



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DE EXTRACTOS DE *Erythrina americana* Miller y
Erythrina coralloides DC. (FABACEAE)**

T E S I S

**Que para obtener el título de
BIÓLOGA**

P R E S E N T A

STEPHANYE MATA GONZÁLEZ

Directora de tesis

Dra. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, Abril de 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Dr. Gustavo Valencia del Toro

VOCAL

M. en C. Emelia Campoy Otero

SECRETARIO

Dra. María Eugenia Garín Aguilar

SUPLENTE

M. en C. Leonor Ana María Abúndiz Bonilla

SUPLENTE

Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacobiología (L-514) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Garín Aguilar y con el apoyo del Programa de Apoyo a Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación (PAPCA 2006-2007 y 2007-2008 FES-Iztacala, UNAM) Proyecto No. 42 y 78; así como por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, UNAM) IN212906-3.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Erythrina americana* Miller y *Erythrina coralloides* DC. (FABACEAE)

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a la UNAM por haberme permitido ser parte de ella desde la preparatoria. Ha sido un gran honor y un privilegio estudiar en la mejor institución de América Latina.

También quiero agradecer a la FES Iztacala que me abrió sus puertas y me dio la oportunidad de estudiar esta hermosa y extraordinaria carrera.

Así mismo debo agradecer y reconocer a los profesores Sergio González Moreno †, Marta Salcedo, José Guadalupe Martínez †, Arnulfo Reyes Mata, Jorge Gersenowies Rodríguez. Que me sorprendieron, me inspiraron, me hicieron sufrir y reír, escucharon mis traumas, mis bromas, compartieron su vida y me brindaron su amistad. Fue para mí un orgullo haber sido su alumna.

A la Dra. Claudia Tzasná Hernández Delgado, la M. en C. Leonor Ana María Abúndiz Bonilla, la M. en C. Emelia Campoy Otero, gracias por sus valiosas aportaciones, las cuales hicieron que este trabajo mejorara notablemente.

A la Dr. María Margarita Canales, por darme la oportunidad de realizar parte de los experimentos en su laboratorio, gracias a usted y sus alumnos por su amabilidad, su tiempo y su apoyo.

Al Dr. Gustavo Valencia, tengo mucho que agradecerle. Primero que todo su amistad, es muy agradable convivir con usted, es una persona muy serena y siempre dispuesta a brindar un poco de su tiempo. Gracias por su gran ayuda con sugerencias, con el material, con el espacio y el tiempo que me dieron usted y sus alumnos en su laboratorio, ya que sin esto no se habría logrado con éxito la parte experimental.

Gracias también a Lety, Angy, Rocío, Diana y Daniel por su ayuda y su amabilidad mientras estuve en UPIBI.

A la Dr. María Eugenia Garín Aguilar, mi tutora, mi consejera, mi amiga. Le agradezco que haya sido tan amable desde el día en que nos conocimos, por haberme aceptado en su laboratorio. Gracias por todo el tiempo que me ha dedicado, por ayudarme y estar al pendiente de mí en cada momento, por la guía en todos los aspectos. Gracias por esas buenas pláticas que siempre me dejaron una lección de vida, por demostrarme que el universo siempre acomoda todo y que lo que tiene que ser será. Sobre todo gracias por el cariño que siempre me ha mostrado.

A mis compañeros del laboratorio, a Ángeles, Josué, Caro, gracias por su compañía, por las risas y los buenos ratos, por su apoyo. A Abraham y a Diego, debo decir que ustedes fueron y espero que siempre sean los mejores amigos, compañeros y cómplices. Gracias por estar conmigo en todo momento, porque nos entendíamos, porque siempre hubo apoyo entre nosotros, porque juntos perdimos el tiempo pero también trabajamos duro juntos. Porque podíamos burlarnos el uno del otro sin sentirnos ofendidos y porque me hicieron reír en los mejores y en los peores momentos. Este logro es mío pero también de ustedes.

A mis compañeros del Grupo 02, mis AMIGOS. Chicos, uuuuuuuuuuuuuuu! que puedo decir: parecían normales cuando los conocí...

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Erythrina americana* Miller y *Erythrina coralloides* DC. (FABACEAE)

Abuelini, Sarai, Bere, Bubu, Gorje, Elena, Canna, Ale, Marco, Abraham, Pao, Güera, Seltzin, Tania, Jair, Memo, “están bien bonitos”. Quien hubiera pensado que de entre tantos personajes en nuestro(s) grupo(s) íbamos a acabar juntos todos nosotros. Debo agradecer y reconocer que hemos pasado tantas cosas, tanto tiempo y seguimos siendo nosotros, más viejos, definitivamente más sabios, pero siempre conservando nuestra esencia. Hemos vivido experiencias inolvidables, extremadamente graciosas, fuimos aprendiendo mucho de cada uno y de nosotros mismos, nos hemos burlado de cada uno hasta no poder más y lo seguiremos haciendo, los adoro!

Gracias a ustedes que hicieron de estos años los más divertidos. Gracias por sus ánimos, este trabajo va por ustedes, con cariño.

Para mis bellos y eternos amigos, Noé, has sido mi amigo tanto tiempo y hemos pasado periodos larguísimos sin vernos pero cada que nos encontramos me sacas más de una carcajada. Siempre me has animado a lograr las mejores cosas. Lau, José, Delia, Juan, Buky, fuimos los compañeros perfectos (orgullosamente CCH Azcapotzalco), vivimos las mejores aventuras, tuvimos el gusto de estar en el inicio de nuestras carreras, hemos madurado a lo largo de estos años y como dijimos alguna vez, somos el equipo perfecto porque somos multidisciplinarios, a ustedes también les dedico este gran logro.

A Carlos, gracias por todo el tiempo juntos, por tu apoyo en cada momento, por hacerme feliz, por hacerme sentir bien, por esas desveladas en las que me has acompañado. Por tu amor, por esos buenos ejemplos, por la inspiración que siento al verte lograr tantas cosas y los ánimos para seguir adelante. Porque este trabajo no solo es mío, también tiene mucho de ti.

A mi familia, que es sinónimo de alegría y las mejores platicas. Hemos pasado juntos muchos logros y hoy me toca a mí llegar al final de una etapa. Gracias por estar al pendiente de mi vida y gracias por esas palabras de apoyo y el cariño que compartimos. A Elena, a Vicente, a Apolonio, a Amada y a Mamá Belén (siempre en mis recuerdos) por haberme dado esta familia tan maravillosa.

A mis bebés de cuatro patas, a Gupi, la más hermosa de las flores del jardín, gracias.

A Oscar, Francisca, Hellen y Cristian. Todos los pasos en mi vida siempre han sido por ustedes y para ustedes. Agradezco que hayan estado conmigo a cada segundo, que siempre me hayan dado un buen consejo, que hayan apoyado y respetado mis decisiones, que siempre me impulsen a ser mejor estudiante y mejor persona. Gracias por hacerme reír hasta llorar cada día y por demostrarme siempre su cariño. Gracias por la paciencia y el ánimo durante todo este tiempo.

