

Laura Lisset
Bata García

Efecto de la actividad antimicrobiana de los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller)
sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*

2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO

FACULTAD DE MEDICINA

**Efecto de la actividad antimicrobiana de los extractos de
flor de colorín (*Erythrina americana* Miller) sobre cepas
de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*,
Streptococcus mutans y *Staphylococcus aureus*.**

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE

**MAESTRA EN INVESTIGACIÓN MÉDICA CON LÍNEA
TERMINAL EN BIOMEDICINA**

PRESENTA

I.B.Q. LAURA LISSET BATA GARCÍA

CENTRO UNIVERSITARIO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO.

DICIEMBRE DE 2014



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Medicina

Maestría en Investigación Médica
Línea Terminal en Biomedicina

Efecto de la actividad antimicrobiana de los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller) sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Maestra en Investigación Médica con Línea Terminal en Biomedicina

Presenta:

I.B.Q. Laura Lisset Bata García

Dirigido por:

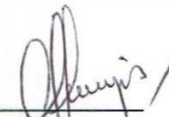
Dra. en C. Ana Angélica Feregrino Pérez

Co-dirección:

Dr. en C. Andrés Cruz Hernández

SINODALES

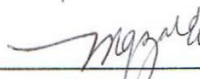
Dra. en C. Ana Angélica Feregrino Pérez
Presidente


Firma

Dr. en C. Andrés Cruz Hernández
Secretario


Firma

Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea
Vocal


Firma


Dr. en C. Carlos Francisco Sosa Ferreira
Suplente


Firma

M. en C. María Leticia Ávila Ramirez
Suplente


Firma

Dr. Javier Ávila Morales
Director de la Facultad de Medicina


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

RESUMEN

Una de las principales fuentes de agentes antimicrobianos son los metabolitos secundarios de las plantas entre ellos destacan los compuestos fenólicos que actúan como agentes protectores frente a la acción de patógenos y que por su estructura química son captadores de radicales libres y posee cierta actividad frente a los microorganismos. El objetivo fue determinar el efecto de los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller) sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus* y *Listeria monocytogenes*. Para esto se obtuvieron por maceración extractos metanólico de pétalo (EMP), pistilo (EMPi) y cáliz (EMC) y extracto acuoso de pétalo (EAP) de los cuales se evaluó actividad antimicrobiana, se cuantificaron fenoles totales, flavonoides totales, taninos condensados y la actividad antioxidante. El efecto antimicrobiano fue relativamente bajo, sin embargo todos los extractos presentaron mejor efecto sobre bacterias Gram positivas (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus* y *Listeria monocytogenes* en comparación a las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*) lo cual puede ser atribuido a las diferencias estructurales entre ambas. El mayor contenido de compuestos fenólicos se obtuvo en los extractos metanólico de las partes externas de la flor (pétalo y cáliz) y a su vez fueron los que presentaron mayor actividad antioxidante, 83.71 ± 1.25 , 76.67 ± 1.345 % inhibición de ABTS⁺ y 67.08 ± 0.05 , 61.28 ± 0.67 % reducción del radical DPPH (pétalo y cáliz respectivamente). La concentración de compuestos fenólicos indica que estos compuestos posiblemente contribuyen a la fuerte actividad antioxidante con lo que se sugiere que la flor de colorín puede ser empleada o aprovechada en otros sectores como el farmacéutico y no solo en el sector alimentario.

Palabras clave: ABTS, Antimicrobiano, Antioxidante, Compuestos fenólicos, DPPH, *Erythrina americana* Miller.

SUMMARY

One of the main sources of antimicrobial agents are secondary metabolites of plants among them are phenolic compounds which act as protective agents against the action of pathogens and its chemical structure are free radical scavengers and has some activity against microorganisms. The objective was to determine the effect of extracts of colorin flower (*Erythrina americana* Miller) on strains of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus* and *Listeria monocytogenes*. Methanolic extracts from petal (EMP), pistil (EMPi) and calyx (EMC) and petal aqueous extract (EAP) obtained by maceration, were used to quantify total phenols, total flavonoids, condensed tannins and evaluate the antioxidant and antimicrobial activity. The antimicrobial effect was relatively low, however all extracts showed better effect on Gram positive microorganisms (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus* and *Listeria monocytogenes*) compared to Gram negative microorganism (*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*) which can be attributed to the structural differences between them. The highest content of phenolic compounds was obtained in methanolic extracts of petals and calyx and these tissues shown the highest antioxidant activity. 83.71 ± 1.25 , 76.67 ± 1.345 %ABTS⁺ inhibition and 67.08 ± 0.05 , 61.28 ± 0.67 %DPPH radical reduction (petal and calyx respectively). The concentration of phenolic compounds indicate that these compounds may contribute to the strong antioxidant activity which suggests can be used or exploited in other sectors such as pharmaceuticals and not only in the food sector.

Keywords: ABTS, Antimicrobial, Antioxidant, DPPH, *Erythrina americana* Miller, Phenolic compounds.

DEDICATORIAS

A ti Dios:

Por iluminar mi vida, por no abandonarme nunca, por escuchar cada una de mis oraciones, por darme fuerza, valor y coraje.

A ti mamá:

El ser más maravilloso, gracias por tu apoyo incondicional, por luchar conmigo en todo momento, porque a pesar de la distancia te siento cerca de mí. Gracias por todas tus palabras exactas de amor y confianza cuando sentía que no podía, por recordarme tantas veces que Dios adiestró mis manos para grandes batallas y mis dedos para grandes guerras. Te amo por el resto de mis días.

A mi hermano Alan, a mi tía Pati que fueron testigos de la lucha, de los sacrificios, y siempre tuvieron confianza en mí, gracias por su apoyo y por su amor.

AGRADECIMIENTOS

Al H. Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la oportunidad y apoyo económico que me proporcionaron para realizar este trabajo de investigación.

A mi directora de tesis, Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez, ha sido un placer trabajar con usted, le agradezco todo su apoyo, confianza, gracias por los conocimientos transmitidos, aprendí muchísimo de usted, pero sobre todo por ser una amiga con la que se puedo contar toda la vida.

Al Dr. Andrés Cruz Hernández, al Dr. Francisco Quintanilla, a mis sinodales por todas las excelentes aportaciones que enriquecieron este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
SUMMARY	4
ÍNDICE DE CUADROS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. ANTECEDENTES	14
2.1 Panorama epidemiológico de enfermedades bacterianas	14
2.1.1 <i>Escherichia coli</i>	15
2.1.2 <i>Salmonella typhimurium</i>	16
2.1.3 <i>Streptococcus mutans</i>	17
2.1.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.2 Agente antimicrobiano	19
2.3 Resistencia microbiana	20
2.4 Agentes antimicrobianos de origen vegetal	22
2.4.1 Modo de acción de los agentes antimicrobianos de origen vegetal	26
2.5 Flores con actividad antimicrobiana	27
2.6 <i>Erythrina americana</i> Miller	28
2.6.1 Usos <i>Erythrina americana</i> Miller	30
2.6.2 Actividad biológica en el género <i>Erythrina</i>	31
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo General	34
3.2 Objetivos Particulares	34
4. HIPÓTESIS	35

4.1 Hipótesis Nula.....	35
4.2 Hipótesis Alterna.....	35
5. METODOLOGÍA	36
5.1 Recolección del material biológico	36
5.2 Preparación de material biológico	36
5.3 Obtención de extracto metanólico y acuoso	36
5.4 Determinación de actividad antimicrobiana	37
5.4.1 Preparación de los medios de cultivo	37
5.4.2 Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba	38
5.4.3 Determinación de la cuenta viable inicial	38
5.4.4 Determinación de las células sobrevivientes.....	39
5.4.5 Determinación % de inhibición del crecimiento bacteriano	39
5.5 Cuantificación de compuestos fenólicos.....	40
5.5.1 Cuantificación de fenoles totales.....	40
5.5.2 Cuantificación de taninos condensados	40
5.5.3 Cuantificación de flavonoides totales	41
5.6 Determinación de actividad antioxidante	41
5.6.1 DPPH	42
5.6.2 ABTS ⁺	43
5.7 Análisis estadístico	44
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
6.1 Determinación de actividad antimicrobiana en extractos de flor de colorín (<i>Erythrina americana</i> Miller).....	45
6.2 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de flor de colorín <i>Erythrina americana</i> Miller	55

6.3 Determinación de actividad antioxidante en extractos de flor de colorín (<i>Erythrina americana</i> Miller).....	58
7. CONCLUSIONES	61
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
9. ANEXOS	72

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1. Actividad antioxidante en extracto metanólico de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller). 60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1. Interacción entre el antimicrobiano-germen-huésped.	19
2. Estructura química del fenol.	22
3. Distribución mundial de <i>Erythrina</i> .	29
4. Flor de colorín <i>Erythrina americana</i> Miller.	30
5. % inhibición de <i>Escherichia coli</i> por efecto de los extractos de flor de colorín (<i>Erythrina americana</i> Miller).	48
6. % inhibición de <i>Salmonella typhimurium</i> por efecto de los extractos de flor de colorín (<i>Erythrina americana</i> Miller).	49
7. % inhibición de <i>Streptococcus mutans</i> por efecto de los extractos de flor de colorín (<i>Erythrina americana</i> Miller).	50
8. % inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> por efecto de los extractos de flor de colorín (<i>Erythrina americana</i> Miller).	51
9. % inhibición de <i>Streptococcus pneumoniae</i> por efecto de los extractos de flor de colorín (<i>Erythrina americana</i> Miller).	52
10. % inhibición de <i>Micrococcus luteus</i> por efecto de los extractos de flor de colorín (<i>Erythrina americana</i> Miller).	53
11. % inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> por efecto de los extractos de flor de colorín (<i>Erythrina americana</i> Miller).	54
12. Contenido de compuestos fenólicos en extractos de flor de colorín (<i>Erythrina americana</i> Miller).	55
13. Cromatograma de compuestos presentes en extracto de flor de colorín (<i>Erythrina americana</i> Miller).	56

1. INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de los antimicrobianos aunado a la presión selectiva ambiental realizada por antisépticos y desinfectantes ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos, que los capacita para evadir con eficiencia la acción bactericida de algunos agentes, perdiendo el efecto antimicrobiano que se espera por una concentración tolerada por el huésped para dañar a un microorganismo infectante (bacteria, hongo, parásito, etc.) considerando las diferencias existentes entre la estructura y metabolismo del microorganismo y las características del huésped. El uso de plantas medicinales (medicina tradicional) constituyen un reservorio de metabolitos secundarios biológicamente activos que con el nacimiento de la fitoquímica se hizo posible su reconocimiento y aislamiento de estos principios activos así como su efecto sobre el organismo, su modo de aplicación y sus propiedades biológicas como antioxidantes, antimutagénicas, antimicrobianas, antiinflamatorias, antihipertensivas, entre otras generando una alternativa en el control de diversas enfermedades causadas por bacterias (Cos *et al.* 2008; Gibbons, 2008). La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en plantas, hierbas y especias, son compuestos fenólicos, terpenos, quininas, alcaloides, e isoflavonoides, que a su vez por sus características químicas y estructurales pueden ejercer actividad antioxidante. Estos compuestos actúan principalmente sobre la membrana de los microorganismos invasores y en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de compuestos estructurales. Una vez que el compuesto fenólico cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y con las proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así la actividad celular. Son una potencial alternativa a los problemas derivados de los mecanismos de resistencia adquiridos y transmisibles.

El gran desafío para los países ricos en biodiversidad como México es poder vincular y convertir el conocimiento proveniente de los recursos biológicos, sean

sustancias puras o extractos crudos de plantas en compuestos, procesos, métodos, herramientas o productos útiles como parte del aprovechamiento y la explotación sostenible de la diversidad biológica en beneficio de la salud como en el control de diversas enfermedades microbianas de importancia médica, causantes de las principales enfermedades de atención primaria.

Como una posible alternativa se encuentra el género *Erythrina* del cual se han podido aislar diversos flavonoides, alcaloides, lecitinas y pterocarpanos, que muestran efectos antimicrobianos, antiinflamatorios, sedativos, diuréticos, anticonvulsivos, etc. (Mitscher *et al.*, 1988; Garín *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2002; Pino *et al.*, 2004; Chacha *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2006; Rukachaisirikul *et al.*, 2007; Khaomek *et al.*, 2008; Ibarra *et al.*, 2009). *Erythrina americana* Miller es una de las especies vegetales endémicas con usos medicinales y alimentarios. A partir de flores de *Erythrina americana* Miller se realizan extractos metanólico y acuoso para evaluar la actividad antimicrobiana, determinar fenoles totales, taninos condensados y flavonoides totales y evaluar la actividad antioxidante.

2. ANTECEDENTES

2.1 Panorama epidemiológico de enfermedades bacterianas

Las enfermedades infecciosas son la manifestación clínica consecuente a una infección provocada por un microorganismo como bacterias, hongos, virus, y a veces, protozoos (Krauss *et al.*, 2003).

Las enfermedades infecciosas son una de las causas más importantes de morbimortalidad mundial entre los lactantes y niños y una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte en México. Se ha estimado que en Asia, África y Latinoamérica la probabilidad de que un niño muera antes de los 5 años puede llegar a 50%, aunque esto depende de factores socioeconómicos y nutricionales (Vila, 2009). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año tienen lugar 1,500 millones episodios en países en vías de desarrollo, resultando de éstos en 1,5 millones de muertes (WHO, 2009). Por ello, se les considera un problema de salud pública en el nivel mundial, que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los grupos más vulnerables son los niños y los ancianos (León-Ramírez, 2002).

En México, la mortalidad infantil se ha reducido como resultado de diversas acciones e intervenciones en salud pública (Sepúlveda *et al.*, 2007), entre ellas: la distribución de suero oral (a partir de 1984), las campañas de vacunación (a partir de 1986), el Programa Agua Limpia (a partir de 1991), y el incremento de las coberturas de agua potable, alcantarillado y saneamiento, que reducen la exposición a los agentes patógenos. A estos factores se añaden los de higiene, educación, acceso a los servicios de salud y condiciones socioeconómicas y ambientales.

Paniagua (2007) hace referencia que en 2003 se reportaron 4 556 decesos causados por infecciones. Tan solo en 2008, el Seguro Social brindó 2 millones

188 consultas por enfermedades infecciosas, y los estados con mayor incidencia de estas infecciones fueron: Chihuahua, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Guerrero, y Oaxaca. De acuerdo con la Secretaría de Salud, las enfermedades infecciosas en 2010 fueron de 5, 681,091 casos; aplicando la proyección de CONAPO para 2011, se obtuvo una tasa de 5,037 casos por cada 100 mil habitantes. Las principales causas de estas enfermedades en el último año fueron: virus y otros organismos (4.9 millones de casos), paratifoidea y salmonelosis (120.6 mil casos), la fiebre tifoidea (45 mil casos) e infección por *Escherichia Coli* y *Shigella* con 40.9 mil y 11.3 mil casos, respectivamente (CONAGUA, 2011).

Basados en las estadísticas del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), las infecciones, como gastroenteritis causada principalmente por *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Rotavirus*, representan un severo problema de salud pública para nuestro país.

2.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, móvil por flagelos peritricos, no forma esporas, es el principal anaerobio facultativo de la flora microbiana que reside en el colon humano. El huésped se coloniza desde el nacimiento con una o dos cepas que residen de manera permanente en el intestino y establecen una relación simbiótica con el individuo durante toda la vida (Winfield *et al.*, 2003; Kaper *et al.*, 2004).

Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. La infección por *Escherichia coli* se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda (WHO, 2014).

Escherichia coli puede causar infecciones intestinales y extra intestinales generalmente graves, tales como infecciones del aparato excretor, vías

urinarias, cistitis, meningitis, peritonitis, mastitis, septicemia y neumonía (Kaper *et al.*, 2004). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC, por sus siglas en inglés) fue la primera en describirse y es tal vez uno de los microorganismos más estudiados. La infección con EPEC es una de las causas más comunes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, como México (Kaper *et al.*, 2004). Una de las principales características de la infección es la diarrea de tipo acuoso, que puede ocurrir en diversos grados de intensidad. Además, es común que los niños infectados presenten vómito y fiebre. El periodo de incubación varía de 3 a 24 horas después de que el individuo ingiere en condiciones experimentales un inóculo grande de bacterias (10^9 a 10^{10} UFC); se cree que el inóculo que infecta de manera natural a los niños es mucho menor (Cravioto, *et al.*, 1988; Kaper *et al.*, 2004). Una vez que la bacteria alcanza la mucosa intestinal, comienza a desencadenarse un mecanismo de patogenicidad complejo, que tiene como resultado la producción de diarrea (Donnenberg *et al.*, 1999; Kaper *et al.*, 2004).

De manera alarmante, las cifras de letalidad en países subdesarrollados son elevadas (20 a 50%), lo que convierte a la infección por *Escherichia coli* en una anomalía clínica de inmediata respuesta.

2.1.2 *Salmonella typhimurium*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, no formadores de esporas, anaerobios facultativos, provistos de flagelos y móviles. Crecen bien en los medios de cultivo habituales. De acuerdo con la presencia de los antígenos O (lipopolisacárido), Vi (polisacáridocapsular) y H (flagelar) pueden actualmente serotiparse en más de 2.300 serovariedades (Miller *et al.*, 2002; López *et al.*, 2006).

