+	+	+
Acetona			+	+	+
Hexano			+++++	++	+++
Agua	2,4-dinitrofenilhidrazina	Aldehídos y cetona	+	+	+
Acetona			-	-	-
Hexano			++	-	+
Agua	Vainillina	Aminoácidos	+	+	+
Acetona			-	-	-
Hexano			-	-	-
Agua	I ₂	Ácidos grasos	+	+	+
Acetona			++	+++	++
Hexano			+++++	+++++	++
Agua	U.V.	Cromóforos	+	+	+
Acetona			+	+	+
Hexano			+	+	+

- = compuesto no presente en la muestra; + = presente en baja cantidad; +++++ = presente en altas concentraciones.

En los extractos de *Z. caribaeum* se identificaron las mismas familias de compuestos que se encontraron en los extractos de *E. herbacea* pero en menor cantidad, mientras que *D. arboreus* tiene la menor complejidad de compuestos químicos. Algunos metabolitos primarios, tales como ácidos grasos y aminoácidos

se presentaron en todos los extractos debido a que son componentes esenciales de las plantas. Es importante mencionar que la polaridad de los disolventes tuvo una influencia significativa en la separación de estos compuestos.

Propiedades antibacterianas de los extractos

Los tres extractos (agua, acetona y hexano) de las tres especies evaluadas muestran actividad contra *S. aureus* a la concentración de 25 µg/cilindro; resultados similares se observaron para los extractos con acetona y hexano en contra de *E. coli*, mientras que los extractos acuosos de *E. herbacea* y *D. arboreus* fueron activos contra esta misma especie a las concentraciones de 25 y 100 µg/cilindro, respectivamente (Tabla 2). Los valores de CMI para todos los extractos se presentan en la Tabla 3. Todos los extractos mostraron actividad inhibitoria contra *S. aureus* a concentraciones menores de 3.12 µg/mL, excepto el extracto acuoso de *E. herbacea*. Mientras que los mejores resultados contra la especie *E. coli* se mostraron en los tres extractos de *E. herbacea* con CMIs inferiores a 3.12 µg/mL y en el extracto hexánico de *D. arboreus* CMI < 0.78 µg/mL.

Estudio de mutagenicidad (Prueba de Ames)

La prueba de Ames en *S. typhimurium* demostró que ninguno de los extractos evaluados induce mutaciones por corrimiento en el marco de lectura (cepa TA98), mutaciones por sustitución en los pares de bases (cepa TA100) o mutaciones por daño oxidativo (cepa TA102). En la Tabla 4 se muestran los resultados de la prueba de Ames para estos extractos con propiedades antibacterianas, donde se puede corroborar que el número de colonias revertantes de histidina provocadas por los diferentes extractos tiene valores similares al número de colonias revertantes espontáneas en presencia y ausencia de fracción metabólica S9. Para que los extractos sean considerados como mutagénicos es necesario encontrar un incremento dos veces mayor al número de revertantes espontáneas.⁸

Diferentes especies del género *Erythrina* se distribuyen en todo el mundo en las regiones tropicales y subtropicales, estas especies son conocidas por ser ricas en flavonoides y alcaloides. Previamente se han reportado seis alcaloides (erisodina, erisovina, eritralina, erisopina y el hexósido de la erisopina) presentes en las semillas de *E. herbacea*.¹¹ Mientras que en otros estudios realizados sobre las flores de esta misma especie se encontraron seis alcaloides (10-hidroxi-11-oxoerisotrina, eritribina, 10,11-dioxierisotrina, eritratina, erisotramidina y erisotrina-N-óxido) con capacidad atrapadora de radicales libres de peroxinitrito *in vitro*.¹² Y en el estudio más reciente que se ha reportado se encontraron dos nuevos alcaloides (eribacina A y eribacina B) con potente actividad antibacteriana contra diversas cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina.¹³ A partir de otras especies del género *Erythrina* se han aislado 50 flavonoides prenilados,¹⁴ que han demostrado tener diferentes efectos terapéuticos, principalmente como antihipertensivos, relajantes musculares y antibacterianos.¹⁵⁻¹⁷