No encuentro más palabras para describir lo feliz, orgullosa y agradecida que estoy de tener a cada uno de ustedes en mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. INFECCIONES BACTERIANAS Y SU PREVALENCIA	3
II.1. Defensas del tracto respiratorio y aparato gastrointestinal.....	4
II.2. Clasificación bacteriana estructural.....	4
II.3. Tratamiento de las enfermedades infecciosas.....	6
II.3.1. Mecanismo de acción de los antimicrobianos.....	6
II.4. Resistencia bacteriana.....	6
II.5. Medicina tradicional.....	7
II.5.1. Plantas medicinales y las enfermedades infecciosas.....	8
II.5.2. Distribución del género <i>Erythrina</i>	9
III. ANTECEDENTES	13
IV. HIPÓTESIS	15
V. OBJETIVOS	15
V.1. Objetivos generales.....	15
V.2. Objetivos particulares.....	15
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	16
VI.1. Material vegetal.....	16
VI.2. Preparación de los extractos de diferente polaridad.....	16
VI.3. Obtención de fracciones alcaloideas.....	16
VI.4. Ensayo microbiológico.....	16
VI.4.1. Microorganismos.....	16
VI.4.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	17
VI.4.2.1. Método cualitativo.....	17
VI.4.2.2. Método cuantitativo.....	17
VI.4.3. Evaluación de la actividad antifúngica.....	18
VI.4.3.1. Método cualitativo.....	18

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Erythrina americana* Miller y
Erythrina coralloides DC. (FABACEAE)**

VI.4.3.2. Método cuantitativo.....	19
VI.5. Detección cualitativa de metabolitos secundarios.....	19
VI.6. Cuantificación de flavonoides totales.....	20
VI.7. Análisis estadístico.....	20
VII. RESULTADOS.....	21
VII.1. Rendimiento de extractos.....	21
VII.2. Actividad antibacteriana.....	22
VII.2.1 Método cualitativo.....	22
VII.2.2 Método cuantitativo.....	23
VII.3 Actividad antifúngica.....	25
VII.3.1 Método cualitativo.....	25
VII.3.2 Método cuantitativo.....	26
VII.4. Análisis Preliminar Fitoquímico.....	28
VII.5. Cuantificación de flavonoides totales.....	29
VIII. DISCUSIÓN.....	31
VIII. 1. Rendimiento de los extractos.....	31
VIII. 2. Evaluación de la actividad antibacteriana.....	32
VIII.3. Evaluación de la actividad antifúngica.....	33
IX. CONCLUSIONES.....	39
X. PERSPECTIVAS.....	40
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
APÉNDICES.....	46
Apendice 1.....	46
Apéndice 2.....	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Rendimiento de los extractos obtenidos de <i>E. americana</i> y <i>E. coralloides</i>	21
Cuadro 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos de <i>Erythrina</i>	24
Cuadro 3. Actividad inhibitoria de los extractos de <i>Erythrina</i> sobre el crecimiento micelial de especies de hongos fitopatógenos.....	25
Cuadro 4. CF ₅₀ de extractos acetato de etilo de flores y de tallo de <i>E. americana</i>	28
Cuadro 5. Análisis Preliminar Fitoquímico de los extractos de acetato de etilo de flores y tallo de <i>Erythrina americana</i> y extracto de acetato de etilo de hojas de <i>Erythrina coralloides</i>	29
Cuadro 6. Cuantificación de flavonoides totales de extractos de <i>E. americana</i> y <i>E. coralloides</i>	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	5
Figura 2. Distribución del genero <i>Erythrina</i> en el mundo (Modificado de Neill).....	9
Figura 3. A) Flores, B) hojas y C) semillas de <i>Erythrina americana</i> Miller.....	11
Figura 4. % de inhibición del extracto de acetato de etilo de tallo sobre 4 hongos fitopatógenos. CF ₅₀ : <i>F. oxysporum</i> = 6.63 mg/mL, <i>F. subglutinans</i> = 5.73 mg/mL, <i>Fusarium</i> sp. = 7.01 mg/mL y <i>F. graminearum</i> = 6.44 mg/mL.....	26
Figura 5. % de inhibición del extracto de Acetato de etilo de tallo sobre 4 hongos fitopatógenos. CF ₅₀ : <i>F. oxysporum</i> = 5.55 mg/mL, <i>F. subglutinans</i> = 4.49 mg/mL, <i>Fusarium</i> sp. = 2.94 mg/mL y <i>F. graminearum</i> = 5.92 mg/mL.....	27
Figura 6. Ejemplar de <i>Erythrina americana</i> en Herbario IZTA.....	46
Figura 7. Ejemplar de <i>Erythrina coralloides</i> en Herbario IZTA.....	46
Figura 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto metanólico de tallo de <i>E. americana</i> sobre <i>Fusarium graminearum</i>	47
Figura 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto metanólico de tallo de <i>E. americana</i> sobre <i>Fusarium</i> sp.....	48
Figura 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto metanólico de tallo de <i>E. americana</i> sobre <i>Fusarium graminearum</i>	48
Figura 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto de acetato de etilo de hojas de <i>E. coralloides</i> sobre <i>Fusarium oxysporum</i>	49
Figura 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto de acetato de etilo de hojas <i>E. coralloides</i> sobre <i>Fusarium subglutinans</i>	49
Figura 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto de acetato de etilo de hojas <i>E. coralloides</i> sobre <i>Fusarium</i> sp.....	50
Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto de acetato de etilo de hojas <i>E. coralloides</i> sobre <i>Fusarium graminearum</i>	50

RESUMEN

Las plantas del género *Erythrina* han sido utilizadas por la medicina tradicional en diversas regiones del mundo. En México, específicamente en el Distrito Federal *Erythrina coralloides* y en Veracruz *Erythrina flabelliformis* (originaria de Arizona) se recomiendan para tratar el sarampión. En Sonora, la semilla de *Erythrina flabelliformis* se emplea contra la diarrea y en Baja California Sur, las hojas tostadas se aplican en caso de vaginitis. *Erythrina americana* se usa para atender afecciones de los riñones y el mal de orín. Diferentes metabolitos de varias especies de *Erythrina* entre los que destacan alcaloides y flavonoides. En este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de diferente polaridad obtenidos de hojas, tallos y flores de *Erythrina americana*, así como hojas y fracciones alcaloideas obtenidas de semillas de *Erythrina coralloides* en 10 cepas bacterianas y 5 cepas de hongos filamentosos. La actividad antibacteriana se evaluó usando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, la CMI y CMB se calcularon por el método de microdilución en placa. Se evaluó la inhibición del crecimiento radial y la CF₅₀ se determinó por dilución en agar. Los resultados mostraron que el extracto de acetato de etilo (AcOEt) de tallo de *Erythrina americana* inhibió el crecimiento de 6 cepas bacterianas, la mayor actividad fue observada en *Staphylococcus aureus* mientras que las cepas *E. coli*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter agglomerans* y *Aeromonas caviae* no fueron inhibidas. En cuanto a la CMI, solo 6 de 8 cepas bacterianas fueron inhibidas por el extracto de AcOEt de tallo. *S. aureus* presentó los valores más bajos de CMI con tres extractos: AcOEt de tallo (0.5 mg/mL), hexano de hojas (0.13 mg/mL) y la fracción de alcaloides liberados (0.5 mg/mL). Con respecto a la actividad antifúngica, la fracción de alcaloides libres en metanol de semillas de *E. coralloides* inhibió el crecimiento de *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium graminearum*, mientras que la fracción de alcaloides liberados inhibió a los 5 fitopatógenos. El extracto metanólico de tallo de *E. americana*, inhibió sólo el crecimiento de *A. fumigatus*. En el caso de la prueba cuantitativa, los extractos de AcOEt de tallo y flores así como el extracto metanólico de tallo de *E. americana* inhibieron el crecimiento radial de las 4 cepas de *Fusarium*. Lo mismo ocurrió con el extracto de AcOEt de hojas de *E. coralloides*. Una inhibición de más del 70% del crecimiento radial de los cuatro hongos se presentó con el extracto de AcOEt de flores de *E. americana* (8 mg/mL) y éste extracto inhibió el 50% del crecimiento de *Fusarium* sp. con la concentración más baja (CF₅₀ = 2.94 mg/mL). El contenido total de flavonoides de los extractos acetato de etilo de tallo, y flores de *E. americana* fue de 08.10±0.20 mg y 35.33±1.29 mg eq de QE/g de muestra, respectivamente; mientras que el de acetato de etilo de hojas de *E. coralloides* fue de 23.11±0.76 mg QE/g muestra. Es a estos metabolitos a los que se les puede atribuir la actividad antimicrobiana observada, puesto que se ha reportado que los flavonoides actúan como agentes antimicrobianos en las plantas. Así mismo, los flavonoides de la corteza de tallo de *E. poeppigiana* inhibieron el crecimiento de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina. En este estudio se evidenció el potencial antimicrobiano de *E. americana* y *E. coralloides* y se justifica su uso tradicional para tratar algunos padecimientos infecciosos de origen bacteriano y/o fúngico.