La fiebre tifoidea es una enfermedad febril aguda de origen entérico producida por la *Salmonella typhi*. En raras ocasiones *Salmonella paratyphi* A, *paratyphi* B (*Salmonella schottmuelleri*) y *Salmonella paratyphica* C (*Salmonella hirschfeldii*)

pueden producir un cuadro clínico similar, aunque de menor gravedad. Estas salmonellas sólo afectan al ser humano. La mortalidad con un tratamiento adecuado es casi nula y las complicaciones más graves suelen ser la perforación y la hemorragia intestinal (Ryan *et al.*, 1989). Al ser los seres humanos los únicos huéspedes de este tipo de salmonellas, la fuente de nuevas infecciones son los enfermos, los enfermos convalecientes (durante tres meses aproximadamente) y los portadores sanos crónicos (2% de las personas que han pasado la enfermedad, más frecuente en mujeres con colelitiasis). La vía de transmisión es la fecal-oral, a través de aguas contaminadas no higienizadas, alimentos manipulados por portadores, ingestión de crustáceos contaminados o vegetales regados con aguas contaminadas (Celum *et al.*, 1989).

2.1.3 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans es una bacteria Gram positiva, anaerobia cuyos principales hábitats son boca, faringe e intestino (Loesche, 1986). Tienen un papel central en la etiología de la caries dental (Desoet *et al.*, 1990; Marsh, 2003), debido a que estos pueden adherirse a la película salival esmalte y a otras bacterias de la placa (Aas *et al.*, 2005). Por lo general, la aparición de *Streptococcus mutans* en las cavidades de los dientes es seguido por caries después de 6-24 meses (Mayooran, 2000).

Streptococcus mutans presenta un nivel muy elevado de aciduria y acidogenicidad en comparación con el resto de microorganismos de la placa; es capaz de formar polisacáridos extracelulares no solo en presencia de sacarosa, sino también a partir de la fructosa y la glucosa (Wiater, 1999; Zero, 2004), esto les confiere además gran virulencia, ya que aglutinan a las bacterias de la placa, promueven la colonización en la superficie dental y cambian las propiedades de difusión de la matriz de la placa (Tanzer *et al.*, 2001).

2.1.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo, no móvil, no forma esporas, puede encontrarse solo, en pares, en cadenas cortas o en racimos, anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. Es uno de los principales microorganismos reconocidos como agentes patógenos para el humano. Forma parte de la familia *Micrococaceae*, género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies (Howe *et al.*, 1996; Velázquez-Meza, 2005; Kanafani *et al.*, 2006).

Staphylococcus aureus es una de las bacterias que con más frecuencia causa infecciones en todas las edades. En niños, la tasa de infección por este patógeno es aproximadamente de 30 casos por cada 100.000 habitantes (Paganini, 2007).

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* comienzan por la llamada colonización. La bacteria se encuentra generalmente en las fosas nasales y en ocasiones en la piel o en la ropa, y de estos sitios *Staphylococcus aureus* puede transmitirse a otras regiones del cuerpo o membranas mucosas. Si la piel o mucosas se rompen por trauma o cirugía, *Staphylococcus aureus* que es un patógeno oportunista, puede acceder al tejido cercano a la herida provocando daño local o enfermedades de amplio espectro (Velázquez-Meza, 2005), por ejemplo causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas, provoca mielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y es la principal causa de infecciones nosocomiales. Coloniza la piel y/o fosas nasales de las personas sanas y produce una amplia gama de infecciones, desde las más leves como las infecciones superficiales de piel y tejidos blandos. Además, causa septicemia, impétigo y fiebres (Shopsin *et al.*, 2001; Velázquez-Meza, 2005; Foster, 2006).

Antes del uso de los antibióticos, una bacteremia causada por *Staphylococcus aureus* producía una mortalidad aproximada del 82%. Aún ahora este porcentaje permanece elevado, entre el 25 y 63% (Howe *et al.*, 1996). En años recientes han

re emergido las infecciones por *Staphylococcus aureus*. Esto debido a que la bacteria se ha vuelto resistente a los agentes antimicrobianos con los que normalmente se le combate (Chambers, 2001).

2.2 Agente antimicrobiano

Un antimicrobiano es una sustancia que a bajas concentraciones tiene la capacidad de inhibir o matar microorganismos (bacterias, hongos, parásitos, etc.) (Ruiloba y Ortigoza-Ferado, 2005).

Un efecto antimicrobiano es aquel que se espera por una concentración tolerada por el huésped pudiendo dañar a un microorganismo infectante considerando las diferencias entre la estructura y metabolismo del microorganismo y las características del huésped (Zabala, 2002) (Fig. 1).

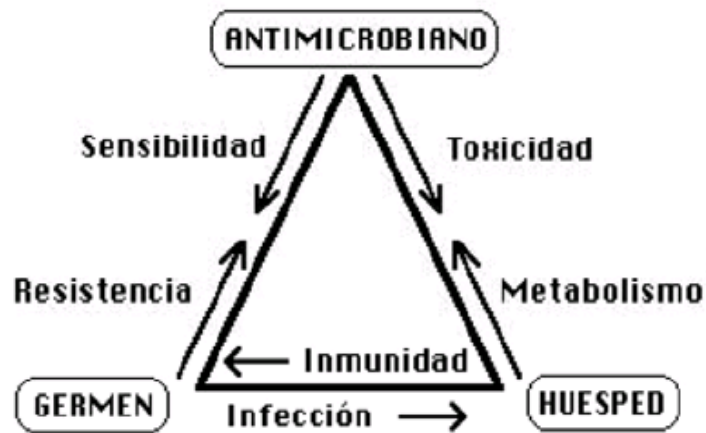


Figura 1. Interacción entre el antimicrobiano-germen-huésped (Zabala, 2002).

El uso indiscriminado de estos agentes antimicrobianos ha creado uno de los grandes retos que enfrenta la comunidad médica, la resistencia microbiana (Avellaneda, 2000).

2.3 Resistencia microbiana

Resistencia bacteriana se define como “una condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico” (Torroba, 1999).

La resistencia microbiana obliga el desarrollo y utilización de nuevos antimicrobianos, que son más costosos y a veces más tóxicos que los empleados habitualmente. (Avellaneda, 2000).

Cuando se lanza al mercado un fármaco antibacteriano, se define el espectro de microorganismos sobre los cuales es eficaz, pero luego este patrón va cambiando a medida que la droga se utiliza clínicamente, llegando en algunos casos a caer en el desuso (Torroba, 1999).

Según lo descrito por Arévalo (1996) las bacterias pueden manifestar resistencia a los fármacos antibacterianos a través de una variedad de mecanismos como:

- a. Producción de una sustancia que destruye el antimicrobiano.
- b. Adaptación del metabolismo bacteriano para inhibir el antimicrobiano.
- c. La pared celular del microorganismo se vuelve impermeable al antimicrobiano.
- d. Un fago comunica la resistencia por transducción
- e. Desaparición de cepas sensible y supervivencia de cepas resistentes por un fenómeno de selección natural.
- f. Producción de cepas mutantes

Avellaneda (2000) describe diferentes mecanismos bioquímicos de resistencia:

1.- Inactivación enzimática: enzimas que modifican la molécula de antibiótico. Codificadas por elementos genéticos extracromosómicos. Ejemplo: Las β -lactamasas son capaces de romper los enlaces químicos de los β -lactámicos

generando resistencia contra esta familia de antibióticos. La asociación de β -lactámicos (amoxicilina, ampicilina o piperacilina) con inhibidores de la β -lactamasa (ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam) sirvió para acabar con este mecanismo de resistencia a antibióticos.

Otras enzimas producidas por ciertas cepas son capaces de modificar químicamente a los antibióticos impidiendo que éstos reconozcan su diana. Es el caso del ciprofloxacino, muy útil en infecciones de vía urinaria.

2.- Impermeabilidad de las membranas o de la pared celular: modificación de los elementos de la membrana (Ejemplo: porinas) que impide el transporte de antibióticos. La pérdida de porinas es una forma de resistencia a los carbapenems.

3.- Expulsión por mecanismos activos. Ejemplo: El aumento de la concentración de bombas de extrusión de antibióticos, unas proteínas transmembrana que permiten la exportación de antibióticos como quinolonas o cloranfenicol fuera de la célula con gasto energético.

4.- Desvíos alternativos: Hay antibióticos que actúan sobre enzimas de la célula inactivándolas, como por ejemplo la sulfamida que inhibe la dihidropteroato sintasa que participa en la síntesis del ácido fólico un compuesto esencial para la división bacteriana. Algunas enzimas son capaces de mutar o bien otras son capaces de ganar la actividad perdida por acción del antibiótico provocando un desvío de la ruta que permite a la célula sobrevivir.

5.- Modificación del sitio de acción (diana molecular). Reducción de la afinidad por el antibiótico. Ejemplo: Mutaciones en la diana hacen que el antibiótico no sea capaz de reconocerla. Las dianas de las quinolonas son las enzimas encargadas de mantener el correcto plegamiento de la molécula de DNA (la girasa y la topoisomerasa). Mutaciones a este nivel otorgan a la célula resistencia frente a esta familia de antibióticos. Mutaciones de los ribosomas. Los ribosomas son las

dianas de ciertas familias de antibióticos entre las que se encuentran las tetraciclinas por lo que mutaciones a este nivel harán a las células resistentes frente a ellas. Mutaciones en la estructura del lipopolisacárido (LPS) otorgarán a la célula resistencia frente a antibióticos como la polimixina.

Hay un número de razones por las cuales la resistencia bacteriana debe ser una preocupación para el sector salud. Las bacterias resistentes, especialmente los Estafilococos, Enterococos, *Klebsiella* y *Pseudomonas*, se están convirtiendo en algo común en las instituciones de salud (National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, 2004).

Algunas especies de bacterias son naturalmente resistentes a una clase de agentes antimicrobianos. En tales casos, todas las cepas de especies de bacterias que son así mismo resistentes a todos los miembros de estas clases antibacterianas. De mayor preocupación son los casos de resistencia adquirida, donde poblaciones inicialmente sensibles de bacterias se vuelven resistentes a un agente antibacteriano y proliferar y diseminar bajo la presión selectiva del uso de dicho agente (McGowan, 2001).

El Centro de Control de Enfermedades (CDC) en Estados Unidos calcula que las complicaciones asociadas con la resistencia bacteriana suman anualmente entre 4000 y 5000 millones de dólares a los costos de cuidados de la salud (CDC, 2013).

La búsqueda en fuentes vegetales se establece como una alternativa viable al problema de resistencia bacteriana.

2.4 Agentes antimicrobianos de origen vegetal

Una planta medicinal es considerada como un complejo laboratorio de síntesis y degradaciones en el que generalmente coexisten componentes con diversas

estructuras químicas, la mayoría compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides que derivan todas ellas del fenol un anillo aromático (Fig. 2) con un grupo hidroxilo (Avalos y Pérez, 2009) y su efecto en muchas ocasiones se debe a varios de estos componentes. Un porcentaje importante posee cierta actividad frente a los microorganismos.

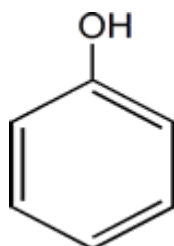


Figura 2. Estructura química del fenol

Entre los compuestos que han sido reportados por aportar un efecto antimicrobiano destacan: Compuestos fenólicos simples, cuya actividad antimicrobiana está directamente relacionada con el número de grupos hidroxilos que tiene el derivado fenólico, los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo parece que están relacionados directamente con la toxicidad frente a los microorganismos, de forma que un aumento en la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad (Schindler *et al.*, 2002). Fenoles y polifenoles, considerando que la acción contra los microorganismos se debe a la inhibición enzimática posiblemente por acción sobre los grupos sulfhidrilos de sus aminoácidos de cisteína o por medio de reacciones más inespecíficas con proteínas bacterianas (Miskovsky *et al.*, 2002). Taninos tienen una acción inhibitoria del crecimiento de insectos y perturban la digestión de rumiantes. Se cree que la actividad antimicrobiana de estos compuestos se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular, y a su capacidad de unirse a polisacáridos (Cowan, 1999). Catequinas, derivados de los flavonoides presentes en el té verde (*Camellia sinensis*) han sido estudiadas como los compuestos que generan la actividad antimicrobiana *in vitro* sobre *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans* y *Shigella*, principalmente. Quinonas, su rango de actividad antimicrobiana es amplio, actuando posiblemente sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los polipéptidos de la pared celular y sobre las enzimas unidas

a membranas (Cowan, 1999). Alcaloides, el mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo (Domingo, D., 2003).

La presencia y cantidad de los grupos químicos mencionados en especies vegetales varía de acuerdo a las condiciones ambientales, estadio de la planta, suelo, nutrientes, etc.

La actividad terapéutica no sólo se puede conseguir luego de procesos de extracción y purificación de estos principios activos, sino directamente de la planta misma o de algunos extractos crudos (concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol, éter, etc., de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca). Por ejemplo: los extractos crudos de *Psoralea corylifolia*, un árbol nativo de China, poseen actividades reportadas antimutagénicas, antimicrobianas, además, un extracto aceitoso en hexano obtenido a partir de sus semillas presentó actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Se ha considerado que el responsable de estas actividades es el bakuchiol, un isoprenoide fenólico aislado de las semillas y hojas de esta planta (Katsura *et al.*, 2001).

Ocinum micranthum W., planta conocida como “san albahaca”, es utilizada para tratar infecciones respiratorias en regiones amazónicas de América del Sur, México y el Caribe. Se determinó la composición química del aceite esencial de las hojas de dicha planta, y también se la probó sobre *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Shigella sp.*, y hongos del género *Aspergillus*, confirmándose que dicho aceite puede ser considerado como un buen agente antibacteriano y antifúngico (Fuertes *et al.*, 1997).

Bazalar *et al.* (1998) realizaron un estudio de acción inhibitoria de crecimiento antimicrobiano, donde se mostró que la asociación de extractos acuosos de 2

plantas, *Erythroxylum novogranatense* variedad truxillense “Hoja de Coca de Trujillo” y *Plantago major*, presentaron sinergismo, comparado con el estudio realizado por separado de cada uno de los extractos; se realizaron las determinaciones fitoquímicas en muestras de ambas especies y los extractos acuosos, encontrándose una proporción de asociación para los dos extractos acuosos empleados de 50:50, considerándose como óptimo para este estudio

Montes *et al.* (2000) evaluaron 206 especies vegetales contra 26 especies de hongos fitopatógenos, y encontraron que entre 32 y 51 % de las plantas evaluadas interactuaban con los hongos y causaban desde estimulación biológica hasta inhibición total.

Los ácidos ceanótico y ceanotérico, provenientes de la planta *Ceanothus americanus*, han demostrado efectos inhibidores del crecimiento de *Streptococcus mutans*, *Actinomyces viscosus*, y *Porphyromonas gingivalis*; y los extractos etanólicos del propóleo han mostrado buena actividad antimicrobiana contra estos mismos microorganismos orales (Katsura *et al.*, 2001).

Se ha demostrado el efecto del extracto fenólico del té negro, el cual puede ser catalogado como agente bacterioestático y bactericida contra microorganismos como *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Salmonella typhimurium*. También se ha descrito el poder antimicrobiano de especias y sus extractos (clavo, ajo, cebolla, salvia, romero, cilantro, perejil, oréganos, vainilla, entre otros) (Muñoz-Cano, 2007).

Los estudios de plantas en el área de los productos naturales, aspiran a establecer relaciones entre la composición química de sus metabolitos secundarios y sus propiedades farmacológicas.

2.4.1 Modo de acción de los agentes antimicrobianos de origen vegetal

Los sitios de acción de los agentes antimicrobianos en la célula microbiana, incluye a la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético (Conner, 1993). Hay 4 modos principales de acción: (1) interferencia con la síntesis de la pared celular, (2) la inhibición de la síntesis de proteína, (3) la interferencia con la síntesis de ácido nucleico, y (4) la inhibición de una vía metabólica (Neu, 1992).

Los compuestos utilizados como antimicrobianos tienen varios sitios de acción dentro de la célula microbiana y dependiendo de las concentraciones utilizadas, pueden causar inhibición o inactivación de los microorganismos.

Conner (1993) sugirió que la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas, se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de compuestos estructurales. Una vez que el compuesto fenólico cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y con las proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así la actividad celular (Conner, 1993).

De Boer *et al.* (2005) encontraron que el aumento en la concentración de extracto de tomillo y carvacrol no se reflejó en una relación directa con su efecto antimicrobiano. Sin embargo, se encontró que después de rebasar una cierta concentración crítica, se presentó una rápida y significativa reducción en el número de células viables de *Salmonella typhimurium*. Esto se interpretó como: los compuestos fenólicos sensibilizan a la membrana celular y cuando se saturan los sitios sobre los cuales actúan se presenta un grave daño a la membrana citoplasmática.

Los efectos de los compuestos fenólicos pueden ser a dos niveles, sobre la integridad de la pared celular y membrana citoplasmática, así como sobre la

respuesta fisiológica del organismo. Los compuestos fenólicos pueden desnaturalizar a las enzimas responsables del inicio de la germinación de las esporas o interferir con el uso de aminoácidos necesarios para iniciar el proceso de germinación (Nychas, 1995).

Existen pocos estudios enfocados a comprender el mecanismo involucrado en la inhibición microbiana por especies y extractos de plantas.