Por ejemplo, las isoflavonas preniladas aisladas de la corteza de la raíz de *Erythrina eriotricha* y la corteza del tallo de *Erythrina vogelli* mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus* 209P.^{18, 15} Mientras que los alcaloides también han mostrado propiedades curativas, incluyendo actividades antibacterianas y anti-inflamatorias.¹⁹ En este trabajo se encontró una elevada cantidad de alcaloides de manera similar a lo reportado en trabajos anteriores para las flores, semillas y raíces de *E. herbacea* y otras especies del género *Erythrina* como *Erythrina crista-galli* y *Erythrina variegata*.²⁰ Además de los alcaloides detectados en *E. herbacea*, encontramos aminas 4,4-bis (dietilamino) benzofenona oxima o-metil éter y la Tris(1,3,2-ditiaborolen-2-il amina), el alcaloide canadina y el fenol 6-terbutil-o-cresol, algunos de estos compuestos han sido reportados previamente.²⁰ La caracterización química de estos compuestos fue determinada por comparación de los espectros en la librería Wiley275. Aunque algunos flavonoides y alcaloides ya han sido identificados, nuevos compuestos se pueden aislar en esta planta; en este momento estamos trabajando en el aislamiento e identificación de algunos de ellos por resonancia magnética nuclear (¹H-NMR).

Respecto a la especie *Zanthoxylum caribaeum* no se han reportado antecedentes, sin embargo, a partir de la corteza del tallo de *Zanthoxylum myriacantum* se han aislado el 8,9-dimetoxi-2,3-metilen-dioxibenzofenantridieno (N-nortidina) y el 7-9-dimetoxi-2,3-metilen-dioxibenzofenantridina.²¹ De las hojas de *Zanthoxylum budrunga* se han aislado los alcaloides 2-(2',4',6'-trimetil-heptenil)-4-quinoxolona y la lunacridina.²² De la corteza del tallo de *Zanthoxylum buesgenii* se identificaron los alcaloides buesgenina, decarina, sesamina, matairesinol dimetileter y metilpluviatilol²³ y a partir de *Zanthoxylum madagascariense* se aislaron la dihidroqueleritrina, noritidina, norqueleritrina y la decarina.²⁴ En el presente estudio, los compuestos mayoritarios aislados de *Z. caribaeum* fueron el alcaloide triptamina y el aldehído 4-formil-biciclo (3.3.2) deca 2,7,9-trien-2-carboxaldehído, ambos se determinaron por EM-IE. Estos compuestos no habían sido identificados en las otras especies del género *Zanthoxylum*.

D. arboreus no ha sido objeto de muchos estudios, de las hojas se han aislado algunos derivados de acetileno como dedidrofalcarinol, faltarindiol, dehidrofalcarindiol y dos nuevos poliacetilenos (dendroarboreoles).²⁵ En el presente estudio, los compuestos identificados fueron principalmente aminas, fenoles, esteroides y alcaloides, es importante continuar con los estudios de las diferentes especies de este mismo género, ya que hasta la fecha existen pocas descripciones de ellos en la literatura. Es importante señalar que aunque las comunidades rurales utilizan infusiones medicinales, puede ser necesario extraer los principios activos con disolventes específicos para lograr mejores efectos. En esta investigación, los extractos hexánicos produjeron una mayor variedad de compuestos químicos, que en consecuencia tienen mayor potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos a base de plantas medicinales.

Tabla 2. Actividad antibacteriana de los extractos de las tres especies estudiadas (Halos de inhibición en mm)