I. INTRODUCCION

Entre los problemas de salud más frecuentes en México y el mundo se encuentran las infecciones causadas por microorganismos (Secretaria de Salud, 2014). Aunque las investigaciones en el área de producción de antimicrobianos siguen arrojando resultados, es hasta el momento difícil tratar todas las infecciones conocidas, esto se debe principalmente al desarrollo de resistencia a los medicamentos, causada por la alta exposición de los microorganismos a los fármacos conocidos (Madigan *et al.*, 2009).

La población mundial ha tenido desde siempre una estrecha relación con su entorno vegetal, gracias a esta relación, surgió el interés por conocer las propiedades terapéuticas de las plantas que nos rodean, particularmente después de aprender que ciertas plantas poseen compuestos que pueden curar o atenuar los malestares provocados por una enfermedad (Caballero y Cortéz, 2001). A los conocimientos derivados de ésta y otras prácticas usadas en el diagnóstico, prevención y eliminación del desequilibrio físico, mental o social, se les conoce como medicina tradicional (Lozoya, 1989). La práctica de la medicina tradicional sigue vigente hasta nuestros días, tan solo en 2009 la Secretaria de Salud reportó que aproximadamente el 90% de la población mexicana usa plantas para aliviar diversos padecimientos (Muñetón, 2009). Éste conocimiento empírico, transmitido a través de las generaciones, es utilizado por diversas áreas de la ciencia para buscar compuestos presentes en las plantas, que posean características farmacológicas adecuadas para tratar enfermedades. En el caso de las enfermedades infecciosas causadas por bacterias y hongos, se conocen varias especies vegetales que poseen metabolitos secundarios, tales como flavonoides, terpenos, alcaloides, los cuales son especialmente importantes porque tienen actividad antibacteriana y/o antifúngica (Tolosa y Cañizares, 2002; Rivera-Arce *et al.*, 2003; Upadhyay *et al.*, 2010). Actualmente se ha puesto interés en las plantas del género *Erythrina*, debido a su contenido de alcaloides, los cuales han sido estudiados principalmente por su efecto relajante en el sistema nervioso (Garín-Aguilar, *et al.*, 2000; Folkers y Unna, 1938,

Ribeiro *et al.*, 2006; Setti-Perdigão *et al.*, 2013). Además se han estudiado sus efectos sobre cultivos bacterianos y sobre hongos fitopatógenos, encontrando que los metabolitos secundarios (flavonoides, isoflavonoides, alcaloides) obtenidos de diferentes órganos de la planta poseen actividad antimicrobiana (Sato *et al.*, 2006; Redko *et al.*, 2007; Ibarra *et al.*, 2009; Doughari, 2010; Nagaraja *et al.*, 2011; Chukwujekwu *et al.*, 2011).

La evidencia empírica y científica muestra el gran potencial que presentan las plantas del género *Erythrina* como antimicrobianos, pero en el continente americano, especialmente en México son escasos los trabajos con especies nativas, como *E. americana*. Es por esto que en el presente trabajo se realizó la evaluación del efecto que tienen extractos de *E. americana* sobre el crecimiento de bacterias patógenas y hongos fitopatógenos.

II.- INFECCIONES BACTERIANAS Y SU PREVALENCIA

A pesar de los avances que ha tenido la medicina humana en el tratamiento de las infecciones bacterianas, éstas siguen siendo un grave problema de salud pública, presentándose más comúnmente en los países en vías de desarrollo. En 2008 la Organización Mundial de la Salud reportó que el 4% del total de muertes en regiones con altos ingresos (ej. Europa y Norte América), se debió a infecciones respiratorias. Para zonas de ingresos medios-bajos (como Asia y sur de África) aproximadamente el 5% del total de muertes se debió a enfermedades diarreicas y más del 6% a infecciones respiratorias (World Health Organization [WHO], 2011). Entre las causas de estos padecimientos se hallan los microorganismos patógenos, los cuales afectan principalmente el aparato respiratorio superior e inferior y el aparato gastrointestinal, por ser estos la conexión principal entre el interior del cuerpo y el ambiente externo (Forbes *et al.*, 2004).

En México la mayor incidencia de infecciones respiratorias (incluidas neumonías, faringitis y amigdalitis) en 2013 se presentó en los estados de Aguascalientes, Colima, Zacatecas, Durango y Campeche; reportándose a nivel nacional 26, 613,915 casos, siendo los más afectados niños de 1 a 4 años (5, 663, 088) (Secretaría de Salud [SS], 2014).

Por lo que respecta a las enfermedades del tracto digestivo, las enfermedades diarreicas son la segunda causa principal de mortalidad en el mundo, con alrededor de 25 millones de infecciones al año; afectando particularmente, a personas ancianas y niños menores de 5 años. Se estima que 4 a 6 millones de niños fallecen cada año por enfermedad diarreica, principalmente en los países de África y Asia (WHO, 2011).

Para el caso de México la mayor incidencia de infecciones intestinales en menores de 5 años se dio en Aguascalientes, Yucatán, Oaxaca y Campeche, siendo mayo y julio los meses con más casos reportados. En 2013 los más afectados fueron adultos de 25 a 44 años y niños de 1 a 4 años (Secretaría de Salud, 2014).

II.1. Defensas del tracto respiratorio y aparato gastrointestinal

Una enfermedad infecciosa es cualquier alteración de la salud, debido a la presencia de un organismo parásito. El éxito de un microorganismo para establecer una infección depende de tres factores principales: 1) el número de microorganismos presentes en el huésped, 2) la virulencia del microorganismo y 3) las defensas del huésped o su grado de resistencia (Prescott, 2000). Para causar infección, un microorganismo debe poseer uno o más mecanismos de virulencia que le permitan superar las defensas del huésped y que faciliten la colonización. Entre los mecanismos patogénicos principales está la producción de toxinas: enterotoxinas, citotoxinas y neurotoxinas; la adherencia y su rápido desarrollo (Forbes *et al.*, 2004).

El hospedero humano tiene mecanismos que protegen el tracto respiratorio en forma inespecífica; vellos nasales, cornetes (estructuras que filtran el aire que respiramos), membranas mucosas de los cornetes, revestimiento mucoso de la tráquea y los reflejos como la tos, el estornudo y la deglución. Además de estas defensas inespecíficas, la flora normal de la nasofaringe y la orofaringe ayuda a prevenir la colonización de la vía respiratoria superior (Forbes *et al.*, 2004).