2.5 Flores con actividad antimicrobiana

Las flores son de las partes fisiológicas de las plantas en las cuales se evalúan diversas propiedades biológicas. Morales-Cabrera (2011) evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de cálices deshidratados de *Hibiscus sabdariffa* (Jamaica) los extractos mostraron un efecto antimicrobiano, con diámetros de inhibición de 12.5 a 19.5 mm sobre serotipos de *Salmonella*.

Passiflora manicata en extracto etanólico muestra una acción antimicrobiana frente *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Lizcano, 2008).

Myrcianthes rhopaloides solo presenta inhibición frente a *Candida albicans* (Lizcano, 2008).

Acmella repens (botoncillo) en extracto etanólico es efectivo frente a *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, así como *Sonchus oleraceus* en una concentración mayor (80%) (Sulca, 2010).

Las flores de *Talipariti elatum* se utilizan como antiasmáticas en la medicina tradicional y se ha demostrado la presencia de diferentes componentes químicos en ellas y en particular la estructura del gluco flavonoide Gossypitrina con altos rendimientos frente a la inhibición de *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Providencia* y *Klebsiella* (Cuellar-Cuellar, 2011).

La manzanilla tiene un buen control de los microorganismos de la cavidad oral así como intestinal y se evidencia una disminución de la carga bacteriana (Carcamo, 2011).

El contenido de flavonas en brotes de *Camellia sinensis* utilizadas en la elaboración de té le confieren actividad antibacteriana frente a *Shigella*, *Vibrio*, *Streptococcus mutans* (Cowan, 1999).

2.6 *Erythrina americana* Miller

El género *Erythrina* pertenece a la familia Fabaceae (Leguminosae). El nombre alude al color prevaleciente de las flores y deriva del griego *erythros*= rojo. Se le designa también como “árbol de coral” debido a su color característico. El género está dividido en 5 subgéneros y 26 secciones. *E. americana* pertenece al género *Erythrina* y a la sección *Erythrina* (García *et al.*, 2001). Comúnmente se le conoce como zompante o colorín.

Son cerca de 115 especies de éste género, comprendiendo un amplio rango de variaciones morfológicas y diversidad biológica. Estas plantas se encuentran distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo además en algunas regiones cálidas y templadas (Fig. 3).

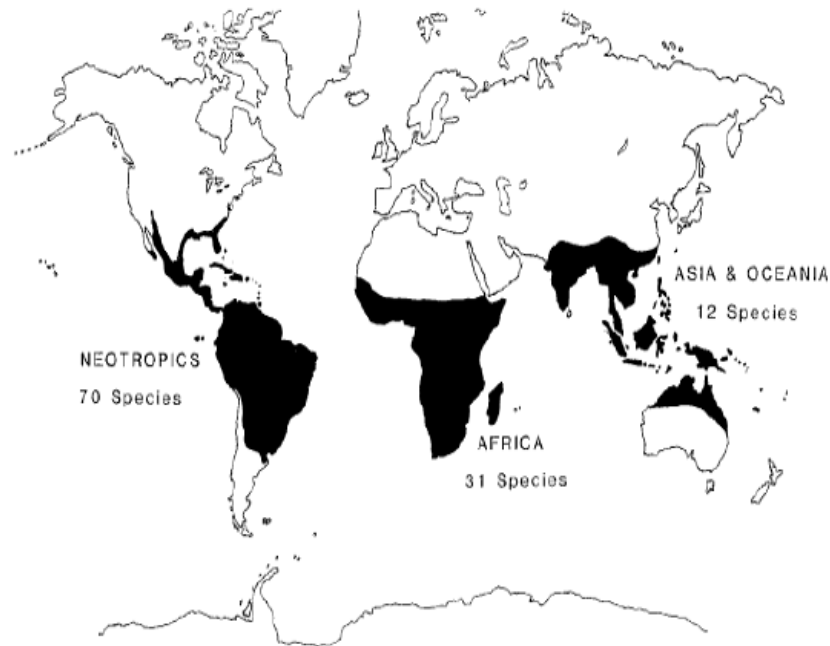


Figura 3. Distribución mundial de *Erythrina* (Neill 1988 y 1993)

La mayoría de las especies son árboles o matorrales, pero unos pocos son hierbas perennes con grandes raíces leñosas de reserva (Neill, 1988,1993). Muchas de estas especies han sido estudiadas por su morfología, distribución, cromosomas, contenido de alcaloides y aminoácidos y su composición química (García *et al.*, 2001). Pocas especies son encontradas en zonas templadas: *Erythrina herbacea* y *Erythrina flabelliformis* son nativas del sur de Estados Unidos, mientras que *Erythrina crista-galli* y *Erythrina falcata* se localizan en el norte de Argentina (Atchison, 1947).

Erythrina americana es un árbol de 4-5 m, extendido, con copa de ramas abundantes, corteza lisa y estaca café (Fig. 4). Tiene espinas en las ramas y espinas cónicas y anchas en el tronco. Las hojas son alternadas y trifoliada, con tres puntas, folíolos rómbicos-ovalados, de 7-22 cm de largo y ancho (García *et al.*, 2001).



Figura 4. *Erythrina americana* Miller (flor de colorín)

Esta especie se encuentra en tierras bajas y en elevaciones moderadas (1000-2100 m) (Krukoff, 1974). Neill (1988) consideró a *Erythrina coralloides* como sinónimo de *Erythrina americana*, aunque recientemente ambas especies fueron separadas.

La distribución de *Erythrina* y el número de especies conocidas se encuentran en las regiones delimitadas. La más alta concentración de especies de *Erythrina* se encuentra en el sur de México y en América Central (Neill, 1993).

Erythrina americana puede ser encontrada en el centro de México (Principalmente en los estados de Veracruz, Hidalgo, Estado de México, Morelos, Guerrero, Puebla y Oaxaca) (Krukoff, 1974).

2.6.1 Usos *Erythrina americana* Miller

Las flores, retoños jóvenes, corteza, raíces y semillas de las especies de *Erythrina* sirven en sus lugares de origen como alimento, tintes, fármacos y para ornamento (Atchison, 1947). *Erythrina americana* se usa como un árbol de sombra y soporte, además como cerca viva. Puede ser usada como abono verde y para alimentación

animal. Las flores son ingeridas y usadas para hacer infusiones, y las semillas se usan en joyería artesanal (García *et al.*, 2001).

2.6.2 Actividad biológica en el género *Erythrina*

Las especies de este género se utilizan para el alivio de 60 trastornos diferentes (Pino *et al.*, 2004). En la región de Huasteca de San Luis Potosí, el grupo Teenek usa las inflorescencias de *Erythrina americana* como calmantes y relajantes (Garín *et al.*, 2000) Las semillas, corteza, hojas y flores son frecuentemente reportadas por tener efecto sedativo (Lozoya-Lozoya, 1982).

Las acciones biológicas estudiadas con mayor frecuencia en el género *Erythrina* son: actividad antibacteriana, efecto citotóxico, actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética, antifúngica, entre otras (Pino *et al.*, 2004).

La presencia de flavonoides y taninos, así como de alcaloides se ha reportado antes en un estudio realizado, atribuyéndole a estos metabolitos funciones de defensa contra insectos, resistencia a parásitos, de ahí la gran importancia que presentan desde el punto de vista fitoquímico, con respecto a su amplia acción biológica (Rodríguez, 2005).

En extractos de raíz, corteza del tallo, hojas, semillas y flores de la especie *Erythrina senegalensis* DC muestran una actividad efecto contra diversas enfermedades: malaria, amenorrea, infecciones, abortos, heridas, ictericia y dolores corporales como lo reporta Saidu *et al.* (2000) y Togola *et al.* (2008).

Erythrina mildbraedii exhiben una actividad antiinflamatoria y antioxidante como lo reporta Njamen *et al.* (2003) siendo los pterocarpanos los responsables de esta actividad. Así como un efecto antibacterial sobre *Staphylococcus aureus* y *Mycobacterium smogmatis* (Mitscher *et al.*, 1988).

Mitscher *et al.* (1988), reportaron la capacidad antibacterial de la especie *Erythrina crista-galli* L sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium smogmatis*, *Candida albicans* y *Pseudomonas aeruginosa* siendo los pterocarpanos los compuestos responsables. También se reportó una acción antiinflamatoria y anticonceptiva (Muño *et al.*, 2002).

Khaomek *et al.* (2008) reportó que los alcaloides son responsables de la actividad antibacterial de *Erythrina fuscas* sobre *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, hongos *Muccor spp.*, *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus niger* confirmando lo reportado por Calle *et al.* (1997).

El efecto antibacterial sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Candida micoderma* de *Erythrina latissima* es atribuido a la presencia de flavonoides (Chacha *et al.*, 2005).

Erythrina poeppigiana presenta un efecto antibacterial sobre *Staphylococcus aureus* siendo los flavonoides los responsables de tal efecto como lo reporta Sato *et al.*, (2006).

El extracto crudo alcaloidal de plántulas de *Erythrina coralloides* mostró efecto antimicótico sobre las especies *Alternaria solani*, *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillum sp*, *Monilia fructicola*, (Sato *et al.*, 2006).

Rukachaisirikul *et al.* (2007) demostraron también que los favonoides, pterocarpanos, alcaloides, triterpenos y esteroides son responsables de la actividad antibacterial sobre *Streptococcus* y *Staphylococcus* y antiplasmodial de las especies *Erythrina subumbrans* y *Erythrina stricta*.

Las fracciones de alcaloides libres obtenidos a partir de semillas de *Erythrina americana* poseen un efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *Alternaria*

solani, *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium sp*, *Monilia fructicola* y *Trichoderma harziamun* a una dosis de 0.8 mg/mL presentó la actividad antimicótica más alta (Ibarra *et al.*, 2009).

Olusola (2012) demostró que el extracto etanólico de *Erythrina caffra* en concentraciones de 39.1 a 625 µg/mL es efectivo frente a *Micrococcus luteus*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.

Cabe resaltar que no se han reportado estudios e información sobre la utilización de flores de *Erythrina americana* Miller sobre microorganismos patógenos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la actividad antimicrobiana de los extractos metanólico y acuoso de la flor de colorín (*Erythrina americana* Miller) sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.

3.2 Objetivos Particulares

1. Determinar la actividad antimicrobiana como % de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus* y *Listeria monocytogenes* por efecto de los extractos metanólico de pétalo, pistilo y cáliz y extracto acuoso de pétalo de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller).
2. Cuantificar compuestos fenólicos (fenoles totales, taninos condensados y flavonoides totales) de los extractos metanólico de pétalo, pistilo y cáliz y extracto acuoso de pétalo de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller).
3. Determinar la actividad antioxidante de los extractos metanólico de pétalo, pistilo y cáliz y extracto acuoso de pétalo de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller).

4. HIPÓTESIS

4.1 Hipótesis Nula

Los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller) no poseen efecto antimicrobiano sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.

4.2 Hipótesis Alterna

Los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller) poseen efecto antimicrobiano sobre cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*.

5. METODOLOGÍA

5.1 Recolección del material biológico

La recolección del material biológico fue realizado en comunidades del estado de Querétaro, entre las coordenadas geográficas que van desde 20 ° 34 'y 21 ° 03' de latitud norte y 99 ° 23 'y 99 ° 53' de longitud oeste. El material fue identificado y colectado en el mes de Marzo 2012 en la última etapa de la floración, cuando las flores en estado maduro alcanzaron una longitud aproximada de 4-5 cm y un color rojo brillante. Las muestras fueron depositadas en Herbario Etnobotánico de QMEX, Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

5.2 Preparación de material biológico

Las flores fueron limpiadas y se separaron los pétalos, pistilo y cáliz. Cada parte vegetal se congeló en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 ° C hasta su uso.

5.3 Obtención de extracto metanólico y acuoso

Los pétalos, pistilo y cáliz se colocaron por separado en maceración en metanol (extracto metanólico) y pétalos en agua (extracto acuoso) asignando las siglas EMP para extracto metanólico de pétalo, EMPi para extracto metanólico de pistilo, EMC para extracto metanólico de cáliz y EAP para extracto acuoso de pétalo. Cada uno de los extractos se dejó reposar durante tres días en oscuridad y posteriormente se decantó. El extracto acuoso se liofilizó y se almacenó en oscuridad hasta su uso. El extracto metanólico se sometió a rotoevaporación. Las suspensiones se mantuvieron en refrigeración y protegidas de la luz hasta su uso. Posteriormente se siguió la metodología de Cardador-Martínez *et al.* (2002). Se colocaron 200 mg de muestra con 10 mL de metanol, puestos en agitación y posterior centrifugación, para determinar compuestos fenólicos y capacidad

antioxidante que se llevaron a cabo en condiciones de poca luz con la finalidad de evitar la degradación de los compuestos fenólicos.

5.4 Determinación de actividad antimicrobiana

Microorganismos de prueba:

Escherichia coli ATCC 28922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus* y *Listeria monocytogenes*.

Extractos: metanólico de pétalo, pistilo y cáliz, acuoso de pétalo de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller) en concentraciones de 500, 1,000, 2,000 y 10,000 ppm.

Control positivo: Gram - Amikacina en concentración de 10,000 ppm.

Control positivo: Gram + Pefloxacina. en concentración de 10,000 ppm.

Los experimentos para determinar el % de inhibición de crecimiento son basados en la norma NMX-BB-040-SCFI-1999 (Anexos) la cual establece un solo método, basado en determinar el porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos, cuando se ponen en contacto con el antimicrobiano, bajo condiciones de prueba específicas e indica que para que productos puedan ser denominados bactericidas deben inhibir en un 99,99% el crecimiento de células viables.

5.4.1 Preparación de los medios de cultivo

Agar nutritivo

Agar para métodos estándar

Caldo neutralizante

Solución amortiguadora de fosfatos

Se prepararon y esterilizaron los medios de cultivo de acuerdo a las instrucciones marcadas por el fabricante en la etiqueta del producto. Para el caso del medio de cultivo agar para método estándar con neutralizante, antes de esterilizar, se adicionó a un litro del medio de cultivo agar para método estándar, 25 mL de la solución neutralizante concentrada.

5.4.2 Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba

Se efectuaron dos resiembras de cada uno de los microorganismos de prueba y se incubaron de 20 h a 24 h a una temperatura de 35°C a 37°C.

A partir de estos cultivos, se resembraron cada uno de los microorganismos de prueba, en tubos de 22 mm x 175 mm que contenían cada uno 12 mL de agar nutritivo inclinado y se incubaron en las condiciones señaladas.

5.4.3 Determinación de la cuenta viable inicial

En un matraz Erlenmeyer que contenía 99 mL de solución amortiguadora de fosfatos diluida estéril, se transfirió 1 mL de la suspensión de los microorganismos de prueba y se efectuaron las diluciones decimales necesarias para obtener placas que contuvieran cada una entre 25 y 250 UFC.

Se colocó en cajas de petri estériles, por duplicado 1 mL de cada dilución, y se agregó a cada placa de 15 mL a 18 mL de agar para métodos estándar, se homogeneizó y dejó solidificar invirtiendo las cajas de petri y se incubó durante 48 h a 30°C - 35°C. Se contaron el número UFC en cada una de las cajas, con un cuenta colonias.

5.4.4 Determinación de las células sobrevivientes

Se partió de una dilución en agua de los extractos (solución stock) de 10,000 ppm y se transfirieron a matraces Erlenmeyer hasta concentraciones de 500, 1,000, y 2,000 ppm.

Los matraces se agitaron y se suspendió la agitación justamente antes de la inoculación, para que en el momento de la misma, aún existiera movimiento residual del líquido y así facilitar la incorporación del inóculo. Se inoculó en forma individual cada matraz con cada uno de los microorganismos de prueba en el centro de la superficie del líquido, evitando tocar con la pipeta, el cuello o las paredes del matraz.

Se agitó el matraz con la muestra inoculada midiendo tiempo de contacto de 30s, 2 min y 5 min después de la inoculación, se transfirió 1 mL de la misma, a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de la solución neutralizante diluida o del caldo neutralizante, se mezcló y transfirió por duplicado alícuotas de 10 mL a cajas de petri estériles, se agregó a cada placa de 15 mL a 18 mL del medio agar para métodos estándar con neutralizante, se homogeneizó y una vez solidificadas se invirtieron las placas y se dejaron incubar durante 48 h entre 35°C a 37°C. Después del período de incubación, se contaron el número de UFC en las placas.

5.4.5 Determinación % de inhibición del crecimiento bacteriano

Se promediaron los resultados de las placas de la cuenta viable inicial y de las células sobrevivientes y se calculó el % de inhibición mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{S \times 100}{C.V} * 100$$

Dónde:

S = Células sobrevivientes UFC / mL.

C.V.= Cuenta viable inicial.

5.5 Cuantificación de compuestos fenólicos

5.5.1 Cuantificación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales se determinó usando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Este método se basa en la oxidación de los compuestos fenólicos por el reactivo de Folin-Ciocalteu, el cual está formado por una mezcla de ácido fosfotungstico y ácido fosfomolibdico que se reduce por acción de los fenoles, en una mezcla de óxidos azules de tungsteno y de molibdeno. La coloración azul producida absorbe a una longitud de onda de 760 nm. Para la cuantificación de fenoles totales, se tomó una alícuota (40 ml) del sobrenadante obtenido de la extracción y se llevó a un volumen total de 500 ml, posteriormente se mezcla con 250 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (1N) y después se adicionaron 1250 ml de Na₂CO₃ (20 %) y se dejó reposar en la obscuridad por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent). La cuantificación se realizó interpolando los resultados en una curva estándar de ácido gálico (0 a 20 µg). Los resultados se expresan como mg equivalentes de ácido gálico (AG) por gramo de muestra (mg Eq AG/g de flor de colorín).