Disolvente	Especie	<i>S. aureus</i> ATCC 29213					<i>E. coli</i> ATCC 25922				
		25 µg /cilindro	50 µg /cilindro	100 µg /cilindro	100 µl disolvente	10 µg /cilindro Cli ^a	25 µg /cilindro	50 µg /cilindro	100 µg /cilindro	100 µl disolvente	10 µg /cilindro T-S ^b
Agua	<i>Erythrina herbacea</i>	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	0.0 ± 0.0 R	21.6 ± 1.2 S	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	0.0 ± 0.0 R	20.6 ± 0.7 S
	<i>Zanthoxylum caribaeum</i>	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	0.0 ± 0.0 R	21.2 ± 1.0 S	0.0 ± 0.0 R	0.0 ± 0.0 R	0.0 ± 0.0 R	0.0 ± 0.0 R	20.8 ± 1.1 S
	<i>Dendropanax arboreus</i>	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	0.0 ± 0.0 R	21.2 ± 1.0 S	0.0 ± 0.0 R	0.0 ± 0.0 R	7.0 ± 0.0 S	0.0 ± 0.0 R	21.1 ± 0.7 S
Acetona	<i>Erythrina herbacea</i>	11.6 ± 0.5 S	14.3 ± 1.8 S	25.4 ± 2.9^c S	0.0 ± 0.0 R	24.4 ± 1.1^c S	11.4 ± 0.5 S	12.5 ± 2.0 S	21.8 ± 2.2 S	0.0 ± 0.0 R	26.3 ± 1.0 S
	<i>Zanthoxylum caribaeum</i>	11.7 ± 0.4 S	15.2 ± 0.8 S	26.4 ± 2.9^c S	0.0 ± 0.0 R	23.5 ± 1.0^c S	11.3 ± 0.5 S	13.0 ± 1.2 S	22.1 ± 2.5^c S	0.0 ± 0.0 R	20.7 ± 0.9^c S
	<i>Dendropanax arboreus</i>	11.8 ± 2.8 S	15.6 ± 0.7 S	26.2 ± 2.3^c S	0.0 ± 0.0 R	23.4 ± 1.5^c S	11.4 ± 0.5 S	13.1 ± 1.5 S	20.8 ± 1.0^c S	0.0 ± 0.0 R	20.8 ± 0.9^c S
Hexano	<i>Erythrina herbacea</i>	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	0.0 ± 0.0 R	18.7 ± 0.8 S	7.0 ± 0.0 S	9.0 ± 1.5 S	10.5 ± 2.6 S	0.0 ± 0.0 R	26.3 ± 1.0 S
	<i>Zanthoxylum caribaeum</i>	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	0.0 ± 0.0 R	18.3 ± 0.7 S	0.0 ± 0.0 R	9.0 ± 1.5 S	10.5 ± 2.6 S	0.0 ± 0.0 R	26.5 ± 1.1 S
	<i>Dendropanax arboreus</i>	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	7.0 ± 0.0 S	0.0 ± 0.0 R	18.4 ± 0.5 S	7.0 ± 0.0 S	9.0 ± 1.5 S	10.5 ± 2.6 S	0.0 ± 0.0 R	27.0 ± 1.1 S

S = Sensible (halo igual o superior a 7 mm), R = Resistente (halo inferior a 7 mm) ^aClindamicina, ^bTrimetoprima-Sulfametoxazol, ^c Los halos de inhibición superiores a los controles positivos se remarcen en negritas.

Tabla 3. Concentración mínima inhibitoria de los extractos de las tres especies estudiadas (µg/mL)

Disolvente	Especie	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E. coli</i> ATCC 25922
Agua	<i>Erythrina herbacea</i>	25	1.56
	<i>Zanthoxylum caribaeum</i>	1.56	> 100
	<i>Dendropanax arboreus</i>	< 0.78	100
Acetona	<i>Erythrina herbacea</i>	3.12	3.12
	<i>Zanthoxylum caribaeum</i>	1.56	25
	<i>Dendropanax arboreus</i>	3.12	12.5
Hexano	<i>Erythrina herbacea</i>	1.56	< 0.78
	<i>Zanthoxylum caribaeum</i>	0.78	50
	<i>Dendropanax arboreus</i>	1.56	< 0.78

Los tres extractos acetónicos exhibieron el mayor efecto antibacteriano frente a *S. aureus* y *E. coli* por el método de difusión con disco en agar. Los valores de CMI de los extractos acuoso, acetónico y hexánico de la raíz de *E. herbacea* fueron de 25, 3.12 y 1.56 µg/mL, respectivamente contra la especie *S. aureus*; mientras que para la especie *E. coli* fueron de 1.56, 3.12 and <0.78 µg/mL, respectivamente. Estos resultados son similares a los resultados de las evaluaciones de otras especies de *Erythrina*.^{26,27} Sin embargo, los disolventes de esos estudios fueron generalmente polares (agua, etanol y acetona) y los métodos y concentraciones utilizadas varían entre las diferentes investigaciones. Por ejemplo, el extracto etanólico de la corteza del tallo de *Erythrina senegalensis* ha sido evaluado sobre *S. aureus* y *Enterobacter faecalis*, mostrando CMIs de 12 y 23 µg/mL, respectivamente.²⁶ Por el contrario, el mismo tipo de extractos obtenidos de *Erythrina mulungu* no inhibió el crecimiento de *S. aureus* o *E. coli*, incluso a 100 µg/mL.