En el caso del aparato gastrointestinal (GI), los mecanismos que previenen o controlan las enfermedades producidas por los patógenos entéricos son: la acidez del estómago la cual restringe el tipo de microorganismos que entran al tracto GI; el peristaltismo normal y la descamación del revestimiento del GI, ayudan a movilizar los microorganismos hacia el recto, lo que interfiere con su capacidad de adherirse a la mucosa; la capa mucosa que recubre el epitelio forma una envoltura protectora que resiste la penetración y atrapa a muchos microorganismos y la flora normal (Forbes *et al.*, 2004).

II.2. Clasificación bacteriana estructural

Las bacterias son organismos unicelulares y microscópicos que se reproducen por división celular. Están en casi todos los ambientes: en el aire, el suelo y el agua, desde el hielo hasta las fuentes termales. También se pueden encontrar en algunos

alimentos o viviendo en simbiosis con plantas, animales y otros seres vivos. Pueden clasificarse según la estructura de la pared celular en Gram positivas y Gram negativas (Figura 1).

Bacterias Gram positivas.- Presentan una única membrana celular con una pared externa de peptidoglicano (polímero compuesto de N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurámico y varios aminoácidos). Para los antibióticos betalactámicos que no atraviesan la membrana plasmática para ejercer su actividad, el transporte a través de las membranas de las bacterias Gram positivas no es un problema (Koneman, 2004).

Bacterias Gram negativas.- Poseen una membrana plasmática interna y una membrana celular externa, entre las cuales hay una capa delgada de péptidoglicano. La membrana externa y el péptidoglicano están fuertemente unidos por la lipoproteína de Braun (Prescott, 2002). La permeabilidad de las membranas a los antibióticos y el transporte de las moléculas a través de las barreras son un factor importante. En el caso de éstas bacterias, dado que tienen dos membranas que obstaculizan el paso de los agentes antimicrobianos, suelen ser más resistentes (Koneman, 2004). En la figura 1 se representa la pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

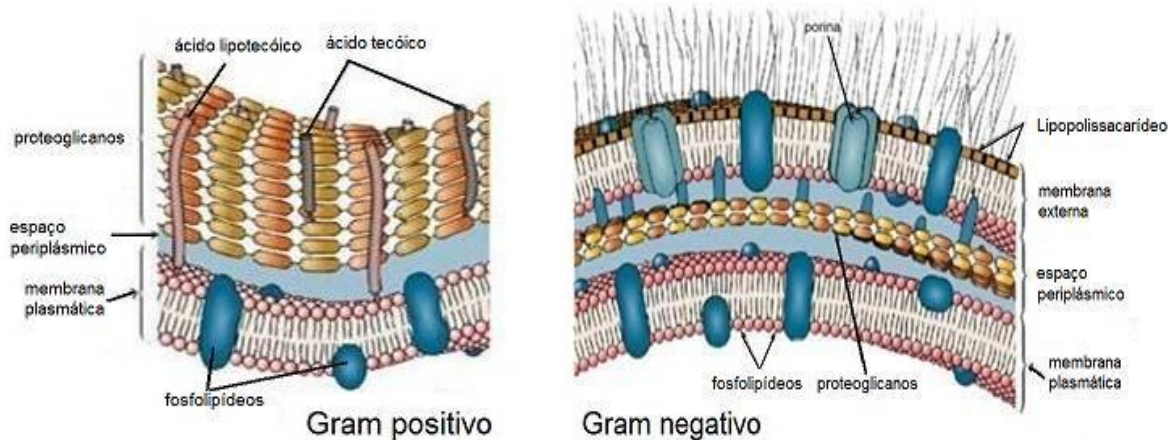


Figura 1. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Tomado de Prescott, 2002).

II.3. Tratamiento de las enfermedades infecciosas

Los antimicrobianos constituyen la base del tratamiento de las enfermedades infecciosas. Los antibacterianos son sustancias químicas que se pueden clasificar según su efecto, en bacteriostáticos: que detienen el crecimiento (cloranfenicol, tetraciclinas y sulfonamidas) o bactericidas: que destruyen a los microorganismos invasores (betalactamasas, penicilinas y los aminoglucósidos) (Madigan *et al.*, 2009).

II.3.1. Mecanismo de acción de los antimicrobianos

Los fármacos antimicrobianos pueden actuar de diversas maneras sobre un microorganismo (Madigan *et al.*, 2009):

- Inhibición de la síntesis de la pared celular: Por alteración de moléculas o desnaturalización de proteínas que forman la pared celular.
- Alteración de la permeabilidad celular.
- Inhibición de la síntesis proteica: Actúan uniéndose a las subunidades 30s y 50s ribosomales.
- Inhibición de la síntesis de ADN y ARN: Inhiben la ADN girasa, interfiriendo en la replicación, reparación y transcripción del ADN.
- Antagonismo metabólico. Inhiben vías metabólicas, por ejemplo la síntesis del ácido fólico.

II.4. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir o inactivar los efectos de los agentes antimicrobianos (Fernández *et al.*, 2003).

Mecanismos de resistencia

Hay cuatro principales mecanismos por los que un microorganismo neutraliza la actividad de un antimicrobiano (Cordiés *et al.*, 1998; Greca, 2000; Fernández *et al.*, 2003).

- *Modificación de la permeabilidad de la membrana celular.* En este caso el antibiótico no puede penetrar la superficie bacteriana y por tanto no ejerce actividad. Algunas bacterianas tiene unas proteínas llamadas porinas, estas son canales inespecíficos que impiden la entrada del antibiótico por su tamaño molecular. Esta es la forma más frecuente de resistencia natural y se presenta en la mayoría de las bacterias gran negativas.
- *Expulsión del antimicrobiano.* Es un sistema de expulsión activa del antimicrobiano denominado eflujo, actúa como una “bomba expulsora” que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos.
- *Modificación o inactivación del antimicrobiano.* Mediante la producción de enzimas betalactamasas que hidrolizan al antibiótico se altera su estructura y por lo tanto su actividad. Esta es la forma más frecuente de resistencia adquirida.
- *Modificación de la estructura de las proteínas blanco.* Se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como pared celular, subunidad 50s, 30S ribosomales, mutaciones cromosómicas, etc., lo cual conferirán resistencia a los antimicrobianos dado que se altera su sitio de acción.

II.5. Medicina tradicional

Además de la medicina alópata, básica para tratar las enfermedades que atacan a la población existe la medicina tradicional, la cual se define como el conjunto de conocimientos, creencias, prácticas y recursos provenientes de la cultura popular, de los que hace uso la población para resolver, en forma empírica, algunos de sus problemas de salud, al margen o a pesar de la existencia de la medicina oficial e institucionalizada por el estado (Lozoya, 1989).

Desde hace miles de años el empleo de plantas medicinales con fines terapéuticos ha sido una práctica común y la variedad y cantidad de plantas con propiedades terapéuticas es asombrosa, aproximadamente 70,000 variedades de plantas han sido utilizadas en alguna ocasión con propósitos curativos (Chevallier,

2003). Se estima que en México existen cerca de 7,000 especies de plantas útiles, de las cuales, 4,500 están registradas como medicinales, ocupando el segundo lugar a nivel mundial después de China, que tiene 5,000 plantas registradas (Muñetón, 2009; Caballero y Cortés, 2001).