5.5.2 Cuantificación de taninos condensados

La cuantificación de taninos condensados se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Feregrino-Pérez *et al.* (2008) modificando para su uso en microplaca de 96 pozos. Al sobrenadante obtenido de la extracción (50 µL) se le agregaron 200 µL de la solución de vainillina al 0.5 % recién preparada (vainillina 1 % en

metanol y HCl 8% en metanol en una relación 1:1). Posteriormente se preparó un blanco al cual se le adicionaron 50 µL de metanol y 200 µL de HCl al 4 %. Para cuantificar los taninos condensados se midió la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent) utilizando una curva estándar de (+)catequina y los resultados obtenidos se expresaron como mg equivalentes de (+)catequina/g flor de colorín.

5.5.3 Cuantificación de flavonoides totales

Para la cuantificación de flavonoides totales se realizó lo descrito por Oomah *et al.* (2005). La determinación se realizó con 50 µl del extracto metanólico y acuoso de la muestra donde se adicionaron 180 µL de agua destilada o metanol y 20 µL de solución 2- aminoetildifenilborato al 1%. Se midió absorbancia en equipo espectrofotométrico visible (Thermo, Multiskan Ascent) con filtros de 404 nm y se interpolaron los resultados con la curva estándar a diferentes concentraciones (0-50 mg/mL) expresándolos como mg equivalentes de rutina/ g flor de colorín.

5.6 Determinación de actividad antioxidante

La capacidad antioxidante, está determinada por interacciones entre diferentes compuestos con diferentes mecanismos de acción. Por esto mismo, la determinación de la capacidad antioxidante de extractos complejos se lleva a cabo usualmente por diferentes métodos complementarios, que evalúen diversos mecanismos de acción (Floegel *et al.*, 2011). Algunos de los métodos más utilizados, por su simplicidad y reproducibilidad son: DPPH (depleción del óxido 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y ABTS (depleción del 2, 2'-Azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico) (Bakirel *et al.*, 2008; Sasikumar *et al.*, 2012).

En interacción con los radicales ABTS⁺ y DPPH, los antioxidantes transfieren electrones o átomos de hidrogeno a dicho radical y así neutralizan su carácter de

radical libre (Montoya *et al.*, 2004; Naik *et al.*, 2008) y lo convierten en un producto incoloro. Los secuestradores de radicales son inhibidores de radicales libres y antioxidantes primarios (Rao *et al.*, 2007).

El DPPH es un radical libre estable soluble en metanol que es neutralizado mediante un mecanismo de transferencia de hidrógeno, principalmente; por otra parte, el ABTS⁺ es generado tras una reacción que puede ser química (persulfato potasio), enzimática (peroxidasa, mioglobina) o eletroquímica donde su mecanismo de neutralización es principalmente por transferencia de electrones (Apak *et al.*, 2007; Floegel *et al.*, 2011). En el método ABTS, también conocido en la literatura científica como el método TEAC (Capacidad antioxidante en equivalentes de Trolox (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), por sus siglas en inglés) se puede medir la actividad de compuestos hidrofílicos y lipofílicos; en cambio, el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico por lo que mide preferentemente la capacidad antioxidante de compuestos poco polares. Otra diferencia entre ambos métodos es que el radical ABTS⁺ tiene la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm (Apak *et al.*, 2007).

5.6.1 DPPH

Se siguió el método original de Brand-Williams *et al.* (1995) modificado por Fukumoto y Mazza (2000) adaptado para su uso en microplaca. Se preparó el reactivo DDPH (difeníl-picril-hidrazilo) en matraz de 25 ml aforando con metanol y se agregó al sobrenadante resultante de la extracción. Se midió absorbancia espectrofotómetro (Thermo, Multiskan Ascent) a 532 nm cada 10 minutos durante 90 minutos. La placa se mantuvo cubierta y en la oscuridad a temperatura ambiente entre lecturas. Se utilizó una curva estándar utilizando Trolox en concentraciones de 0.05 -0.8 mM.

Cálculo de la Actividad Antioxidante

La actividad antirradical (ARA) se calculó como porcentaje de decoloración de DPPH, usando la siguiente ecuación:

$$ARA = 100 \times (1 - A_{\text{muestra}} / A_{\text{control}})$$

Donde ARA= Actividad antirradical, A_{muestra} = Absorbancia de la muestra a 532nm y A_{control} = Absorbancia del control (ausencia de antioxidante).

La capacidad antioxidante de equivalentes de Trolox (TEAC) fue calculada utilizando la siguiente ecuación:

$$TEAC_{\text{muestra}} = A_{\text{muestra}} / (m \times [\text{muestra}])$$

Donde A_{muestra} = Absorbancia de la muestra a 532 nm; m, = Pendiente de la curva de calibración $[\text{muestra}]$ = Concentración de cada muestra.

5.6.2 ABTS⁺

El método fue desarrollado usando el 2,2-azinobis (3-etil-benzotiazolin,6-ácido sulfónico) (ABTS) ensayo descrito por Nenadis *et al.* (2004) modificado para su uso en microplaca. Se adicionó persulfato de potasio con una concentración de 140mM, el cual se resguardó de la luz por 12 h para generar el radical. Se monitoreó absorbancia con el Lector Elisa a una longitud de onda de 734nm, en un rango de 0.7 y 1.0. Se agregaron 19.20 mg de reactivo y se aforó a 5 mL con agua destilada, posteriormente se agregaron 88 μ L de persulfato de sodio para la formación del radical ABTS. Se prepararon las muestras en microplaca de 96 pozos con las concentraciones del extracto y ABTS⁺, como control se utilizó metanol y ABTS⁺ y como blanco la muestra y metanol. La medición de las absorbancia se llevó a cabo a 734nm por un lapso de 0-90 minutos en un Lector ELISA. Se utilizó una curva estándar utilizando Trolox en concentraciones de 50 a 800 μ M. Los resultados se expresan en μ M de Trolox/ g flor de colorín.

El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{A_{\text{inicial}} - A_{\text{final}}}{A_{\text{inicial}}} * 100$$

Donde A_{inicial} = Absorbancia inicial, A_{final} = Absorbancia final

5.7 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado con dos replicas cada uno. Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 6.0. Los resultados obtenidos se expresan como la Media \pm Error Estándar (E.E.). Se utilizó análisis de varianza con un nivel de confianza del 95%, las diferencias de las medias entre los métodos se determinaron con la prueba de Tuckey.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Determinación de actividad antimicrobiana en extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller)

La actividad antimicrobiana reportada como % de inhibición en el crecimiento de los microorganismos se muestra en las figuras 5 (*Escherichia coli*), 6 (*Salmonella typhimurium*), 7 (*Streptococcus mutans*), 8 (*Staphylococcus aureus*), 9 (*Streptococcus pneumoniae*), 10 (*Micrococcus luteus*) y 11 (*Listeria monocytogenes*), donde se observa una diferencia significativa al aumentar la concentración de los extractos (EMP, EAP, EMPi y EMC) hasta 10, 000 ppm.

Los extractos de flor de colorín resultaron con un mejor efecto inhibitorio sobre bacterias Gram positivas (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus* y *Listeria monocytogenes*), esto concuerda con lo reportado por Lagu *et al.*, (2012) quienes reportan que en *Erythrina abyssinica* el diámetro de zona de inhibición mostró que las bacterias Gram positivas son más susceptibles en comparación con bacterias Gram negativas, se observó un mayor actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y no se observó ninguna actividad frente a especies de *Salmonella* y *Escherichia coli*, el factor de atribución para la actividad antibacteriana de los extractos crudos podría ser debido a presencia de componentes bioactivos en los extractos sobre todo a la presencia de flavanonas abyssinian I , II , III. Chacha *et al.*, (2004) reportaron que *Erythrina latissima* otra especie de *Erythrina* tienen dos isoflavonas y una flavanona (erylatissin A, B, C), además de 10 conocidos flavonoides que exhiben actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y un efecto nulo sobre *Escherichia coli*.

Una de las explicaciones del por qué las bacterias Gram negativas son más resistentes a los extractos vegetales lo proponen Ikigai *et al.*, (1993) quienes llevaron a cabo investigaciones sobre galato de epigallocatequina, una catequina

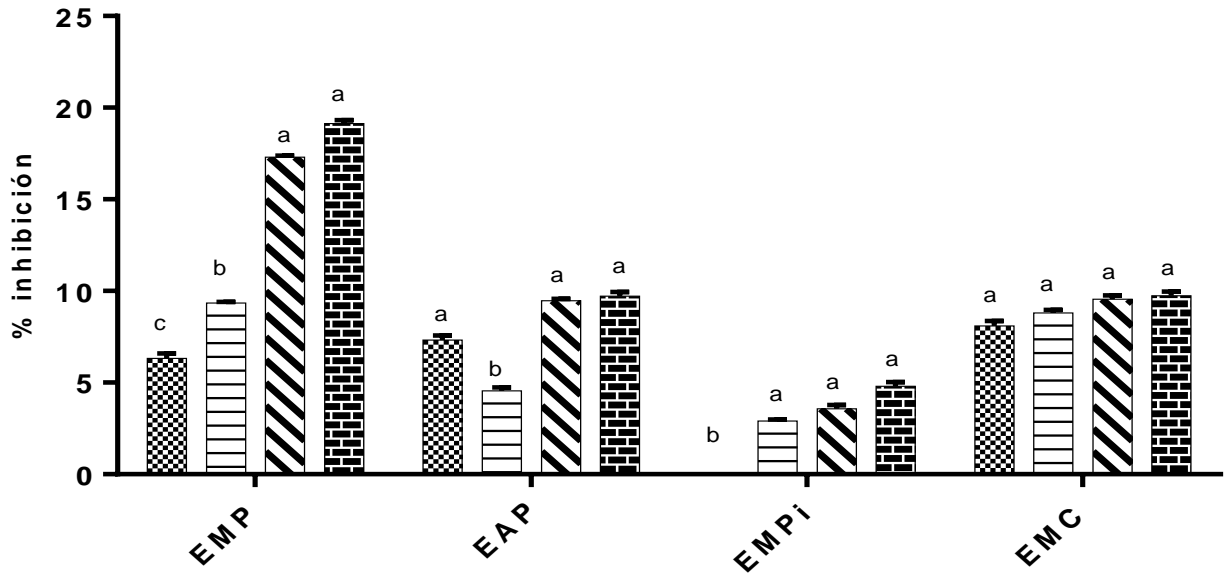
fuertemente antibacteriana encontrada en el té verde, las catequinas son un grupo de flavonoides que parecen tener una mayor actividad contra bacterias Gram positivas que las bacterias Gram negativas. En este estudio, los liposomas se utilizaron como membranas bacterianas modelo y se demostró que el galato de epigallocatequina inducía la fuga de moléculas pequeñas desde el espacio intraliposómico. Por consiguiente, el grupo concluyó que las catequinas actúan y dañan principalmente las membranas bacterianas, dos teorías fueron presentadas, en primer lugar, las catequinas pueden perturbar las bicapas lipídicas penetrando directamente e interrumpir la función de barrera. Alternativamente, las catequinas pueden causar la fusión de membrana, un proceso que resulta en la fuga de materiales intramembranosas. Curiosamente, el grupo también demostró que la fuga inducida por galato de epigallocatequina fue significativamente menor cuando se prepararon membranas de los liposomas que contienen lípidos cargados negativamente. Por ello, se sugirió que la baja susceptibilidad de las bacterias Gram negativas puede ser al menos parcialmente atribuible a la presencia de lipopolisacáridos que actúa como una barrera. Murray, (2009) también hace mención que a causa de la capa de lipopolisacáridos situada en la parte externa de la pared celular de las Gram negativas, antibióticos como Penicilina no son capaces de destruirlas, mientras que para las bacterias Gram positivas la Penicilina es capaz de destruirlas ya que bloquea la formación de enlaces peptídicos entre las diferentes cadenas del peptidoglucano. Los extractos de flor de colorín poseen cantidades significativas de catequinas (25.58 ± 0.38 , 5.56 ± 0.29 , 9.23 ± 0.24 , 20.21 ± 0.25 mg Eq. (+) catequina/g muestra). Por lo tanto, significaría que estos compuestos bioactivos pudieran estar involucrados en el mejor efecto sobre las bacterias *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus* y *Listeria monocytogenes*. Sin embargo considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en los extractos (crudos), los componentes de menor proporción tienen un papel crítico en la actividad antimicrobiana, posiblemente debido a un efecto sinérgico o antagónico entre ellos de forma que es complejo determinar que el extracto crudo tiene una mayor o menor actividad que la mezcla de sus compuestos activos que

se encuentran en mayor proporción. Por lo anterior es muy probable que su observar un mejor efecto inhibitorio de las bacterias Gram positivas por los extractos de flor de colorín no sea atribuible a un mecanismo específico, sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintas localizaciones de la célula.

Olusola *et al.*, (2012) utilizaron extractos etanólicos de *Erythrina caffra* en concentraciones superiores de 2500 µg/mL (la cual es una concentración mayor a las probadas en este trabajo) y reportan un efecto nulo sobre bacterias Gram positivas como *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus pumilus*. Así también Barneche *et al.*, (2010) reportan para la especie *Erythrina crista-galli*, la flor de espiga (*Acalypha gracilis*), Albahaca, (*Ocimum selloi*), *Mimosa uraguensis* en extractos hidroalcohólicos y acetónicos no poseen ningún efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, Por lo que, los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller) poseen mejor efecto inhibitorio a una menor concentración en bacterias Gram positivas que otros extractos de plantas incluidos extractos del género *Erythrina*.

Las posibles discrepancias que se presentan en los resultados de los análisis de la susceptibilidad bacteriana a los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller) podrían ser consecuencia en primer lugar, del mecanismo de acción en el tipo de microorganismo, la constitución de la estructura de la pared celular y del arreglo de la membrana celular. En segundo lugar, haciendo referencia a los extractos, los factores que influyen pueden ser la fuente botánica, la procedencia de la planta, la etapa de desarrollo, época de cosecha, la técnica de extracción, el tratamiento de la planta (seca, fresca) y por último la metodología utilizada en las pruebas de susceptibilidad bacteriana (Vuorelaa y Leinonen *et al.*, 2004). Por lo anterior los resultados de estos estudios no pueden generalizar a todas las bacterias y a otras especies vegetales.

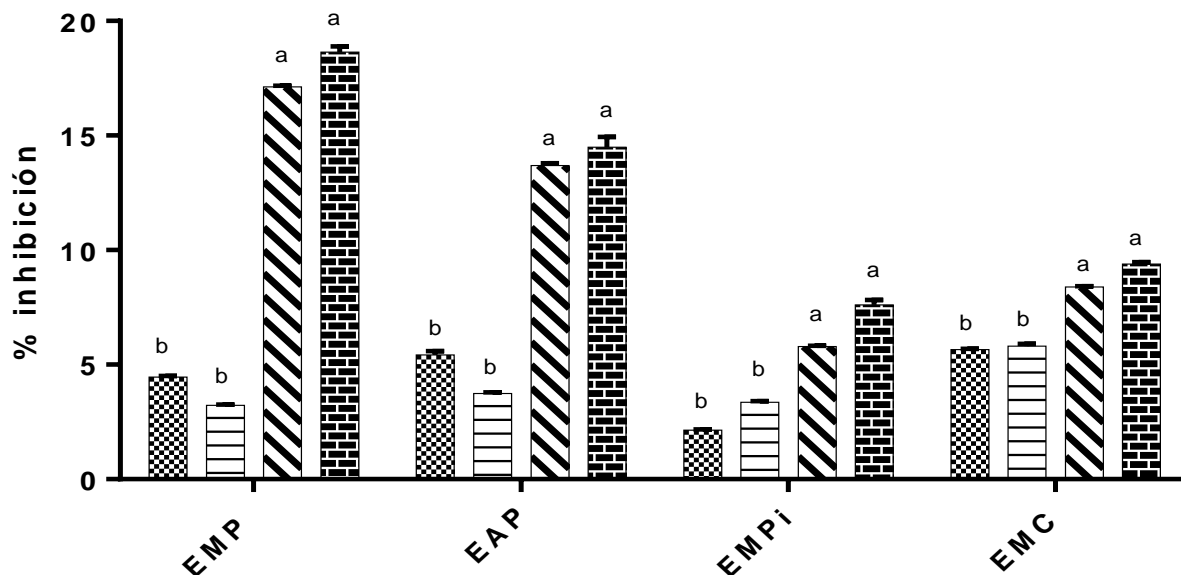
Escherichia coli



	EMP	EAP	EMPi	EMC	CONTROL
500 ppm	6.32 ± 0.10^c	7.31 ± 0.104^a	0 ± 0^b	8.087 ± 0.11^a	Amikacina
1,000 ppm	9.34 ± 0.06^b	4.56 ± 0.18^b	2.89 ± 0.09^a	8.79 ± 0.16^a	
2,000 ppm	17.29 ± 0.09^a	9.47 ± 0.09^a	3.58 ± 0.16^a	9.55 ± 0.204^a	
10,000 ppm	19.13 ± 0.18^a	9.72 ± 0.23^a	4.80 ± 0.21^a	9.73 ± 0.24^a	100