Pero mostraron un efecto antibacteriano muy interesante contra cepas de *S. aureus* manipuladas genéticamente resistentes a macrólidos y fluoroquinolonas y cepas con daño en las bombas de flujo electrónico.²⁷ Algunos investigadores han evaluado la actividad antibacteriana de extractos de otras especies del género *Erythrina* contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas a dosis de 1000 µg/mL, observando actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas exclusivamente.^{19,17} Nuestros resultados indican que la especie *E. herbacea* tiene una mayor actividad antibacteriana contra bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Respecto al género *Zanthoxylum*, la corteza del tallo y los tallos de las plantas se han estudiado usando disolventes no polares para la preparación de extractos principalmente. En este estudio, los extractos acuoso, acetónico y hexánico de corteza del tallo de *Z. caribaeum* mostraron buena actividad antibacteriana con valores de CMI de 1.56, 1.56 y 0.78 µg/mL

frente a *S. aureus*, respectivamente y >100, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. coli*, respectivamente. Esto sugiere que la especie *Z. caribaeum* es un inhibidor más potente contra las bacterias Gram-positivas. En estudios realizados sobre otras especies del mismo género se ha encontrado que el extracto con diclorometano de *Zanthoxylum tetraspermum* contiene diversos alcaloides con actividad antibacteriana contra *S. aureus* a concentraciones entre 1.56 y 3.12 $\mu\text{g/mL}$, sin tener efecto inhibidor contra *E. coli*.²⁸ Los extractos acuoso, metanólico y acetónico de *Zanthoxylum chalybeum* y *Zanthoxylum usambarense* mostraron actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* y *S. aureus* a 100 $\mu\text{g/mL}$, pero no contra cepas Gram-negativas de *Klebsiella pneumoniae* o *E. coli*.²⁹ Esta información refuerza la hipótesis de que los metabolitos contenidos en *Z. caribaeum* son antibacterianos sólo contra las bacterias Gram-positivas. En contraste, los extractos con metanol, cloroformo y hexano de *Zanthoxylum rhoifolium* y *Z. budrunga* son antibacterianos contra cepas Gram-positivas y Gram-negativas a concentraciones entre 12.5 y 200 $\mu\text{g/mL}$.³⁰ A partir de esta información, podemos concluir que incluso cuando las plantas pertenecen al mismo género, los metabolitos secundarios y la actividad biológica pueden ser

significativamente diferentes, dejando abierta la posibilidad de desarrollar investigación sobre una amplia variedad de plantas medicinales.

No existen muchos estudios que reporten la actividad biológica de *D. arboreus*; en un trabajo reciente se reportó que el extracto acuoso y hexánico de las hojas tienen actividad contra *S. aureus* y *S. epidermidis* con CMI de 5 mg/mL.³¹ Y en otro trabajo se encontró que el extracto etanólico de las hojas tiene actividad citotóxica contra las líneas celulares tumorales Hep-G2, A-431, H-4IIE y L-1210.³² Mientras que en otros estudios se han evaluado sus propiedades citotóxicas utilizando líneas celulares cancerosas de riñón, pulmón y ovario encontrando que el falcarinol es el responsable de la actividad citotóxica y anticancerígena en un modelo xenográfico inducido con células de melanoma humano.²⁵ En este estudio, los extractos acuoso, acetónico y hexánico de *D. arboreus* mostraron buena actividad antibacteriana con valores de CMI de <0.78, 3.12 y 1.56 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus* respectivamente y 100, 12.5 y <0.78 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. coli*, respectivamente. Esto sugiere que la especie *D. arboreus* tiene potencial antibacteriano contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

Tabla 4. Evaluación de la actividad mutagénica de los tres extractos vegetales en *S. typhimurium* con la prueba de Ames. Los resultados se expresan como número de colonias revertantes Histidina⁺ (Promedio \pm desviación estándar)