A partir del conocimiento popular, en la actualidad se buscan tratamientos alternativos a numerosos padecimientos utilizando a las plantas, ya que ellas presentan metabolitos secundarios, estos son sustancias derivadas del metabolismo primario; algunos tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales o proporcionan color a flores y frutos (Dirzo, 1985). En virtud de su estructura, los metabolitos secundarios son químicamente reactivos; es decir, son aptos para ingresar en los sistemas vivos, interactuar y cambiar la estructura de un receptor o blanco molecular, y penetrar en las células, donde pueden afectar varios procesos fisiológicos como la síntesis de proteínas, formación de la pared celular, de allí deriva su actividad biológica o farmacológica (Ayala y Espinosa, 2006).

II.5.1. Plantas medicinales y las enfermedades infecciosas

En la medicina tradicional mexicana se tiene el conocimiento popular de algunas plantas con efecto terapéutico sobre las enfermedades infecciosas, entre esas plantas se encuentran *Allium sativum* (ajo), *Ocimum basilicum* (albahaca), *Peumus boldus* (boldo), *Calendula officinalis* (caléndula), *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Elettaria cardamomum* (cardamomo), *Eugenia aromatica* (clavo); a éstas ya se les ha demostrado un efecto antibacteriano y/o antifúngico (Arango, 2006).

Otras plantas de interés son las pertenecientes al género *Erythrina*. Estas especies han sido utilizadas en diversas regiones del mundo, principalmente en América y Asia. Algunas propiedades etnomédicas que se les atribuyen son el alivio de dolores, tratamiento de infecciones urinarias, respiratorias, infecciones de la piel y garganta, para la fiebre, cura de heridas, como relajante muscular y para procesos inflamatorios (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Las especies más reportadas en la literatura son *Erythrina variegata*, *Erythrina*

americana, *Erythrina abyssinica*, *Erythrina indica*, *Erythrina fusca* y *Erythrina senegalensis*. Los órganos más utilizados en las plantas de este género son la corteza y las hojas y en menor medida las raíces, semillas y flores. Rara estudiar sus diversas propiedades terapéuticas, un gran número de metabolitos secundarios se han aislado a partir de este género, entre estos destacan los alcaloides, flavonoides, lectinas y pterocarpanos (Pino *et al.*, 2004).

II.5.2. Distribución del género *Erythrina*

El género *Erythrina* pertenece al orden de los Fabales, familia Leguminosae (Martínez, 1996). Se reconocen 113 especies, distribuidas ampliamente en climas tropicales y subtropicales (Figura 2), correspondiendo 31 especies a África, 12 especies a Asia y Australia y 70 especies a América, de las cuales 27 se encuentran en México, en varios estados del centro y sur del país (Neill, 1988).



Figura 2. Distribución del género *Erythrina* en el mundo (Modificado de Neill, 1988).

Descripción de la planta

Nombres comunes

Colorín, cáscara de chomplante, equimite, pichoco, piñón espinoso, quimite. Guerrero: tusavi (mixteco); Michoacán: parenscuri, puregue; Morelos: zomplantli (náhuatl); Puebla: laktanga (totonaco), skotkt (tepehua), te' batai (otomí); San Luis Potosí: pénoch (tenek), Hidalgo: chocolín, Tabasco: madre chontal, Veracruz: pito (Martínez, 1996).

Botánica y ecología

Este género lo constituyen árboles y arbustos que llegan a medir aproximadamente 7 metros. Corteza agrietada con ramas espinosas. Hojas trifoliadas de color verde pálido de 5-15 x 4-10 cm. Flores alargadas color rojo brillante agrupadas al final de la rama. El fruto es una vaina de tamaño variable, constreñida entre las semillas, que son de color rojo brillante. Su temporada de floración es de febrero a mayo (Royal Botanic Gardens, 2012).

Usos comunes

Por su gran follaje se usa como sombra para el cultivo de café, la corteza y semillas en la manufactura de artesanías, las flores como alimento y diversos usos medicinales (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Compuestos presentes

En la inflorescencia se han encontrado compuestos alcaloideos (Sánchez *et al.*, 2001), en la corteza se han encontrado flavonoides, polifenoles, taninos y terpenoides (Hastings, 1990).

Erythrina americana Miller 1768

Originario de México. Habita en matorrales y selvas secas, así como bosque de encino entre 1,180 y 1,900 msnm. Cultivada en huertos familiares o solares, cerca de ríos o terrenos de vega o de cultivos abandonados, asociada a bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo (Biodiversidad Mexicana, 2013).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Erythrina americana* Miller y *Erythrina coralloides* DC. (FABACEAE)

En la república mexicana, se encuentra en Chiapas, Distrito Federal, Guerrero, Hidalgo, Edo. de México, Morelos, Oaxaca, Puebla, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Tropicos, 2012). En la Figura 3 se muestran fotos de flores, hojas y semillas de *E. americana* Miller.



Figura 3. A) Flores, B) hojas y C) semillas de *Erythrina americana* Miller

Erythrina coralloides DC 1825

Especie originaria de México. Se encuentra en climas templados desde los 2240 a los 2500 msnm. Asociado a bosque mixto de pino-encino, así como a terrenos de agricultura de riego y temporal como cercos vivos (Biblioteca Digital de la

Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Se distribuye en el Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz (Tropicos, 2012).

III. ANTECEDENTES

Entre los estudios realizados con el género *Erythrina* por su efecto antibacteriano se encuentran el de Calle y colaboradores (1997), quienes evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de flores y el etanólico en cloruro de metileno, acetato de etilo e isobutanol de corteza de *E. fusca*. Ellos reportaron que todos los extractos fueron activos en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*, mientras que dos fracciones obtenidas del extracto de cloruro de metileno fueron activos frente a los hongos *Mucor* sp., *Fusarium oxysporum dianti* y *Aspergillus niger*.

Sato y colaboradores (2006) evaluaron la actividad antibacteriana de isoflavonas aisladas del tallo de *Erythrina poeppigiana* en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Los autores reportaron dos diferentes actividades, inhibición directa del crecimiento por algunas isoflavonas e incremento de la susceptibilidad de las cepas MRSA cuando compuestos (isoflavonas) inactivos fueron combinados con meticilina (antibiótico B-lactámico) u oxilina.

En otro estudio, Ibarra y colaboradores (2009) extrajeron y purificaron el alcaloide erisovina de *E. americana* encontrando que este alcaloide tiene actividad contra los hongos fitopatógenos *A. solani*, *B. cinerea*, *F. oxysporum*, *M. fructicola*, *Penicillium* sp. y *T. harzianum*, y observaron diferencias en la susceptibilidad de las distintas especies de hongos.

Por otro lado, Doughari (2010) evaluó la actividad antimicrobiana de tres extractos (acuoso, metanólico y clorofórmico) del tallo de *Erythrina senegalensis*, reportando actividad sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Penicillium notatum*. El extracto metanólico mostró la mayor actividad.

Chukwujekwu y colaboradores (2011) encontraron que flavonoides obtenidos del tallo de *Erythrina caffra* presentaron actividad en *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

subtilis, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

En otro estudio, los extractos etanólico y clorofórmico de la corteza de *E. mysorensis* presentaron actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* (Nagaraja *et al.*, 2011).