Figura 5. % de inhibición de *Escherichia coli* por efecto de los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller). EMP: extracto metanólico de pétalo, EAP: extracto acuoso de pétalo, EMPi: extracto metanólico de pistilo, EMC: extracto metanólico de cáliz. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes \pm EE. Las diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

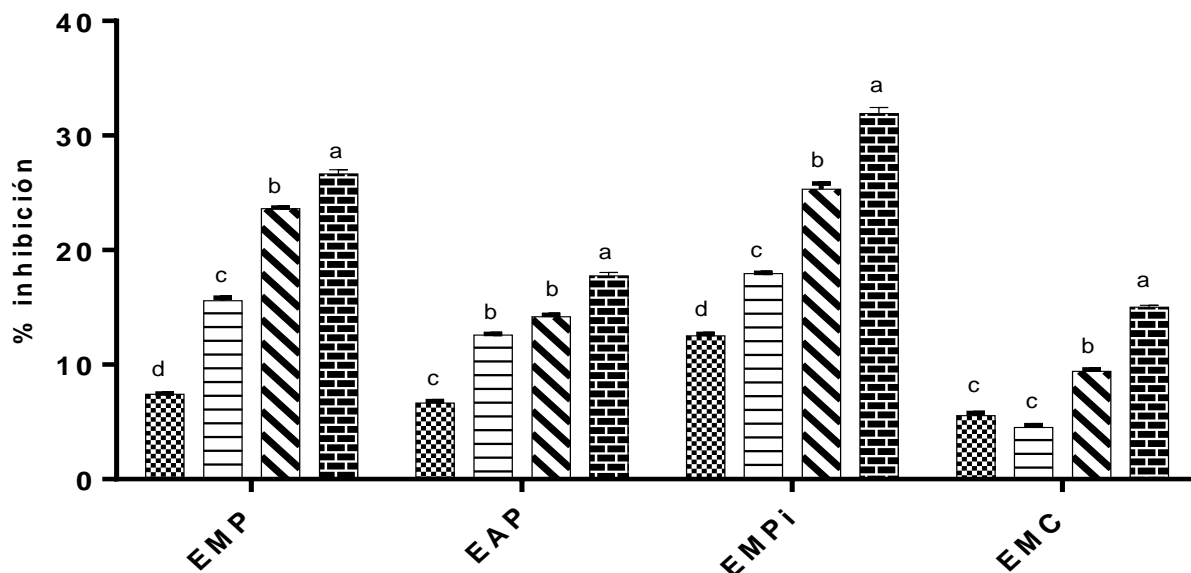
Salmonella typhimurium



	EMP	EAP	EMPi	EMC	CONTROL
500 ppm	4.46 ± 0.05 ^b	5.43 ± 0.15 ^b	2.14 ± 0.03 ^b	5.66 ± 0.03 ^b	Amikacina
1,000 ppm	3.23 ± 0.02 ^b	3.74 ± 0.04 ^b	3.35 ± 0.04 ^b	5.8 ± 0.09 ^b	
2,000 ppm	17.12 ± 0.06 ^a	13.69 ± 0.10 ^a	5.79 ± 0.03 ^a	8.38 ± 0.04 ^a	
10,000 ppm	18.64 ± 0.24 ^a	14.49 ± 0.45 ^a	7.61 ± 0.21 ^a	9.38 ± 0.09 ^a	100

Figura 6. % de inhibición de *Salmonella typhimurium* por efecto de los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller). EMP: extracto metanólico de pétalo, EAP: extracto acuoso de pétalo, EMPI: extracto metanólico de pistilo, EMC: extracto metanólico de cáliz. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes ± EE. Las diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

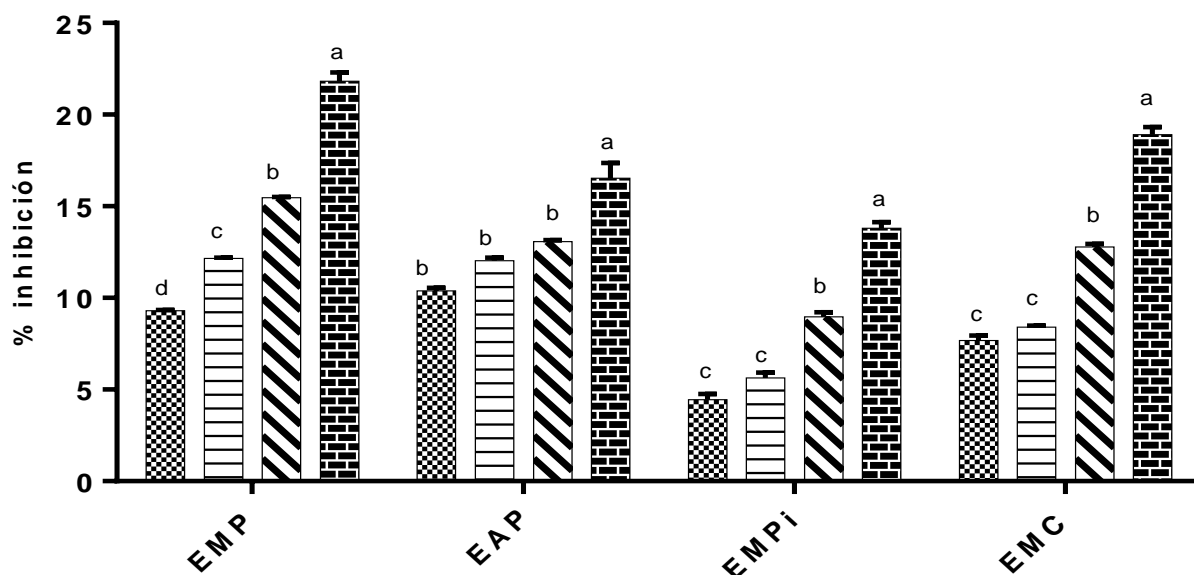
Streptococcus mutans



	EMP	EAP	EMPi	EMC	CONTROL
500 ppm	7.40 ± 0.08 ^d	6.66 ± 0.14 ^c	12.51 ± 0.18 ^d	5.55 ± 0.22 ^c	Pefloxacina
1,000 ppm	15.57 ± 0.26 ^c	12.58 ± 0.08 ^b	17.96 ± 0.06 ^c	4.52 ± 0.19 ^c	
2,000 ppm	23.62 ± 0.09 ^b	14.16 ± 0.18 ^b	25.31 ± 0.505 ^b	9.403 ± 0.19 ^b	
10,000 ppm	26.65 ± 0.36 ^a	17.74 ± 0.28 ^a	31.92 ± 0.51 ^a	15.02 ± 0.15 ^a	100

Figura 7. % de inhibición *Streptococcus mutans* por efecto de los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller). EMP: extracto metanólico de pétalo, EAP: extracto acuoso de pétalo, EMPi: extracto metanólico de pistilo, EMC: extracto metanólico de cáliz. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes ± EE. Las diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

Staphylococcus aureus







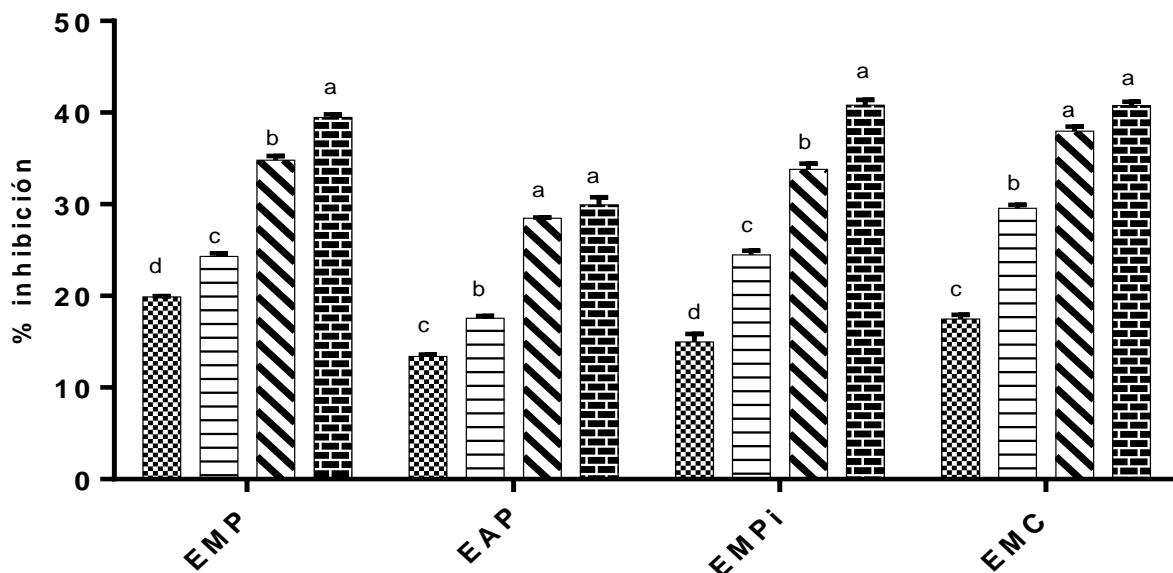
	EMP	EAP	EMPi	EMC	CONTROL
 500 ppm	9.31 ± 0.03 ^d	10.38 ± 0.16 ^b	4.45 ± 0.31 ^c	7.68 ± 0.26 ^c	Pefloxacina
 1,000 ppm	12.15 ± 0.05 ^c	12.03 ± 0.16 ^b	5.64 ± 0.27 ^c	8.41 ± 0.08 ^c	
 2,000 ppm	15.46 ± 0.05 ^b	13.08 ± 0.08 ^b	8.97 ± 0.23 ^b	12.79 ± 0.16 ^b	
 10,000 ppm	21.82 ± 0.48 ^a	16.53 ± 0.83 ^a	13.80 ± 0.33 ^a	18.89 ± 0.42 ^a	100

Figura 8. % de inhibición de *Staphylococcus aureus* por efecto de los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller). EMP: extracto metanólico de pétalo, EAP: extracto acuoso de pétalo, EMPi: extracto metanólico de pétalo, EMC: extracto metanólico de cáliz. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes ± EE. Las diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

Streptococcus pneumoniae







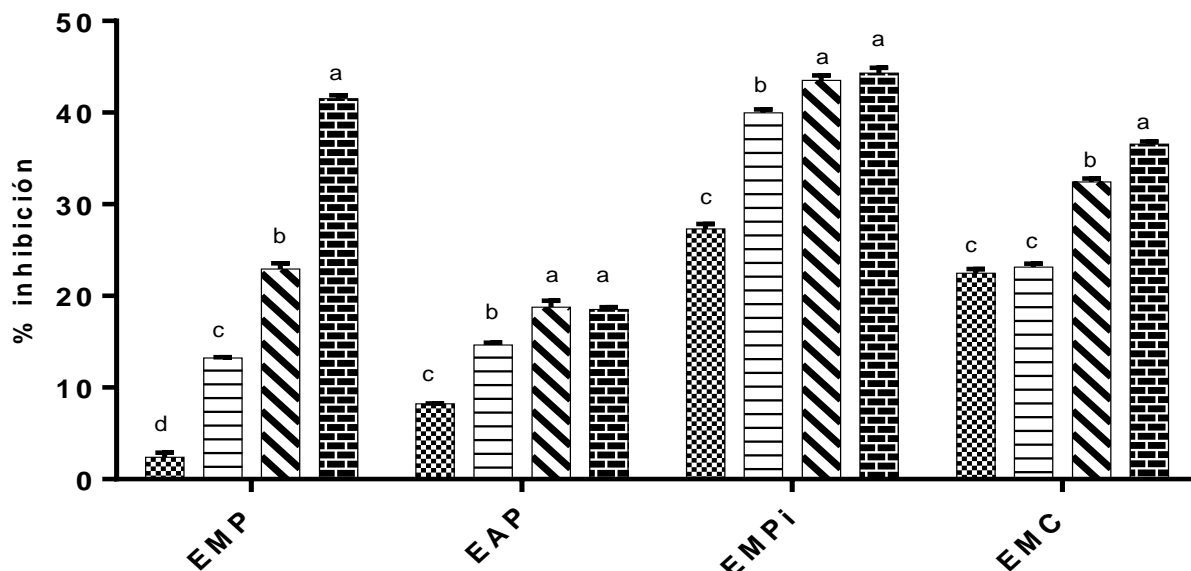
	EMP	EAP	EMPi	EMC	CONTROL
 500 ppm	19.90 ± 0.06 ^d	13.40 ± 0.21 ^c	14.97 ± 0.89 ^d	17.47 ± 0.46 ^c	Pefloxacina
 1,000 ppm	24.31 ± 0.32 ^c	17.57 ± 0.22 ^b	24.46 ± 0.48 ^c	29.57 ± 0.37 ^b	
 2,000 ppm	34.81 ± 0.44 ^b	28.46 ± 0.11 ^a	33.83 ± 0.61 ^b	37.98 ± 0.48 ^a	
 10,000 ppm	39.48 ± 0.34 ^a	29.94 ± 0.83 ^a	40.81 ± 0.58 ^a	40.78 ± 0.40 ^a	100

Figura 9. % inhibición *Streptococcus pneumoniae* por efecto de los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller). EMP: extracto metanólico de pétalo, EAP: extracto acuoso de pétalo, EMPi: extracto metanólico de pétalo, EMC: extracto metanólico de cáliz. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes ± EE. Las diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

Micrococcus luteus







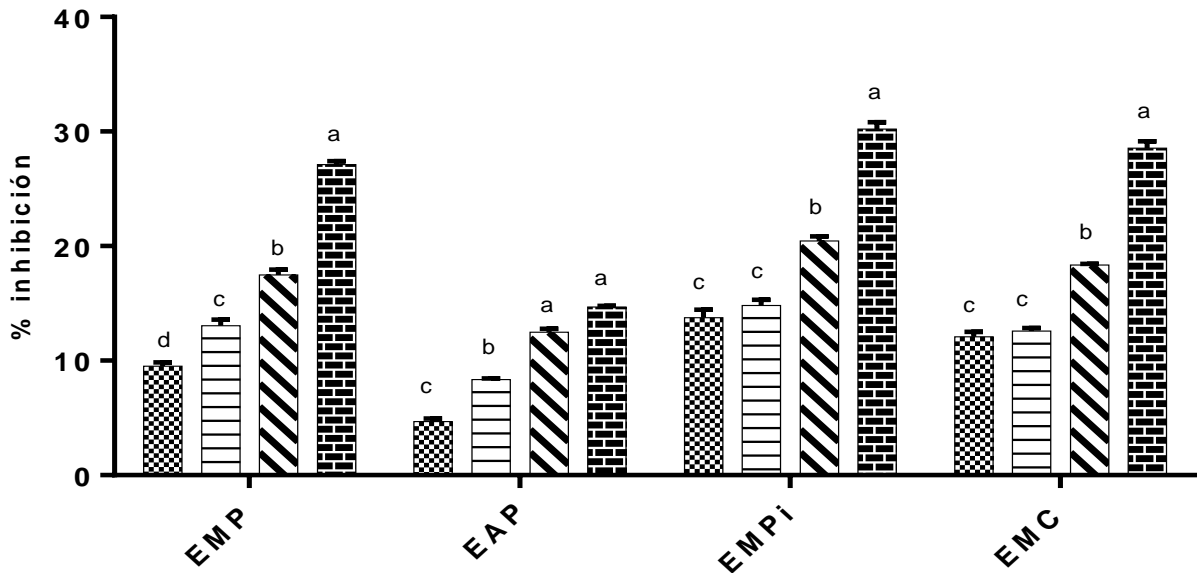
	EMP	EAP	EMPi	EMC	CONTROL
 500 ppm	2.31 ± 0.505 ^d	8.21 ± 0.05 ^c	27.29 ± 0.56 ^c	22.46 ± 0.47 ^c	Pefloxacina
 1,000 ppm	13.21 ± 0.107 ^c	14.65 ± 0.26 ^b	39.96 ± 0.36 ^b	23.14 ± 0.38 ^c	
 2,000 ppm	22.92 ± 0.64 ^b	18.75 ± 0.74 ^a	43.51 ± 0.55 ^a	32.42 ± 0.39 ^b	
 10,000 ppm	41.52 ± 0.38 ^a	18.50 ± 0.25 ^a	44.29 ± 0.61 ^a	36.58 ± 0.28 ^a	100

Figura 10. % de inhibición de *Micrococcus luteus* por efecto de los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller). EMP: extracto metanólico de pétalo, EAP: extracto acuoso de pétalo, EMPi: extracto metanólico de pétalo, EMC: extracto metanólico de cáliz. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes ± EE. Las diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