Extracto	Activador metabólico	$\mu\text{g/placa}$	Histidina + (Promedio \pm DS)		
			TA98	TA100	TA102
<i>E. herbacea</i>	S9 (-)	50	26.6 \pm 2.9	183 \pm 9.8	346 \pm 45.8
		25	26.5 \pm 1.9	169 \pm 11.0	324 \pm 24.2
		12.5	24.3 \pm 3.3	155 \pm 8.2	311 \pm 28.8
<i>Z. caribaeum</i>	S9 (-)	50	26.4 \pm 1.4	189 \pm 7.6	334 \pm 43.6
		25	25.8 \pm 1.6	186 \pm 5.58	294 \pm 21.4
		12.5	24.5 \pm 3.4	183 \pm 11.8	285 \pm 27.6
<i>D. arboreus</i>	S9 (-)	50	25.4 \pm 1.1	204 \pm 12.4	322 \pm 21.5
		25	23.8 \pm 1.8	175 \pm 12.5	313 \pm 25.4
		12.5	22.0 \pm 0.9	167 \pm 14.2	271 \pm 18.1
AP		50	428.2 \pm 30.9	-	-
MNNG		5	-	13248 \pm 1036	-
MC		0.025	-	-	4386 \pm 248
DMSO		10	30.0 \pm 2.0	187 \pm 18	372 \pm 19
<i>E. herbacea</i>	S9 (+)	50	37.4 \pm 3.0	204 \pm 16.6	337 \pm 57.7
		25	23.1 \pm 6.1	195 \pm 15.9	336 \pm 50.1
		12.5	21.8 \pm 5.5	184 \pm 17.1	308 \pm 49.0
<i>Z. caribaeum</i>	S9 (+)	50	31.6 \pm 2.4	194 \pm 11.4	452 \pm 47.5
		25	30.5 \pm 1.7	164 \pm 6.7	362 \pm 35.9
		12.5	30.4 \pm 2.2	159 \pm 4.2	361 \pm 37.0
<i>D. arboreus</i>	S9 (+)	50	27.0 \pm 1.5	200 \pm 9.2	356 \pm 39.4
		25	25.7 \pm 1.2	199 \pm 8.1	350 \pm 23.4
		12.5	23.5 \pm 1.7	194 \pm 9.3	320 \pm 28.0
2AA		10	4910 \pm 187	-	2055 \pm 3 47
CF		500	-	564.8 \pm 20.8	-
DMSO		10	33.8 \pm 2.9	168 \pm 10.1	348.6 \pm 37

Cada resultado es el promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. La activación metabólica se realizó con fracción S9 hepática de rata inducida con Aroclor 1254. Controles: Ácido Picrolónico (AP); N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG); Mitomicina C (MC); Ciclofosfamida (CF); Dimetil sulfóxido (DMSO).

Revertantes espontáneas: TA98 = 30.0 \pm 2.0, TA100 = 187.0 \pm 18.0 y TA102 = 372.0 \pm 19.0

La evaluación de la actividad mutagénica de plantas utilizadas con fines medicinales debe ser un procedimiento de rutina para eliminar el riesgo de exposición a compuestos mutagénicos presentes en los productos naturales. Generalmente las plantas medicinales carecen de efectos tóxicos, pero existen algunas investigaciones que describen la inducción de mutaciones por corrimiento en el marco de lectura, como el caso de *Gnapalium spp.* y *Valeriana procera*.³³

Sin embargo, es mayor la cantidad de plantas que tienen propiedades anti-mutagénicas y anti-cancerígenas, debido a la presencia de antioxidantes.³⁴ Ninguna de las tres plantas evaluadas en este trabajo induce mutaciones al ser evaluadas con la prueba de Ames en *S. typhimurium*. Estos resultados son similares al único estudio que se ha reportado en la literatura, donde los autores encontraron que los extractos acuoso y etanólico de las hojas y corteza de tallo de *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & Zucc no tienen propiedades mutagénicas, en presencia y ausencia de la fracción S9, al ser evaluadas en las cepas de *S. typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102 y TA1535.³⁵ Nuestro estudio contribuye a incrementar la lista de extractos de plantas medicinales que no son mutagénicos y por lo tanto tienen baja probabilidad de ser cancerígenos. Por lo tanto, estos extractos pueden ser utilizados con mayor confianza para propósitos medicinales.