En nuestro país son diversos los usos medicinales empíricos que se le dan al género *Erythrina*. *E. americana*, especie originaria de México, es usada para atender el dolor de muelas, afecciones de los riñones y el mal de orín. En Morelos, bajo este término de “mal de orín” se reconoce a un conjunto de enfermedades, muy probablemente de naturaleza infecciosa, que afectan las vías urinarias. En el Distrito Federal, otra planta mexicana, *Erythrina coralloides* se recomienda para atender problemas del sarampión y en Puebla para curar dolor de riñones. En Sonora, la semilla de *Erythrina flabelliformis* (originaria de Arizona) se aprovecha contra la diarrea; mientras que en Baja California Sur, las hojas tostadas se aplican en caso de vaginitis o dolor de riñón. En Veracruz, se sugiere el empleo externo generalizado de la savia pulverizada cuando se padece sarampión (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Es evidente que el uso empírico de estas plantas *E. americana*, *E. coralloides* y *E. flabelliformis* está vinculado con padecimientos relacionados con infecciones, en su mayoría ocasionadas por microorganismos.

De lo anterior se desprende que de no ser el estudio de Ibarra (2009), con hongos fitopatógenos, son escasos los reportes de la actividad antimicrobiana de especies de *Erythrina* crecidas en nuestro país. Es por esto que en este trabajo se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de *Erythrina americana* y *Erythrina coralloides*.

IV. HIPOTESIS

Hallazgos experimentales han mostrado la actividad antimicrobiana de extractos de plantas del género *Erythrina* de diversas regiones del mundo, por lo que es probable que los extractos de las plantas mexicanas, *Erythrina americana* y *Erythrina coralloides*, inhiban el crecimiento de bacterias y hongos.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

- ◆ Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de *Erythrina americana* y *Erythrina coralloides* sobre microorganismos de importancia clínica y fitosanitaria.

V.2. Objetivos Particulares

- ◆ Obtener los extractos de hojas, tallos y flores de *E. americana* y *E. coralloides* en disolventes de diferente polaridad.
- ◆ Obtener las fracciones alcaloideas de semillas de *E. coralloides*.
- ◆ Determinar de manera cualitativa y cuantitativa la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos obtenidos.
- ◆ Detectar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en los extractos con actividad antimicrobiana.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Material vegetal

La recolección de ejemplares botánicos y semillas de *E. americana* se realizó en una avenida de la colonia Barrio la Laguna Ticomán, Delegación Gustavo A. Madero, mientras que la de *Erythrina coralloides* ocurrió en los jardines de la FES-Iztacala. Los ejemplares se trasladaron al Herbario de la FES-Iztacala para su determinación taxonómica y quedaron registrados en la colección del Herbario IZTA.

VI.2. Preparación de los extractos de diferente polaridad

Muestras frescas de hojas, tallos o flores (300- 500 g) de *E. americana* y hojas de *E. coralloides* se extrajeron de manera independiente por maceración sucesiva en hexano (Hx), acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH) o Agua:Etanol (30:70). Una vez obtenidos los extractos, éstos se concentraron a presión reducida y se pesaron para obtener el rendimiento. Para la prueba de susceptibilidad se prepararon diluciones de cada extracto para impregnar discos de papel filtro con muestras de 2 y 4 mg de extracto por disco.

VI.3. Obtención de las fracciones alcaloideas

Para la extracción de alcaloides se siguió el método de extracción ácido-base. Las semillas de *E. coralloides* fueron trituradas en un molino manual y fueron extraídas en un equipo Soxhlet con hexano por 48 horas y posteriormente con metanol por 48 h. La extracción de alcaloides liberados se realizó sometiendo a hidrólisis la fase acuosa del extracto metanólico (Games *et al.*, 1974).

VI.4. Ensayo microbiológico

VI.4.1. *Microorganismos*

Las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 12398 y *Enterobacter agglomerans* ATCC 27155 fueron donadas por el Laboratorio de Fitoquímica de la UBIPRO; mientras que *Escherichia coli* ATCC 11775, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 11775, *Klebsiella rhinoscleromatis* ATCC 13884, *Salmonella typhi* INDRE 2874,

Cardiobacterium hominis, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Aeromonas caviae* las donó el Laboratorio de Bacteriología de la UIICSE. El hongo *Aspergillus fumigatus* procede del laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina de la UNAM; y los hongos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium graminearum* y *Fusarium* sp. fueron donados por el Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo.

VI.4.2. Evaluación de la actividad antibacteriana.

VI.4.2.1. Método cualitativo

La actividad antimicrobiana de los extractos se evaluó siguiendo el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (Koneman, 2004).

Preparación del inóculo. A partir de un cultivo de 18-24 horas, se tomaron de 4 a 5 colonias aisladas con un aza de siembra y se colocaron en un tubo con solución salina estéril al 0.9% para alcanzar una concentración de 1×10^8 UFC/mL, ajustando el inóculo a una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland. *Sembrado de placas.* En el tubo con el inóculo ($[1 \times 10^8$ UFC/mL]) se introdujo un hisopo estéril, se eliminó el exceso de líquido y se realizó el sembrado en tres direcciones con ángulos de 60 grados en las placas de agar Müller Hinton (MH). Después de la siembra, se colocaron los discos de papel filtro (Whatman No. 5 de 5 mm de diámetro) impregnados con 2 y 4 mg de cada extracto, 25 µg de cloranfenicol (control positivo) o 10 µL del disolvente en el que se solubilizaron los extractos (control negativo). Finalmente, las bacterias se incubaron a 35°C por 18-24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió el halo de inhibición alrededor del disco.

VI.4.2.2. Método cuantitativo

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) se obtuvieron a través de la prueba de microdilución en caldo realizada en placas de poliestireno de 96 celdillas.

Preparación del inóculo. A partir de un cultivo de 18-24 horas, se tomaron de

cuatro a cinco colonias aisladas con un asa de siembra y se colocaron en un tubo con 5 mL de caldo MH y se incubaron por un periodo de 24 horas, el caldo con bacteria se pasó a un tubo con 10 mL de solución salina estéril al 0.9%, hasta alcanzar una concentración de 1×10^8 UFC/mL, ajustando el inóculo a una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland. A partir de este inóculo se tomó un mL y se depositó en un tubo con 9 mL de solución salina estéril al 0.9% para obtener una concentración final de 10^5 UFC/mL.

Las concentraciones de cada extracto (0.0625, 0.125, 0.5, 0.75, 1.5, 2, 4 y 6 mg/mL) se mezclaron con caldo MH estéril. A partir de estas diluciones se tomaron 50 μ L de cada extracto y se colocaron en cada pozo de la placa (de mayor a menor concentración). A cada celdilla se le agregaron 50 μ L del inóculo bacteriano para tener un volumen final de 100 μ L por pozo. El ensayo se hizo por triplicado. Las placas se incubaron por 24 horas a 35°C.

Para el revelado, en cada pozo se agregaron 50 μ L de cloruro de tetrazolio al 0.08% y las placas se incubaron nuevamente durante 30 minutos. Pasado el tiempo se observó la coloración de cada pozo. La CIM se interpretó como la concentración del extracto donde se observó la mínima coloración (color morado). Para determinar la CMB se tomó una muestra de 10 μ L de cada uno de los tres pocillos siguientes al de la CMI y cada una de estas muestras se depositó en placa de agar; posteriormente, las placas se incubaron por 24 horas a 35°C. La concentración de la placa donde no hubo crecimiento bacteriano se registró como CMB.