Listeria monocytogenes







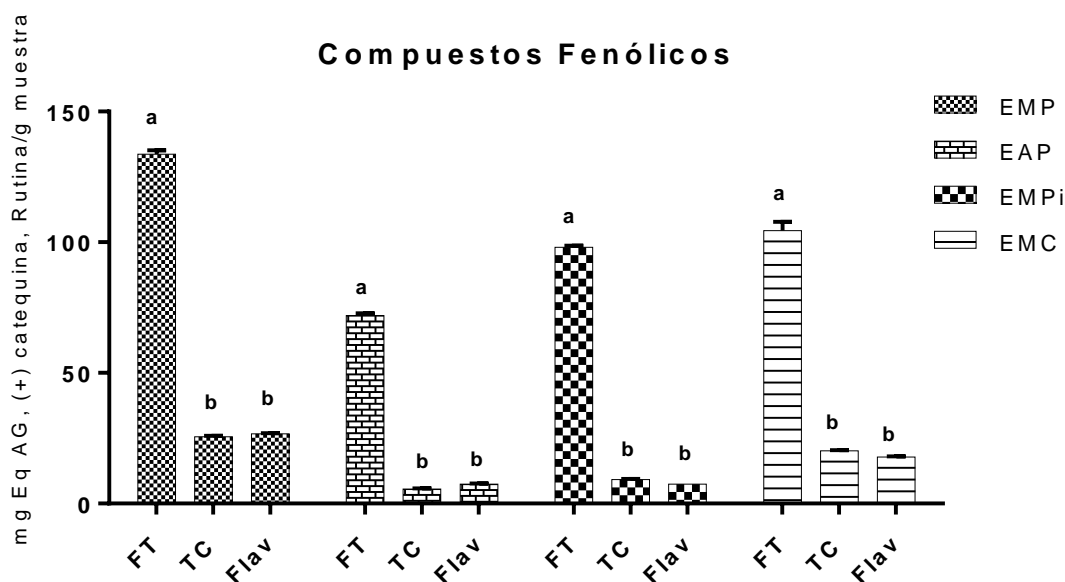
	EMP	EAP	EMPi	EMC	CONTROL
 500 ppm	9.52 ± 0.34 ^d	4.68 ± 0.27 ^c	13.73 ± 0.71 ^c	12.06 ± 0.43 ^c	Pefloxacina
 1,000 ppm	13.05 ± 0.53 ^c	8.33 ± 0.12 ^b	14.81 ± 0.48 ^c	12.56 ± 0.28 ^c	
 2,000 ppm	17.46 ± 0.46 ^b	12.48 ± 0.31 ^a	20.44 ± 0.40 ^b	18.34 ± 0.11 ^b	
 10,000 ppm	27.12 ± 0.30 ^a	14.69 ± 0.083 ^a	30.20 ± 0.60 ^a	28.55 ± 0.57 ^a	100

Figura 11. % de inhibición de *Listeria monocytogenes* por efecto de los extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller). EMP: extracto metanólico de pétalo, EAP: extracto acuoso de pétalo, EMPi: extracto metanólico de pétalo, EMC: extracto metanólico de cáliz. Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes ± EE. Las diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

6.2 Cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de flor de colorín *Erythrina americana* Miller

Se cuantificaron fenoles totales (133.65 ± 1.51 , 71.99 ± 0.85 , 98.04 ± 0.60 , 104.42 ± 3.35 mg Eq. AG/g muestra), taninos condensados (25.58 ± 0.38 , 5.56 ± 0.29 , 9.23 ± 0.24 , 20.21 ± 0.25 mg Eq. (+) catequina/g muestra) y flavonoides totales (26.64 ± 0.24 , 7.48 ± 0.14 , 7.44 ± 0.02 , 17.82 ± 0.30 mg Eq. Rutina/g muestra) valores para EMP, EAP, EMPi y EMC respectivamente. En la figura 12 se muestra la diferencia de compuestos fenólicos presentes en todos los extractos, observándose hasta 10 veces mayor contenido de Fenoles Totales que Taninos condensados y Flavonoides Totales.



	Fenoles Totales	Taninos Condensados	Flavonoides Totales
EMP	133.65 ± 1.51^a	25.58 ± 0.38^b	26.64 ± 0.24^b
EAP	71.99 ± 0.85^a	5.56 ± 0.29^b	7.48 ± 0.14^b
EMPi	98.04 ± 0.60^a	9.23 ± 0.24^b	7.44 ± 0.02^b
EMC	104.42 ± 3.35^a	20.21 ± 0.25^b	17.82 ± 0.30^b

Figura 12. Contenido de compuestos fenólicos en extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller). EMP: extracto metanólico de pétalo, EAP: extracto acuoso de pétalo, EMPi: extracto metanólico de pistilo, EMC: extracto metanólico de cáliz.

Los resultados se expresan en FT (Fenoles Totales): mg Eq. Ácido Gálico/g muestra, TC (Taninos condensados): mg Eq. (+) catequina/g muestra, Flav (Flavonoides Totales): mg Eq. Rutina/g muestra e indican la media de tres experimentos independientes \pm EE.

Las diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

Mediante la utilización de UltraPerformance Convergence Chromatography™ (UPC²™) (Fig. 13) se pueden observar la presencia de compuestos como licopeno, betacaroteno, luteína y por la longitud de onda a la cual se corrió la muestra (430 nm) supone (debido a la falta de estándares) la presencia en cantidades importantes de compuestos de naturaleza fenólica. Los compuestos carotenoides encontrados (Licopeno y Betacaroteno) pudieran estar involucrados en el efecto antimicrobiano encontrado para bacterias Gram positivas. Boiero *et al.*, (2008) demostraron que los carotenoides presenta mayor actividad frente a *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis* que ante otras bacterias Gram negativas como *Pseudomona aeruginosa*.

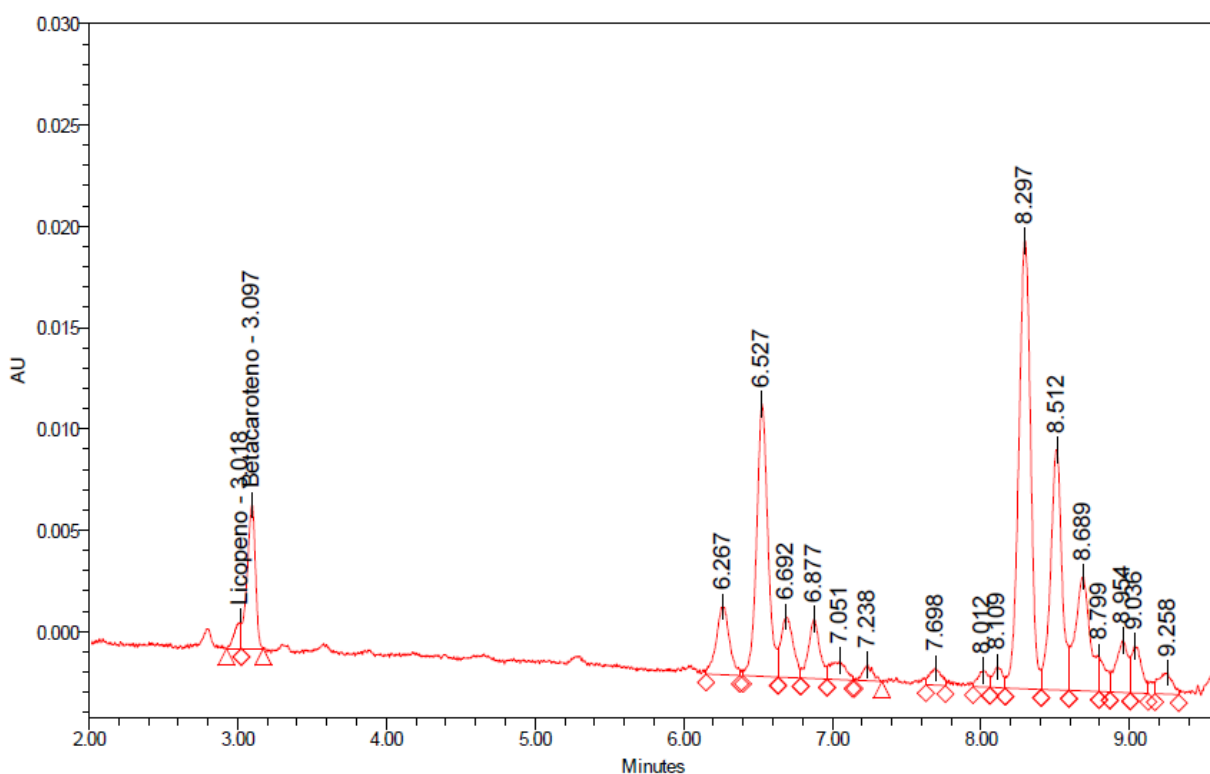


Figura 13. Cromatograma de compuestos presentes en extracto de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller).

Importante destacar que en las partes externas de la flor como pétalos y el cáliz se obtuvieron hasta tres veces más compuestos fenólicos, esto debido a que los compuestos fenólicos se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes internas de la planta y por encima de la superficie del suelo (Martínez-Flórez, 2002) ya que desempeñan un papel importante en la biología vegetal; responden a la luz y controlan los niveles de las auxinas reguladoras del crecimiento y diferenciación de las plantas. También se incluye su papel de defensa ante la presencia de patógenos, y confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización (Mercado-Mercado, 2013).

Los compuestos fenólicos y flavonoides son de naturaleza polar. La polaridad y, consecuentemente, la solubilidad de los compuestos fenólicos en disolventes polares, aumenta con la disminución de la longitud de la cadena hidrocarbonada, la presencia de grupos funcionales polares y la capacidad de formación de puentes de hidrógeno con el disolvente. En base a los análisis realizados con extracto metanólico y acuoso de pétalo se pudo observar que la mayor cantidad de compuestos se obtuvo usando como disolvente metanol razón por la cual se optó por la utilización de pistilo y cáliz en extracto metanólico logrando una mayor cuantificación de compuestos en estos extractos. Sin embargo dada las condiciones de consumo de los pétalos en la población, el extracto acuoso de pétalo es considerado en los análisis posteriores.

Estudios indican la presencia de compuestos fenólicos en especies pertenecientes al género *Erythrina* o bien en la misma especie, pero en diferente parte de la planta como lo mencionado por Sotelo *et al.* (2003) quienes reportan la cantidad de taninos de $0,14 \pm 0,001$ g/100g de semillas de *Erythrina americana* Miller, cantidad menor de taninos a la reportada por este estudio en otras partes de la flor (25.58 ± 0.38 , 9.23 ± 0.24 , 20.21 ± 0.25 mg Eq/g de pétalo, pistilo y cáliz, respectivamente). Bunalema *et al.* (2011) reportan estudios cualitativos para determinar la presencia de compuestos fenólicos en extracto metanólico de

Erythrina abbyssinica. La presencia de taninos se indicó por la formación de una coloración azul-negro utilizando el extracto seco y llevándolo a ebullición con agua y añadiendo gotas de solución cloruro de hierro III (FeCl_3) 0,1M. La presencia de fenoles se indicó por la formación de una solución azulada profunda añadiendo Cloruro de hierro III. Se encontró también la presencia de flavonas indicado por una coloración amarilla cuando se añade solución de amonio a una porción del extracto seguido por la (5 ml) se añadió a una porción del extracto seguido por la adición de ácido sulfúrico.

Los pétalos de flor de colorín presentan mayor cantidad de flavonoides (26.64 ± 0.24 mg Eq. Rutina/g muestra) y taninos (25.58 ± 0.38 mg Eq. (+) catequina/g muestra) que los reportados para otras flores como la flor de achiote 1.96–3.42 Eq. Rutina/100 g y 1.25 mg Eq. Catequina/100 g (Mercado-Mercado, 2011), azafrán 2.9-5.8 mg Eq. Catequina/100 g (Karimi *et al.*, 2010), flor de cempasúchil 186.2 mg Eq. Rutina/100 g y 52.6 mg Eq. Catequina/100 g (Soon-Park, 1998; Çetkovic *et al.*, 2004), considerando así una importante fuente de compuestos fenólicos sobre otras ya descritas.

Los resultados de compuestos fenólicos obtenidos para pétalo, pistilo y cáliz mostrados en este trabajo son los primeros reportados en flores de *Erythrina americana* Miller de los cuales hasta este momento se tiene conocimiento.

6.3 Determinación de actividad antioxidante en extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller)

La actividad antioxidante en EMP, EMPi, EMC se evaluó por dos métodos utilizando los radicales ABTS^+ y DPPH, estos se encuentran entre los métodos más comunes para analizar la actividad antioxidante *in vitro*. Se recomienda al menos dos métodos para determinar la actividad antioxidante y proporcionar información completa sobre el material en estudio, teniendo en cuenta los pros y los contras de cada ensayo (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008)

Los resultados muestran una estrecha relación con el contenido de compuestos fenólicos en los diferentes extractos (Cuadro 1), siendo los extractos con mayor contenido de compuestos fenólicos (pétalo y cáliz) los que presentan mayor actividad antioxidante. 83.71 ± 1.25 , 76.67 ± 1.345 % de inhibición de ABTS⁺ y 67.08 ± 0.05 , 61.28 ± 0.67 % de reducción del radical DPPH (pétalo y cáliz respectivamente). Salazar-Aranda, (2009), considera que una reducción de más del 60% DPPH es una buena actividad antioxidante en productos herbolarios, por lo que los extractos de pétalo y cáliz poseen un buen efecto antioxidante. La actividad antioxidante medida en mM Eq Trolox / g muestra, se expresó de manera similar por los dos métodos de cuantificación.

Ibarra *et al.*, (2011) describieron la actividad antioxidante de fracciones alcaloides de semillas de *Erythrina americana* Miller capaces de inhibir en 44-56% el radical DPPH. Chacha *et al.*, (2005) reportaron en *Erythrina latissima* las propiedades antioxidantes de flavonoides extraídos de esta especie, los mejores compuestos con potencial antioxidante fueron un pterocarpano (135 µg/mL) una chalcona (160 µg/mL) y una flavanona (360 µg/mL).

Los pétalos y cáliz de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller) tienen mejor efecto antioxidante que otras flores como manzanilla (*Matricaria recutita*) (61.1 ± 14.5 % de inhibición de DPPH) (Salazar-Aranda, 2009), flor de achiote (80 y 14.91-16 % de inhibición de ABTS y DPPH respectivamente) (Sasikumar, 2012), azafrán (15.69 % de inhibición de DPPH) (Gallo *et al.*, 2010) y flor de cempasúchil (38 % de inhibición de DPPH) (Soon-Park, 1998) y otras plantas como *Tilia occidentalis* (65.4 ± 6.9 % de inhibición de DPPH), *Salvia officinalis* (61.1 ± 2.2 % de inhibición de DPPH) (Salazar-Aranda, 2009), Chaya (24% de inhibición de ABTS) (Loarca-Piña, 2010), Chía (2.43-66.26 % de inhibición de ABTS y 4.72-47.58 % de inhibición de DPPH) (Poungoué-Kaatou , 2006), todas ellas utilizadas en la herbolaria mexicana.

Esta actividad inhibidora de la formación de radicales se puede atribuir a la presencia de compuestos fenólicos en el extracto los cuales pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres (López- Martínez *et al.* 2011).

La mayoría de los métodos *in vitro* han demostrado que los polifenoles son efectivos como antioxidantes, sin embargo los estudios *in vivo* arrojan resultados no concluyentes. Existe mucha controversia acerca del mecanismo de acción de estos antioxidantes, debido a que se ha encontrado que se absorben en pequeña cantidad, y que, durante este proceso de absorción, sufren transformaciones estructurales por diversas rutas metabólicas tales como sulfonaciones y glucuronaciones, que pueden afectar su capacidad antiradical. Por ello se ha propuesto que, además de su capacidad antioxidante los compuestos polifenólicos deben poseer otros mecanismos de acción que expliquen sus diversos efectos benéficos. Algunos de estos mecanismos complementarios incluyen regulación de la expresión de determinados genes, regulación de la inflamación, etc. (Gallo *et al.*, 2010; Mercado-Mercado, 2013).

Cuadro 1. Actividad antioxidante en extractos de flor de colorín (*Erythrina americana* Miller).

	ABTS ⁺		DPPH	
	% Inhibición	TEAC*	*(ARA%)	*TEAC
EMP	83.71 ± 1.25 ^a	81.38 ± 4.78 ^a	67.08 ± 0.05 ^a	103.78 ± 1.24 ^a
EAP	27.507 ± 0.99 ^d	25.88 ± 1.11 ^d	13.06 ± 1.64 ^d	21.91 ± 0.39 ^d
EMPi	47.66 ± 0.62 ^c	44.44 ± 1.03 ^c	43.3 ± 0.5 ^c	53.64 ± 0.64 ^c
EMC	76.67 ± 1.34 ^b	74.03 ± 1.66 ^b	54.28 ± 0.59 ^b	61.28 ± 0.67 ^b

EMP: extracto metanólico de pétalo, EAP: extracto acuoso de pétalo, EMPi: extracto metanólico de pistilo, EMC: extracto metanólico de cáliz. *ARA: Actividad antiradical. *TEAC: Capacidad antioxidante expresada en mM Eq Trolox / g muestra.

Los resultados muestran la media de tres experimentos independientes ± EE.

Las diferentes letras en cada columna indican diferencia significativa (Tukey test, $\alpha = 0.05$).