Conclusiones

Los extractos acuosos, acetónicos y hexánicos obtenidos de *E. herbacea*, *Z. caribaeum* y *D. arboreus* son antibacterianos y no mutagénicos. Estas propiedades los convierten en buenos candidatos para nuevos estudios sobre su uso como antibióticos contra bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Nosotros pensamos que debe ampliarse la investigación sobre sus propiedades anti-mutagénicas y estos extractos podrían ser evaluados por su posible potencial como anti-cancerígenos.

Agradecimientos

Gracias al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT, Gobierno del Estado de Tamaulipas, por el financiamiento otorgado al proyecto: TAMPS-2005-C08-13. Al Dr. Jorge Cornejo Garrido por su apoyo en la interpretación de los resultados de espectrometría de masas.

Referencias

1. Gutiérrez D., Betancourt A. El mercado de las plantas medicinales en México: Situación actual y perspectivas de desarrollo. 1a Ed. Tlaxcala, Tlax. México: Universidad Autónoma de Tlaxcala; 2002, p. 1-8.
2. Hernández L., González C., González F. Anales del Instituto de Biología. México D.F. México: Universidad Autónoma de México; 1991, p. 1-38.
3. Rice L.B. The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol.* 2009; 12(5): 476-481.
4. INEGI. Marco Geoestadístico Municipal. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2005; Acceso 20 Oct 2013.
5. Waybright T.J., Terlizzi D.E., Ferrier M.D. Chemical characterization of the aqueous alginate fraction of barley straw (*Hordeum vulgare*) inhibiting *Microcystis aeruginosa*. *J Appl Phycol.* 2009; 21(3): 333-340.
6. Sherma J. Planar chromatography. *Anal Chem.* 2004; 76(12): 3251-3261.
7. Reich E., Schibli A. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. New York, NY: Thieme Medical Publishers, Inc.; 2006, p. 1-280.
8. Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res.* 1983; 113(3-4): 173-215.
9. McGaw L.J., Jager A.K., van Staden J. Antibacterial, anthelmintic and anti-amoebic activity in South African medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2000; 72(1-2): 247-263.
10. Bruin J.P., Diederer B.M., Ijzerman E.P., Den Boer J.W., Mouton J.W. Correlation of MIC value and disk inhibition zone diameters in clinical *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2013; 76(3): 339-342.
11. Garin-Aguilar M.E., del Toro G.V., Soto-Hernandez M., Kite G. High-performance liquid chromatography-mass spectrometric analysis of alkaloids extracted from seeds of *Erythrina herbacea*. *Phytochemical Analysis.* 2005; 16(5): 302-306.
12. Tanaka H., Hattori H., Tanaka T., Sakai E., Tanaka N., Kulkarni A., Etoh H. A new *Erythrina* alkaloid from *Erythrina herbacea*. *Journal of Natural Medicines.* 2008; 62(2): 228-231.
13. Tanaka H., Sudo M., Kawamura T., Sato M., Yamaguchi R., Fukai T., Sakai E., Tanaka N. Antibacterial Constituents from the Roots of *Erythrina herbacea* against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Planta Medica.* 2010; 76(9): 916-919.