VI.4.3. Evaluación de la actividad antifúngica

VI.4.3.1. Método cualitativo

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó siguiendo el método descrito por Wang y Ng (2002). En placas de medio de cultivo de Papa Dextrosa Agar (PDA) se sembró una muestra de micelio de 5 mm de diámetro y se incubó a 28°C por un lapso de 24 horas o hasta que el diámetro de crecimiento del micelio fue de 3 a 4 cm. Se impregnaron discos de papel filtro estériles con 2 y 4 mg de cada

extracto, se utilizó ketoconazol (25 µg) como control positivo y el disolvente de cada extracto como control negativo. Los discos se colocaron a 5 mm del límite del crecimiento del micelio y los hongos se incubaron por 24 horas o hasta que se observó que el micelio alcanzó los discos. Mediante observación directa se registró si hubo inhibición como positivo (+) o negativo (-).

VI.4.3.2. Método cuantitativo

Para el ensayo de concentración fungicida media (CF₅₀) se usó el método de microdilución en placa de 24 celdas (modificado de Wang y Ng, 2002). A cada celda se le agregó 1 mililitro de agar PDA con las siguientes concentraciones de extracto 8, 6, 4, 2, 1 y 0.5 mg/mL. Posteriormente se tomó una muestra del micelio de un milímetro de diámetro de un cultivo de 72 horas y se colocó al centro de la celdilla, cada bioensayo se hizo por triplicado y las placas se incubaron a 28°C durante 24-48 horas. Se midió el diámetro del crecimiento del micelio para calcular el porcentaje de inhibición y la Concentración Fungicida Media (CF₅₀).

VI.5. Detección cualitativa de metabolitos secundarios

Para la detección de compuestos presentes en los extractos, se realizó el análisis preliminar fitoquímico de acuerdo con el método descrito en el Manual de Prácticas de Productos Naturales (Valencia y Garín, 2010):

- Test de alcaloides: Dragendorff y Sonneschain.
- Flavonoides: Hidróxido de sodio al 10%.
- Glucósidos cianógenicos: Reactivo de Grignard.
- Azúcares reductores: Reacción de Fehling y reacción de Benedict.
- Saponinas: prueba de altura y estabilidad de espuma, reacción de Lieberman Bouchard y reacción de Rosenthaler.
- Taninos: Reacción con gelatina, reacción de Cloruro férrico y Ferricianuro de potasio al 1%.
- Quinonas: Reacción de hidróxido de amonio y reacción con ácido sulfúrico.
- Cumarinas. Reacción de Erlich y reacción con hidróxido de amonio.

- Glucósidos Cardiacos: Reacción de Legal y reacción de Baljet.
- Sesquiterpenlactonas: Reacción con Hidroximato férrico.

VI.6. Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se realizó siguiendo el método de Wosky y Salatino (1998) con algunas modificaciones, se analizaron los extractos de acetato de etilo de tallo, flores de *E. americana*, acetato de etilo de hojas y el acuoso liofilizado de hojas de *E. coralloides*. La cuantificación espectrofotométrica de flavonoides se hizo a 420 nm utilizando como referencia una solución de quercetina, y el contenido se expresó en mg eq de quercetina (QE) por g de extracto.

VI.7. Análisis estadístico

Para comparar la actividad antibacteriana de los extractos probados, los datos de halo de inhibición obtenidos se sometieron análisis de varianza (ANOVA) de una vía ($\alpha = 0.05$). En el caso de dos grupos experimentales se usó la prueba de t de Student. Cuando hubo diferencias significativas se aplicó la prueba pos-hoc de Tukey (Zar, 2010). Los datos obtenidos en la prueba de actividad antifúngica, se sometieron a un análisis de Probit, con el cual se calculó la CF_{50} . Los análisis mencionados se hicieron en el programa MATLAB Ver. 7.12.0 R2011a (The MathWorks, 2011).

VII. RESULTADOS

Los ejemplares completos de *E. americana* para identificación y para experimentación se colectaron en una avenida de la colonia Barrio la Laguna Ticomán, Delegación Gustavo A. Madero entre febrero y mayo del 2013, fueron clasificados como vegetación urbana y quedaron registrados en el Herbario IZTA con el número 2142IZTA; mientras que los ejemplares de *E. coralloides* fueron colectados en los jardines de la FES-Iztacala y se resguardaron en el Herbario IZTA con el número 2393IZTA.

VII.2. Rendimiento de extractos

Del material vegetal de *E. americana* y *E. coralloides* se obtuvieron 10 extractos. Los extractos de acetato de etilo y metanólico de tallo y liofilizado de hojas frescas de *E. americana* presentaron un rendimiento mayor al 1% y el rendimiento de los restantes fue menor al 1% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Rendimiento de los extractos obtenidos de *E. americana* y *E. coralloides*

Muestra	Parte utilizada	Material vegetal (g)	Extracto	Rendimiento (g)	Rendimiento %
<i>Erythrina americana</i>	Tallo fresco	315	Hexánico	0.2224	0.070 %
		80	Acetato de etilo	2.579	3.22 %
			MeOH	2.104	2.63%
		546	Agua:EtOH (70:30)	1.34	0.25 %
	Hojas frescas	561	Agua:EtOH (70:30)	7.37	1.32 %
	Flores frescas	350	Acetato de etilo	3.863	1.10 %
<i>Erythrina coralloides</i>	Hojas frescas	400	Hexánico	3.664	0.916 %
			Acetato de etilo	2.3145	0.5786%
	Semillas	258	Alcaloides Hexánicos	0.1519	0.0296 %
			Alcaloides Metanólicos	3.8827	0.3948 %
			Alcaloides liberados	0.160	0.0619 %

VII.3. Actividad antibacteriana

VII.3.1. Método cualitativo

En el caso de la prueba de difusión en disco Kirby-Bauer, los extractos probados arrojaron los siguientes resultados.

Extractos de *E. americana*: el liofilizado de tallo y el liofilizado de hojas solo tuvieron efecto inhibitorio sobre *S. typhi*, con un halo de 6.83 mm (± 0.28) en ambos casos. El extracto de AcOEt de tallo presentó la mayor actividad inhibiendo el crecimiento de 6 de las 10 cepas bacterianas. Con 2mg/disco inhibió a *S. aureus*, (11.2 mm ± 0.27), *K. pneumoniae* (8 mm ± 1.0), *S. typhi* (8.33 mm ± 0.57) y *C. hominis* (6.66 mm ± 0.57). Con 4mg/disco de extracto se inhibió el crecimiento de *E. faecalis* (7.6 mm ± 0.57), *K. rhinoscleromatis* (8.83 mm ± 0.28), *S. typhi* (9.3 mm ± 0.76) y *C. hominis* (7.83 mm ± 0.28). *E. coli*, *E. faecium*, *E. agglomerans* y *A. caviae* no fueron inhibidas por este extracto. Los extractos hexánico y metanólico de tallo no mostraron actividad sobre ninguna de las cepas estudiadas.

Por otro lado el extracto hexánico de hojas de *E. coralloides* únicamente presentó actividad sobre *S. aureus* con una zona de inhibición de 9.3 mm (± 0.57) con la dosis de 2mg/disco. Las cepas restantes no fueron inhibidas por este extracto. La fracción de alcaloides libres en metanol de semillas de *E. coralloides* tuvo actividad sobre *S. aureus* (8.8 mm ± 0.76) y *E. agglomerans* (7.0 mm ± 0.0) con la concentración de 4mg/disco. Por último la fracción de alcaloides liberados inhibió el crecimiento de *S. aureus* (8.3 mm ± 0.76), *K. rhinoscleromatis* (9 mm ± 1.0) y *S. typhi* (12.6 mm ± 0.57), con una concentración de 2mg/disco. Los extractos de AcOEt de hojas y de flores de *E. coralloides* no mostraron actividad inhibitoria.