7. CONCLUSIONES

1. Los extractos *Erythrina americana* Miller poseen un efecto inhibitorio bajo sobre *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Micrococcus luteus* y *Listeria monocytogenes* dada su naturaleza de extracto crudo. Sin embargo los resultados indican que los extractos de *Erythrina americana* Miller tienen un mejor efecto inhibitorio sobre bacterias Gram positivas que puede ser atribuido a las diferencias estructurales que posee en relación a las bacterias Gram negativas.
2. Las partes externas de la flor de colorín (*Erythrina americana* Miller) poseen mayor cantidad de compuestos fenólicos, sin embargo la presencia de estos no determina completamente el efecto antimicrobiano debido a la naturaleza del extracto.
3. La alta actividad antioxidante determinada en los extractos puede estar estrechamente ligada a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en las diferentes partes vegetales.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas, J.A.**, Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I., Dewhirst, F.E. 2005. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43:5721-5732.
- Apak, R.**, Güclü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Celik, S.E., Bektasoglu, B., Berker, K.I., Özyurt, D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12: 1496-1547.
- Arévalo, A. M.**, Enciso, R. A. 1996. Determinación de la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) de algunas especies de *Espeletias* encontradas en el páramo de Guasca. Carrera Bacteriología, Facultad de Ciencias Básicas. Departamento Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de pregrado. Colombia.
- Atchison, E.** 1947 Studies in the Leguminosae I. Chromosome number in *Erythrina* L. *American Journal of Botany*, 34(8):407-414.
- Ávalos- García, A.**, Pérez- Urria Carril E., 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal*, 2(3): 119-145.
- Avellaneda, M.J.M.** 2000. Estudios de la resistencia a los antibacterianos en el centro médico naval de Enero a Diciembre del 2000. Tesis UNMSM.
- Bakirel, T.**, Bakirel, U., Keles, O.Ü., Günes-Ülgen, S., Yardibi, H. 2008. *In vivo* assessment of antidiabetic and antioxidant activities of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 116: 64-73.
- Barneche, S.**, Bertucci, A., Haretche, F., Olivaro, C., Cerdeiras, M.P., Vázquez, A. 2010. Prospección química y microbiológica del bosque de galería del río Uruguay. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(6): 878-885.
- Bazalar, V.D.**, Choquesillo, P.F., Milla, F.H., Herrera, C. O., Félix, V.M. 1998. Acción inhibitoria de los extractos acuosos de *Erythroxylium novogranatense* (Morris) Var *truxyllense* (Rusby) y *Plantago major* L., frente a bacterias y hongos. *Ciencia Investigacion*. 1(2): 111-5.
- Boiero, M. L.**, González-Estevez, V., Moyano, S., Montenegro, M. 2008. Capacidad Antimicrobina de Carotenoides Puros y Microencapsulados en Polímeros Comestibles. Tesis de doctorado. Departamento de Química y Microbiología.

- Brand-Williams, W.**, Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *Wiss Technology*, 28: 25-30.
- Bunalema, L.**, Kirimuhuzya, C., Tabuti, J., Waako, P., Magadula, J.J., Otieno, N., Orodho, J., Okemo, P. 2011. The efficacy of the crude root bark extracts of *Erythrina abyssinica* on Rifampicin Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *African Health Sciences*, 11 (4): 897-903.
- Cárcamo, O.**, Oliva, M., González, C. 2011. Efectividad antimicrobiana del colutorio de *Matricaria recutita*, enfuncionarios de la Facultad de Odontología de la Universidad del Desarrollo, Chile. *International Journal Odontostomatology*, 5(2):179-184.
- Cardador-Martínez, A.**, Castaño-Tostado, E., Loarca-Piña, G. 2002. Antimutagenic activity of natural phenolic compounds in the common bean (*PhaseolusVulgaris*) against aflatoxinB1. *Food Additives and Contaminants*, 19(1): 62–69.
- Chacha, M. G.**, Bojase, M. R., R. T. Majinda. 2005. Antimicrobial and radical scavenging flavonoids from the stem wood of *Erythrina latissima*. *Phytochemistry*, 66:99-104.
- Celum, CL.**, Chaisson, RE., Rutherford, GW., Barnhart, J.L., Echenberg, D.F. 1987. Incidence of salmonellosis in patients with AIDS. *Journal Infection Disease*, 156:998-1002.
- Çetkovic, G.S.**, Djilas, S.M., Canadanovic-Brunet, J.M., Tumbas, V.T. 2004. Antioxidant properties of marigold extracts. *Food Research International*, 37: 643-630.
- Chambers, H.F.** 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. *Emergency Infection Disease*, 7:178-82.
- CONAGUA.** 2011. Situación del subsector de agua potable, alcantarillado y saneamiento.
- Conner, D.E.** 1993. Naturally occurring compounds in “Antimicrobials in foods” 2a.Edition.P.M.Davidson and A.L Branen. Marcel Dekker. New York. 263-305.
- Cowan, M.M.** 1999. Plant products as anti-microbial agents. *Clinical Microbiology*, 12: 564-82.
- Cos, P.**, L. Maes, A. Vlietinck, L. Pieters. 2008. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection – an update (1998 – 2007). *Planta Médica*, 1323-1337.

- Cravioto, A.,** Vasquez, V. 1988. *Escherichia coli*: pathogenic mechanisms and enterohemorrhagic strains. *Biomedical research at the Hospital Infantil de México*, 45(3):196-197.
- Cuéllar-Cuéllar, A.,** Rojas Hernández, N. 2011. Antimicrobial potenciality of gossypitrine isolated from the flowers of *Talipariti elatum* s.w and some pharmacognostic studies of the flowers. *Revista Colombiana de Ciencia*, 3(1).
- De Boer, HJ.,** Kool, A., Broberg, A., Mziray, W.R., Hedberg, I., Levenfors, J.J. 2005. Antifungal and antibacterial activity of some herbal remedies. *Journal Ethnopharmacology*, 96:461-469.
- Domingo, D.,** López- Brea, M. 2003. Plantas con actividad antimicrobiana. *Revista Especializada de Quimioterapia*, 16(4): 385-393.
- Donnenberg, M.S.,** Kaper, J.B., Finlay, B.B. 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiology*, 5(3):109-114.
- Desoet, J.J.,** Holbrook, W.P., Vanamerongen, W.E. Schipper, E., Homburg, C.H.E., Degraaff, J. 1990. Prevalence of *Streptococcus-Sobrinus* in Relation to Dental-Caries in Children from Iceland and the Netherlands. *Journal of dentistry for children*, 57: 337-342.
- Kaper, J.B.,** Nataro, J.P., Mobley, H.L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Microbiology*, 2(2):123-140.
- Kanafani, Z.A.,** Fowler, V.G. 2006. *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24:182-93.
- Karimi, E.,** Oskoueian, E., Hendra, R., Jaafar, H.Z.E. 2010. Evaluation of *Crocus sativus* L. Stigma phenolic and flavonoid compounds and its antioxidant activity. *Molecules*, 15: 6244-6256.
- Krauss, H.,** Weber, A., Appel, M., Enders, B., Graevenitz, A. V., Isenberg, H., Schiefer, H.G., Slenczka, W., Zahner, H. 2003. Zoonoses. *Infectious Diseases Transmissible from Animals to Humans*, 3^a ed. ASM Press, American Society for Microbiology.
- Krukoff, B.,** Barneby. 1974. Conspectus of the species of the genus *Erythrina Lloydia*, 37: 332-459.
- Falleh, H.,** Ksouri, R., Chaieb, K., Karray-Bouraoui, N., Trabelsi, N., Bloulaaba, M., Abdelly, C. 2008. Phenolic composition of *Cyanara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *Comptes Rendus Biologies*, 331: 371-379.

- Feregrino, Pérez.** 2008. Composition and Chemopreventive Effect of Polysaccharides from Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) on Azoxymethane-Induced Colon Cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:8737–8744.
- Floegel, A.,** Kim, D.O., Chung, S.J., Koo, S.I., Chun, O.K. 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (7): 1043-1048.
- Foster, T.** 2006. *Staphylococcus*. Medical Microbiology. 4a ed. [online] [Cited 2006 August 20]. Available from: URL: <http://gsbs.utmb.edu/microbook>.
- Fukumoto, L. R.,** Mazza, G. 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 3597-3604.
- Gallo, M.,** Ferracane, R., Graziani, G., Rittieni, A., Fogliano, V. 2010. Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices. *Molecules*, 15: 6365-6374.
- García, D.** 2004 Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, 27:1123-29.
- García-Mateos, M. R.,** Garín-Aguilar, M. E., Soto Hernández, M., Martínez Vazquez, M. 2000. Effect of β -erythroidine and dihidro- β -erythroidine from *Erythrina americana* on rats aggressive behaviour. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 10: 34-37.
- García- Mateos, M. R.,** Soto, H., Vibrans, H. 2001. *Erythrina americana* Miller ("Colorín"; Fabaceae), a versatile resource from Mexico. *Economic Botany*, 55(3): 391-400.
- Garín, A,** Ramirez L, M. Soto, G. Valencia Del T, M. Martínez V. 2000.Effect of crude extracts of *Erythrina americana* Miller on aggressive behavior in rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 69:189-196.
- Howe, R.A.,** Brown, N.M., Spencer, R.C. 1996. The new threats of Gram positive pathogens: re-emergence of things past. *Journal Clinical Pathology*, 49:444-449.
- Ibarra, E.,** Téllez, M., Soto, H., Martínez, V., García M., San Miguel Ch. 2009. Actividad antimicótica *in vitro* de erisovina. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4):327-330.

- Ibarra, E.**, Pacheco, M., García M., Rubén San Miguel Ch, Ramírez, V., R. Soto, H. 2011. Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 34 (4): 241-246.
- Ikigai, H.**, Nakae, T., Hara, Y., Shimamura, T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1147:132-136.
- Katsura, K.**, Kawasaki, H., Potacharoen, W., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. & Komagata, K. 2001. *Asaia siamensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *International Journal System Evolution Microbiology*, 51:559–563.
- Lagu, C.**, Kayanja, I.B.F. 2012. *In Vitro* Antimicrobial Activity of Crude Extracts of *Erythrina abyssinica* and *Capsicum annum* in Poultry Diseases Control in the South Western Agro-Ecological Zone of Uganda. *A Bird's-Eye View of Veterinary Medicine*. Available from: <http://www.intechopen.com/books/a-bird-s-eye-view-of-veterinary-medicine/in-vitroantimicrobial-activity-of-crude-extracts-of-erythrina-abyssinica-and-capsicum-annum-in-poul>
- León-Ramírez, S.** 2002. Shigelosis (disentería bacilar). *Salud en Tabasco*, 8: 22-25.
- Lizcano, R.A.**, Vergara-González, J. 2008. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata*. Tesis de Microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Colombia.
- Loarca-Piña, G.**, Mendoza, S., Ramos-Gómez, M., Reynoso, R. 2010. Antioxidant, antimutagenic, and antidiabetic activities of edible leaves from *Cnidoscolus chayamansa* Mc. Vaugh. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72 (2): H68-H72.
- Loesche, W.J.** 1986. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 50: 353-380.
- López, J.**, Prast, G. 2006. Infecciones por enterobacterias patógenas primarias. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Madrid: Editorial Médica Panamericana. 329-332.
- López-Martínez, L.X.**, García-Galindo, H. S. 2009. Actividad antioxidante de extractos metanólicos y acuosos de distintas variedades de maíz mexicano. *Nova Scientia*, 2: 51-65.

- Lozoya, X.,** Lozoya, M. 1982. Flora Medicinal de México. 1. Plantas Indígenas, Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS. D.F., México. 309.
- Marsh, P.D.** 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology-Sgm*, 149: 279-294.
- Martínez-Flórez, S.,** González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón. M^a. J. 2002. Flavonoids: Properties and antioxidizing action. *Nutrición Hospitalaria*, 17:271-278.
- Mayooran, B.,** Robin, S., John, R.T. 2000. Dental caries is a preventable infectious disease. *Australian Dental Journal*, 45: 235-245.
- McGowan, J.E.** 2001. Impacto económico de la resistencia a los antimicrobianos. *Emerging Infection Disease*, 7:286-292.
- Mercado-Mercado, G.** 2011. Tesis de maestría: Determinación de la capacidad antioxidante de extracto de mole, achiote y chile pasilla y su efecto protector frente a la peroxidación lipídica de carne de cerdo.120.
- Mercado-Mercado, G.,** De la Rosa Carrillo, L., Wall-Medrano, A., López-Díaz, J.A., Álvarez-Parrilla, E. 2013. Polyphenolic compounds and antioxidant capacity of typically consumed species in Mexico. *Nutrición Hospitalaria*, 28:36-46.
- Miller, SI.,** Pegues DA. 2002. Especies de *salmonella*, incluida *Salmonella typhi*. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 5^a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana. 2846-2869.
- Miskovsky, P.** 2002. Hypericin, a new antiviral and antitumor photosensitizer: Mechanism of action and interaction with biological macromolecules. *Current Drug Targets*, 3:55-84.
- Mitscher, L.A.,** Okwute, S.K. Gollapudi, S.R., Drake, S., Avona, E. 1988. Antimicrobial Ptercarpans of Nigerian *Erythrina mildbraedlii*. *Phytochemistry*, 27: 3449-3452
- Modarresi-Chahardehi, A.,** D. Ibrahim, S., Fariza-Sulai, M. 2010. Antioxidant, antimicrobial activity and toxicity test of *Pilea microphylla*. *International Journal of Microbiology*, 2:1-6.
- Morales- Cabrera M.** 2011. Actividad antimicrobiana y caracterización fenólica de extractos de cálices de Jamaica (*Hibicus sabdariffa L.*). Tesis de maestría en ciencias. Colegio de Postgraduados. Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas. México.

- Muñoz-Cano, G.** 2007. Actividad sobre el crecimiento antimicrobiano del extracto etanólico de los cultivos de células en suspensión de dos especies de Fouquieriaceas: *Fouquieria ficulnata* y *Fouquieria splendens* sp. *Breviflora*. México: ENCB-IPN. 23-29.
- Murray, P.,** Rosenthal, K., Pfaller, M., 2009. *Microbiología Médica*. Madrid: MMVI Elsevier España, S.A.
- Naik, G. H.,** K. I. Priyadarsini., J. G. Satav., M. M. Banavalikar, D. P. Sohoni, M. K. Biyani, H. Mohan. 2003. Comparative antioxidant activity of individual herbal components used in Ayurvedic medicine. *Phytochemistry*, 63:97-104.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report,** data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. *American Journal Infections Control*, 32:470-485.
- Neill, D. A.** 1988. Experimental studies on species relationships in *Erythrina* (Leguminosae; Papilionoidae), *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 75: 886-969.
- Neill, D. A.** 1993. The genus *Erythrina*: taxonomy, distribution and ecological differentiation, Nitrogen fixing tree association, *Erythrina* in the new and old worlds, NFTA, Hawaii.
- Nenadis, N.,** Wang, L.F., Tsimidou, M., Zhang, H.Y. 2004. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using the ABTS assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 4669-4674.
- Nychas, J.** 1995. Natural antimicrobials from plants. New methods of food preservation. *Chapman & Hall*, 59-89.
- Olusola, O.O.,** Jide, A. A. 2012. *In Vitro* Antibacterial and Time-Kill Evaluation of the *Erythrina caffra* Thunb. Extract against Bacteria Associated with Diarrhoea. *The Scientific World Journal*, 10:1100-1108.
- Oomah, B. D.,** Cardador-Martínez, A. Loarca-Piña, G. 2005. Phenolics and antioxidative activities in common beans (*Phaseolus Vulgaris* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 935–942.
- Paganini, H.** 2007. Infecciones por *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente proveniente de la comunidad: un nuevo desafío para los pediatras. *Medicina Infantil*, 292-95.
- Paniagua, G.L.,** Monroy, E., García-González, O., Alonso, J., Negrete, E., Vaca, S. 2007. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children". *Annals Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 6: 1-8.

- Pérez-Jiménez, J.**, Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goni, I., Saura-Calixto, F., 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41:274–285.
- Poungoué-Kaatou, G.P.** 2006. Antioxidant activity and total phenolic content of ingenious *Salvia* species an investigation of their pharmacological activities. *Phytochemistry*, 74-90.
- Rao, L. J. M.**, K. Ramalaksmi, B. B. Borse, B. Raghavan. 2007. Antioxidant and radical-scavenging carbazole alkaloids from the oleoresin of curry leaf (*Murraya koenigii* Spreng.). *Food Chemistry*, 100:742-747.
- Ruiloba, S.**, Ortigoza-Ferado, J. 2005. Manual de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México: IPN. 169-172.
- Rodríguez, D.A.**, Sanabria, M.E. 2005. Efecto del Extracto de Tres Plantas Silvestres sobre la Rizoctoniosis, la Mancha Sureña del Maíz y los Patógenos que la Causan. *Revista Interciencia*, 30(12): 739-744.
- Rukachaisirikula, T.**, Innoka, P., Aroonrerkb, N., Boonamnuaylapa, W., Limrangsun, S., Boonyona, C., Woonjinaa, U., Suksamrarna, A. 2007. *Antibacterial Pterocarpanes from Erythrina subumbrans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 110: 171–175.
- Ryan, C.A.**, Hargrett-Bean, N.T., Blake, P.A. 1989. *Salmonella typhi* infections in the United States, 1975-1984: increasing role of foreign travel. *Infection Disease*, 11:1-8.
- Salazar-Aranda, R.**, De la Torre- Rodriguez, Y.C., Alanis- Garza, B.A., Pérez-López, L.A., Waksman de Torres N. 2009. Evaluation of the biological activity of herbal products business, *University Medical*, 11(44):156--164.
- Sasikumar, J.M.**, Assevatham, S.B., Kumar, D. 2012. Studies *in vitro* free radical scavenging activity of *Bixa orellana* L. bark extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4 (2): 719-726.
- Sato, M.**, Tanaka, H., Fujiwara, S., Hirata, M., Yamaguchi, R., Etoh, H., Tokuda, C. 2006. Antibacterial property of isoflavonoids isolated from species *Erythrina* against cariogenic oral bacteria. *Phytomedicine*, 9: 427-433.
- Sepúlveda, J. et al.** 2007. Aumento de la sobrepeso en menores de cinco años en México: La estrategia diagonal. *Salud Pública de México*, 49.
- Shalini, Srivastava R.** 2009. Antifungal activity screening and HPLC analysis of crude extracts from *Tectona grandis*, *Shilajit*, *Valeriana wallachi*. *Electronic J. Environ. Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 8: 218-229.