14. El-Masry S., Amer M.E., Abdel-Kader M.S., Zaatout H.H. Prenylated flavonoids of *Erythrina lysistemon* grown in Egypt. *Phytochemistry*. 2002; 60(8): 783-787.
15. Queiroz E.F., Atindehou K.K., Terreaux C., Antus S., Hostettmann K. Prenylated isoflavonoids from the root bark of *Erythrina vogelii*. *J Nat Prod*. 2002; 65(3): 403-406.
16. Yenesew A., Induli M., Derese S., Midiwo J.O., Heydenreich M., Peter M.G., Akala H., Wangui J., Liyala P., Waters N.C. Anti-plasmodial flavonoids from the stem bark of *Erythrina abyssinica*. *Phytochemistry*. 2004; 65(22): 3029-3032.
17. Yenesew A., Derese S., Midiwo J.O., Bii C.C., Heydenreich M., Peter M.G. Antimicrobial flavonoids from the stem bark of *Erythrina burtii*. *Fitoterapia*. 2005; 76(5): 469-472.
18. Nkengfack A.E., Vardamides J.C., Fomum Z.T., Meyer M. Prenylated isoflavanone from *Erythrina eriotricha*. *Phytochemistry*. 1995; 40(6): 1803-1808.
19. Pillay C.C., Jager A.K., Mulholland D.A., van Staden J. Cyclooxygenase inhibiting and anti-bacterial activities of South African *Erythrina* species. *J Ethnopharmacol*. 2001; 74(3): 231-237.
20. Chawla A.S., Jackson A.H. *Erythrina* and related alkaloids. *Nat Prod Rep*. 1990; 7(6): 565-575.
21. Sukari M.A., Salim W.S.W., Ibrahim N.H., Rahmani M., Aimi N., Kitajima M. Phenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum myriacanthum*. *Fitoterapia*. 1999; 70(2): 197-199.
22. Ahmad M.U., Rahman M.A., Huq E., Chowdhury R. Alkaloids of *Zanthoxylum budrunga*. *Fitoterapia*. 2003; 74(1-2): 191-193.
23. Tane P., Wabo H.K., Connolly J.D. A new benzophenanthridine alkaloid from *Zanthoxylum buesgenii*. *Fitoterapia*. 2005; 76(7-8): 656-660.
24. Martin M.T., Rasoanaivo L.H., Raharisololalao A. Phenanthridine alkaloids from *Zanthoxylum madagascariense*. *Fitoterapia*. 2005; 76(6): 590-593.
25. Bernart M.W., Cardellina J.H., 2nd, Balaschak M.S., Alexander M.R., Shoemaker R.H., Boyd M.R. Cytotoxic falcarinol oxylipins from *Dendropanax arboreus*. *J Nat Prod*. 1996; 59(8): 748-753.
26. Koné W.M., Atindehou K.K., Terreaux C., Hostettmann K., Traore D., Dosso M. Traditional medicine in north Cote-d'Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*. 2004; 93(1): 43-49.
27. de Lima M.R.F., de Souza Luna J., dos Santos A.F., de Andrade M.C.C., Sant'Ana A.E.G., Genet J.-P., Marquez B., Neuville L., Moreau N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2006; 105(1,2): 137-147.
28. Nissanka A.P., Karunaratne V., Bandara B.M., Kumar V., Nakanishi T., Nishi M., Inada A., Tillekeratne L.M., Wijesundara D.S., Gunatilaka A.A. Antimicrobial alkaloids from *Zanthoxylum tetraspermum* and *caudatum*. *Phytochemistry*. 2001; 56(8): 857-861.
29. Matu E.N., van Staden J. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *J Ethnopharmacol*. 2003; 87(1): 35-41.
30. de A Gonzaga W., Weber A.i.D., Giacomelli S.R., Dalcol I.I., Hoelzel S.C.S., Morel A.F. Antibacterial Alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. *Planta Med*. 2003; 69(04): 371-374.
31. Cruz-Galvez A.M., Gomez-Aldapa C.A., Villagomez-Ibarra J.R., Chavarria-Hernandez N., Rodriguez-Banos J., Rangel-Vargas E., Castro-Rosas J. Antibacterial effect against foodborne bacteria of plants used in traditional medicine in central Mexico: Studies in vitro and in raw beef. *Food Control*. 2013; 32(1): 289-295.
32. Setzer W.N., Green T.J., Whitaker K.W., Moriarity D.M., Yancey C.A., Lawton R.O., Bates R.B. A cytotoxic diacetylene from *Dendropanax arboreus*. *Planta Medica*. 1995; 61(5): 470-471.
33. Déciga-Campos M., Rivero-Cruz I., Arriaga-Alba M., Castañeda-Corral G., Ángeles-López G.E., Navarrete A., Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol*. 2007; 110(2): 334-342.
34. Cariño-Cortés R., Hernández-Ceruelos A., Torres-Valencia J.M., González-Avila M., Arriaga-Alba M., Madrigal-Bujaidar E. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the Ames test. *Toxicol In Vitro*. 2007; 21(4): 691-697.
35. Chung Y.C., Chien C.T., Teng K.Y., Chou S.T. Antioxidative and mutagenic properties of *Zanthoxylum ailanthoides* Sieb & Zucc. *Food Chem*. 2006; 97(3): 418-425.