- Shopsin, B.**, Kreiswirth, B.N. 2001. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infection Disease*, 7:323-6.
- Singleton, V.I.**, Orthofer, R., Lamuela R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymology*, 299: 152-178.
- Soon-Park, J.**, Chew, B.P., Wong, T.S.1998. Dietary lutein absorption from Marigold extract is rapid in BALB/c mice. *Journal of Nutrition*, 128: 1802-1806.
- Sotelo, A.**, Argote, R.M., Moreno, R. I., Flores, N. I., Díaz, M. 2003. Nutritive Evaluation of the Seed, Germinated Seed, and String Bean of *Erythrina americana* and the Detoxification of the Material by Boiling. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51:2821-2825.
- Sulca-Vilamarín, T.** 2010. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *Acmella repens* (Botoncillo), *Urtica dioica* (Ortiga negra) y *Sonchus oleraceus* (Kana yuyo) plantas registradas en la parroquia la Esperanza- Imbabura, sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Candida albicans*, causantes de enfermedades bucofaringeas. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército. Ecuador.
- Tanzer, J.M.**, Livingston, J., Thompson, A.M. 2001. The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of Dental Education*, 65: 1028-1037.
- Togola, A.**, Austarheim, I., Theis, A., Diallo, D., Smestad, B. 2008. Ethnopharmacological uses of *Erythrina senegalensis* a comparison of three áreas in Mali and a link between traditional knowledge and modern biological science. *Journal Ethnobiology Ethnomedic*: 4: 6.
- Torroba, L.**, Rivero, M., Otermin, L., Gil, A., Iruin., Maravi-Poma, E., García- Irure, J.J., 2007. Resistencia antimicrobiana y política de antibióticos: MRSA, GISA y VRE. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 23.
- Van Houte, J.**, G. Gibbs, C. Butera, 1982. Oral flora of children with "nursing bottle caries". *Journal Dental Reserch*, 61(2): 382-5.83.
- Velázquez-Meza, M. E.** 2005. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Salud Pública México*, 47:381-7.
- Vila, J.**, Álvarez-Martínez, M.J., Buesa, J., Castillo, J. 2009. Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27: 406-411.

- Vuorela, P.**, Leinonen, M., Saikku, P., Tammela, P., Rauha, J.P., Wennberg, T. 2004. Natural products in the process of finding new drug candidates. *Current Medicinal Chemistry*, 11(11):1375-1389.
- Wiater, A.**, Choma, A., Szczodrak, J. 1999. Insoluble glucans synthesized by cariogenic streptococci a structural study. *Journal of Basic Microbiology*, 39: 265-273.
- Winfield, M. D.**, Groisman, E. A. 2003. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7):3687-3694.
- WOH, 2009.** Consultado en: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2009/childhood_deaths_diarrhoea_20091014/es/index.html
- WOH, 2014.** Consultado en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- Zabala, C.** 2002. Farmacología de los Antimicrobianos. <http://www.umss.edu.bo/epubs/etexts/downloads/30.pdf>.
- Zampini, I. C.**, Cudmani, N., Isla, M.I. 2007. Antimicrobial activity of Argentine medicinal plants on antibiotic-resistant bacteria. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41 (3): 385-93.
- Zero, D.T.** 2004. Sugars - The arch criminal? *Caries Reserch*, 38: 277-285.

9. ANEXOS

**NMX-BB-040-SCFI-1999
MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS - DETERMINACIÓN DE
LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS
GERMICIDAS**

**GENERAL METHODS FOR ANALYSIS - ANTIMICROBIAL
ACTIVITY DETERMINATION TO GERMICIDAL
PRODUCTS**



PREFACIO

En la elaboración de la presente norma mexicana participaron las siguientes empresas e Instituciones:

- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA DE TRANSFORMACIÓN
- CÁMARA NACIONAL DE LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA
Sección PAPS.
- COMITÉ TÉCNICO DE NORMALIZACIÓN NACIONAL DE INSUMOS PARA LA SALUD
- INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS TRABAJADORES DEL ESTADO
Departamento de Control de Calidad.
- INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
Unidad de Control Técnico de Insumos.- Area de Materiales Diversos.
- INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.- Departamento de Farmacia.
- PROCURADURÍA FEDERAL DEL CONSUMIDOR
- SECRETARÍA DE SALUD
Dirección General de Insumos para la Salud.- Subdirección de Farmacopea, Farmacovigilancia y Normas.
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco.

NMX-BB-040-SCFI-1999**MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS - DETERMINACIÓN DE LA
ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PRODUCTOS
GERMICIDAS****GENERAL METHODS FOR ANALYSIS - ANTIMICROBIAL
ACTIVITY DETERMINATION TO GERMICIDAL
PRODUCTS****1 OBJETIVO Y CAMPO DE APLICACIÓN****1.1 Objetivo**

Esta norma mexicana establece el método de prueba para determinar la actividad antimicrobiana.

1.2 Campo de aplicación

Esta norma mexicana es aplicable a los productos germicidas, siempre y cuando la norma específica del producto así lo indique.

2 REFERENCIAS

Para la correcta aplicación de la presente norma se debe consultar la siguiente norma oficial mexicana y normas mexicanas vigentes o las que las sustituyan:

- | | |
|-------------------|---|
| NOM-092-SSA1-1994 | Bienes y servicios, método para la cuenta de bacterias aerobias en placa, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 12 de diciembre de 1995. |
| NMX-Z-012/1-1987 | Muestreo para la Inspección por atributos - Parte 1: Información general y aplicaciones. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de octubre de 1987. |



SECRETARÍA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-BB-040-SCFI-1999
2/9

- NMX-Z-012/2-1987 Muestreo para la Inspección por atributos - Parte 2: Métodos de muestreo, tablas y gráficas. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 28 de octubre de 1987.
- NMX-Z-012/3-1987 Muestreo para la Inspección por atributos - Parte 3: Regla de cálculo para determinación de planes de muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 31 de julio de 1987.

3 DEFINICIONES

Para los propósitos de esta norma se establecen las siguientes definiciones:

3.1 Actividad antimicrobiana

Propiedad que tiene una sustancia de inhibir o matar a los microorganismos.

3.2 Germicidas

Productos químicos que destruyen una amplia gama de microorganismos sobre superficies o tejidos.

3.3 UFC

Unidad formadora de colonia, presuponiendo que cada célula da lugar al desarrollo de una colonia.

4 SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Para los propósitos de esta norma se establecen los siguientes símbolos y abreviaturas:

M	molaridad de una solución;
N	normalidad de una solución;
K	grados absolutos o grados Kelvin;
°C	grados centígrados o grados Celsius;
mL	mililitros;
L	litro;
g	gramos;
pH	concentración de iones hidrógeno;
mm	milímetros;



SECRETARÍA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-BB-040-SCFI-1999
3/9

h	horas;
%	por ciento;
S	células sobrevivientes;
CV	cuenta viable inicial;
UFC/mL	unidades formadoras de colonias por mililitro;
ATCC	colección de cultivos tipo americanos (American Type Culture Collection), y
MGA	método general de análisis de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

5 MUESTREO

5.1 Inspección de recepción

Para verificar la actividad antimicrobiana de un producto germicida el muestreo debe realizarse de acuerdo a lo especificado en las normas mexicanas NMX-Z-012/1, NMX-Z-012/2 y NMX-Z-012/3 (ver 2 Referencias).

5.2 Selección de la muestra

Para el análisis de laboratorio y retención de muestra, seleccionar al azar una submuestra representativa del producto a analizar, de un mismo proveedor y número de lote.

6 FUNDAMENTO

Para la determinación de la actividad antimicrobiana, se establece un solo método, éste se basa en determinar el porcentaje de reducción de un número determinado de microorganismos, cuando se ponen en contacto con un germicida, bajo condiciones de prueba específicas.

7 REACTIVOS

Los disolventes y reactivos deben ser grado reactivo, a menos que se indique otra pureza, así como el agua empleada debe ser recientemente destilada, a menos que se indique otra pureza.

Las soluciones volumétricas deben prepararse de acuerdo a lo indicado en el MGA 0851 soluciones volumétricas de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (ver 13 Apéndice normativo).



SECRETARÍA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-BB-040-SCFI-1999

4/9

- Agar nutritivo;
- Agar para método estándar;
- Agar para método estándar con neutralizante ;
- Azolectina (lecitina de soya);
- Fosfato monobásico de potasio;
- Medios de cultivo;
- Medios de cultivo, reactivos, soluciones y microorganismos;
- Polisorbato 80;
- Solución amortiguadora de fosfatos 0,25 M;
- Solución neutralizante concentrada;
- Solución volumétrica de ácido clorhídrico 1 N, y
- Solución volumétrica de hidróxido de sodio 1 N.

7.1 Preparación de las soluciones

- Solución amortiguadora de fosfatos 0,25 M

En un matraz volumétrico de 1 000 mL, disolver 34 g de fosfato monobásico de potasio en 500 mL de agua, ajustar el pH entre 7,1 y 7,3 con la solución de hidróxido de sodio, aforar con agua, mezclar y distribuir en porciones de 100 mL.

Esterilizar en autoclave a 394 K (121°C) durante 15 min, dejar enfriar y conservar en refrigeración.

- Solución amortiguadora de fosfatos diluida

Colocar 1,25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0,25 M en un matraz volumétrico de 1 L y llevar a volumen con agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 mL y 99 mL, en tubos y matraces, respectivamente, esterilizar en autoclave a 394 K (121° C) durante 15 min.

- Solución neutralizante concentrada

Mezclar 40 g de azolectina, con 280 mL de polisorbato 80 mL y 1,25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos, diluir con agua hasta obtener un volumen final de un 1 L; ajustar el pH a 7,2 con la solución volumétrica de hidróxido de sodio o la solución volumétrica de ácido clorhídrico, distribuir en porciones de 100 mL. Esterilizar en autoclave a 394 K (121°C) durante 20 min.



SECRETARÍA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-BB-040-SCFI-1999

5/9

- Solución neutralizante diluida

Mezclar 100 mL de la solución neutralizante concentrada con 25 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 0,25 M, adicionar 1 675 mL de agua, mezclar y distribuir en porciones de 9 mL en tubos con rosca de 20 mm x 150 mm. Esterilizar en autoclave a 394 K (121°C) durante 20 min.

7.2 Preparación de los medios de cultivo

Preparar y esterilizar los medios de cultivo de acuerdo a las Instrucciones marcadas por el fabricante en la etiqueta del producto. Para el caso del medio de cultivo agar para método estándar con neutralizante, antes de esterilizar, adicionar a un litro del medio de cultivo agar para método estándar, 25 mL de la solución neutralizante concentrada.

7.2.1 Caldo neutralizante

Mezclar los componentes que se indican en la tabla 1, calentar hasta disolución, ajustar el pH a 7,2, distribuir y esterilizar en el autoclave a 394 K (121°C) durante 15 min.

TABLA 1.- Componentes del caldo neutralizante

Triptona	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Dextrosa	10,0 g
Tioglicolato de sodio	1,0 g
Tiosulfato de sodio	6,0 g
Bisulfito de sodio	2,5 g
Polisorbato 80	5,0 g
Lecitina de soya	7,0 g
Púrpura de bromocresol	0,02 g
Agua destilada	1 L

7.3 Microorganismos de prueba

Staphylococcus aureus	A T C C	6 538
Escherichia coli	A T C C	11 229



SECRETARÍA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-BB-040-SCFI-1999
6/9

8 APARATOS

- Espectrofotómetro de luz visible y
- El usual de laboratorio de microbiología.

NOTA- El material de vidrio utilizado debe ser vidrio borosilicato de bajo coeficiente de expansión térmica, el que entre en contacto con la muestra, debe ser estéril.

9 PREPARACIÓN Y ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

9.1 Conservación de los microorganismos de prueba

Conservar las cepas de microorganismos resebrándolas semanalmente en tubos con medio de cultivo inclinado (7 mL de agar nutritivo), de 16 mm x 125 mm, incubados de 20 h a 24 h a una temperatura de 308 K a 310 K (35°C a 37°C) y mantenerlos posteriormente en refrigeración.

9.2 Preparación de la suspensión de los microorganismos de prueba

Antes de realizar la prueba, efectuar dos resebramientos de cada uno de los microorganismos de prueba e incubar de 20 h a 24 h a una temperatura de 308 K a 310 K (35°C a 37°C).

A partir de estos cultivos, resebrar cada uno de los microorganismos de prueba, en tubos de 22 mm x 175 mm que contengan cada uno 12 mL de agar nutritivo inclinado e incubar en las condiciones señaladas.

Remover el crecimiento de cada tubo, con 3 mL de solución salina, transferir el sobrenadante a un tubo de ensayo estéril y continuar diluyendo con la misma solución hasta obtener una suspensión que leída a una longitud de onda de 580 nm, dé una lectura entre 3 % y 5 % de transmitancia.

Determinar en la suspensión el número de UFC / mL y precisar el por ciento de transmitancia de una suspensión que contenga de 75 a 125 X 10⁸ UFC / mL. Lo anterior se verifica de acuerdo a lo indicado en la norma oficial mexicana NOM-092-SSA1 (ver 2 Referencias) y considerar estos valores para análisis futuros.

9.3 Determinación de la cuenta viable inicial

A un matraz Erlenmeyer que contenga 99 mL de la solución amortiguadora de fosfatos diluida estéril, transferir 1 mL de la suspensión de los microorganismos de prueba y efectuar las diluciones decimales necesarias para obtener placas que contengan cada una entre 25 y 250 colonias.

Colocar en cajas de petri estériles, por duplicado 1 mL de cada dilución, agregar a cada placa de 15 mL a 18 mL de agar para métodos estándar, homogeneizar y dejar solidificar Invertir las cajas de petri e Incubar durante 48 h a 303 K - 308 K (30°C - 35°C). Contar las colonias contenidas en cada una de las cajas, en un cuenta colonias.

10 PROCEDIMIENTO

10.1 Determinación de las células sobrevivientes

10.2 Preparación de la muestra

Si es necesario, efectuar la dilución pertinente con agua para llevar el producto a la concentración de uso indicada por el fabricante en la etiqueta del envase.

10.3 Inoculación de la muestra

Para cada uno de los microorganismos de prueba, medir exactamente y por duplicado 99 mL del producto o su dilución, transferir a matraces Erlenmeyer de 250 mL con tapón de rosca estériles.

Agitar los matraces, suspender la agitación, justamente antes de la inoculación, para que en el momento de la misma, aún exista movimiento residual del líquido y así facilitar la incorporación del inóculo. Inocular en forma individual cada matraz con cada uno de los microorganismos de prueba en el centro de la superficie del líquido, evitando tocar con la pipeta, el cuello o las paredes del matraz.

Agitar el matraz con la muestra inoculada y exactamente 30 s después de la inoculación, transferir 1 mL de la misma, a un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de la solución neutralizante diluida o del caldo neutralizante, mezclar y transferir por duplicado alícuotas de 1,0 mL a cajas de petri estériles y continuar diluyendo hasta tener las diluciones necesarias para obtener placas que contengan de 25 a 250 colonias, agregar a cada placa de 15 mL a 18 mL del medio agar para métodos estándar con neutralizante, homogeneizar, permitir que solidifique, Invertir las placas e Incubar durante 48 h entre 308 K a 310 K (35°C a 37°C). Después del periodo de incubación, contar el número de UFC en las placas.

11 EXPRESIÓN DE RESULTADOS

11.1 Determinación del % de reducción

Promediar los resultados de las placas de la cuenta viable inicial y de las células sobrevivientes y calcular el % de reducción mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = 100 - \frac{S \times 100}{C.V.}$$

donde:

S son las células sobrevivientes UFC / mL, y
C.V. es la cuenta viable inicial.

Informar el porcentaje de reducción obtenido en la muestra del producto.

11.2 Interpretación de resultados

Un producto etiquetado como germicida, debe tener un por ciento de reducción de la cuenta viable de 99,999 % en 30 s de contacto a la concentración de uso recomendada, cuando la cuenta viable inicial se encuentra entre 75 y 125 X 10⁸ UFC / mL.

12 INFORME DE LA PRUEBA

El Informe de la prueba debe incluir lo siguiente:

- Referencia a esta norma;
- Resultado de la prueba;
- Cualquier Incidente que pueda influir el resultado de la prueba;
- Fecha de la prueba, y
- Nombre del analista.

13 APÉNDICE NORMATIVO

Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Sexta edición 1994, pp 253 - 264, MGA 0851 Soluciones Volumétricas.



SECRETARÍA DE
COMERCIO Y
FOMENTO INDUSTRIAL
DGN

NMX-BB-040-SCFI-1999

9/9

14 BIBLIOGRAFÍA

NOM-008-SCFI-1993 Sistema General de Unidades de Medida. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de octubre de 1993.

Official Methods of Analysis, 16 Ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, USA, Vol. I, pp 9-11, 1997.

15 CONCORDANCIA CON NORMAS INTERNACIONALES

Esta norma mexicana no equivale a ninguna norma internacional por no existir referencia alguna al momento de su elaboración.

MÉXICO D.F. A,

LA DIRECTORA GENERAL DE NORMAS

CARMEN QUINTANILLA MADERO

JAD\$/LFVO/DLR/LLE/mrg.