Los datos sobre inhibición de crecimiento bacteriano obtenidos con el extracto de AcOEt de tallo de *E. americana* (4 mg por disco) se sometieron a un ANOVA. Se encontraron diferencias significativas [F (14) = 10.17, p = 0.001] en la actividad de dicho extracto y la prueba *post hoc* de Tukey indicó que la media de los halos de inhibición de las bacterias *S. typhi* y *K. rhinoscleromatis* (8.83 y 9.33 mm

respectivamente) son significativamente mayores ($p = 0.001$) a los de *K. pneumoniae*, *C. hominis* y *E. faecalis* (7.16, 7.83 y 7.66 mm respectivamente).

Al analizar con un ANOVA los datos del extracto de alcaloides liberados de semillas de *E. coralloides*, se encontró que hay diferencias significativas [$F(8) = 22.043$, $p = 0.002$] en el diámetro de los halos de inhibición formados por este extracto y la prueba de comparación múltiple de medias indicó que la media del halo formado por *S. typhi* fue significativamente mayor (12.66 mm) al de la media de *S. aureus* (8.83 mm) y *K. rhinoscleromatis* (9.00mm).

Los valores de halos de inhibición de *S. aureus* y *E. agglomerans* con el extracto de alcaloides libres en metanol, se analizaron con la prueba de t de Student ($p = 0.0142$), la que indicó que hubo diferencias significativas entre ellos (8.50 y 7.00).

Otro ANOVA se realizó para comparar la sensibilidad de *S. aureus* a tres de los extractos, encontrándose que AcOEt de tallo de *E. americana*, hexánico de hojas y Alcaloides liberados de *E. coralloides*, mostraron el mismo efecto sobre este microorganismo [$F(8) = 0.05$, $p = 0.95$].

En el caso de *S. typhi*, el ANOVA mostró que hubo diferencias significativas [$F(8) = 109.6$, $p = 0.0001$] en la actividad de los cuatro extractos con esta bacteria: AcOEt de tallo, liofilizado de tallo, liofilizado de hojas de *E. americana* y alcaloides liberados de semillas de *E. coralloides*. La prueba post hoc de Tukey indicó que las medias de los halos de inhibición del extracto AcOEt de tallo y alcaloides liberados son diferentes entre sí y diferentes de los liofilizados ($p = 0.0001$) (estos últimos son iguales). La fracción de alcaloides liberados fue la más activa (12.66 mm).

VII.3.2. Método cuantitativo

Para la determinación de la CMI y CMB (Cuadro 2), sólo se evaluaron los extractos que en el ensayo cualitativo, mostraron actividad y se seleccionaron las cepas que presentaron inhibición. Así, se observa que en el ensayo cuantitativo, el extracto de AcOEt de tallo de *E. americana* inhibió a seis de las ocho cepas

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Erythrina americana* Miller y *Erythrina coralloides* DC. (FABACEAE)

probadas con una CMI = 0.5 - 4 mg/mL. La cepa más sensible al extracto de AcOEt de tallo resultó ser *S. aureus* (CMI = 0.5 mg/mL). *S. typhi* y *E. coli* tuvieron un valor de MIC = 0.75 mg/mL, *K. pneumoniae* MIC = 1.5; mientras que *E. faecalis* y *C. hominis* tuvieron una MIC = 4 mg/mL. *S. aureus* también presentó los valores más bajos de CMI con los extractos Hx de hojas y de alcaloides liberados de *E. coralloides*, 0.125 y 0.5 mg/mL respectivamente. Por otro lado, *S. typhi* y *E. agglomerans* fueron sensibles al extracto de alcaloides liberados alcanzando una CMI = 0.75 y 1.5 mg/mL. Es importante hacer notar que durante esta prueba cuantitativa, el liofilizado de tallo y la fracción de alcaloides libres en metanol no inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, *E. agglomerans* y *S. typhi*. Por lo que respecta a *S. aureus*, la CMB del extracto hexánico de hojas fue de 0.5 mg/mL y la CMB de la fracción de alcaloides liberados fue de 0.75 mg/mL.

Cuadro 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos de *Erythrina*

Microorganismo	<i>Erythrina americana</i>				<i>Erythrina coralloides</i>			
	Tallo acetato (mg/mL)		Hojas liofilizado (mg/mL)		Hojas hexano (mg/mL)		Alcaloides liberados (mg/mL)	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.50	4.00			0.13	0.50	0.50	0.75
<i>Enterococcus faecalis</i>	4.00	NE						
<i>Escherichia coli</i>	0.75	NE						
<i>Enterobacter agglomerans</i>	NE	NE					1.50	4.00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.50	NE						
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	NE	NE					2.00	4.00
<i>Salmonella typhi</i>	0.75	NE	4.00	NE			0.75	NE
<i>Cardiobacterium hominis</i>	4.00	NE						

NE = No hubo efecto. Espacios vacíos indican que no se realizó prueba para estos extractos/cepas ya que previamente no presentaron halos de inhibición.

VII.4. Actividad antifúngica

VII.4.1. Método cualitativo

Se probó el efecto de siete extractos de *Erythrina* sobre el crecimiento micelial de cinco cepas fúngicas: *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium sp.* y *Fusarium graminearum*. Los resultados se muestran en el Cuadro 3. Los extractos de AcOEt de tallo, liofilizado de tallo y liofilizado de hojas de *E. americana* no tuvieron efecto sobre el crecimiento micelial de los cinco hongos evaluados; mientras que el extracto metanólico de tallo, inhibió sólo el crecimiento de *A. fumigatus* y el extracto de AcOEt de flores inhibió el crecimiento de *F. oxysporum*. Por otro lado, la fracción de alcaloides libres en metanol de semillas de *E. coralloides* fue efectiva para inhibir el crecimiento de *A. fumigatus* y *F. graminearum* y el extracto de alcaloides liberados inhibió el crecimiento de los 5 fitopatógenos.

Cuadro 3. Actividad inhibitoria de los extractos de *Erythrina* sobre el crecimiento micelial de especies de hongos fitopatógenos

Microorganismo	Tallo Acetato 2 mg	Tallo Metanol 2 mg	Tallo Liofilizado 2 mg	Hojas Liofilizado 2 mg	Alcaloides libres MeOH 2 mg	Flores Acetato 2mg	Alcaloides liberados 2 mg	Ketoconazol 25 µg
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	+	-	-	+	-	+	+
<i>Fusarium sp.</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Fusarium subglutinans</i>	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Fusarium graminearum</i>	-	-	-	-	+	-	+	+

Nota: El signo (+) = inhibición, el signo (-) = no inhibición.

VII.4.2. Método cuantitativo

Para determinar la Concentración Fungicida Media (CF₅₀), la prueba cuantitativa se realizó con seis extractos y cuatro hongos: extracto metanólico de tallo, AcOEt de tallo, acuoso liofilizado de tallo, acuoso liofilizado de hojas y AcOEt de flores de *E. americana*; AcOEt de hojas y fracción de alcaloides libres en metanol de *E. coralloides*. El hongo *A. fumigatus* no fue probado.

Después de esta prueba cuantitativa, las gráficas del % de inhibición de los hongos que no alcanzaron una inhibición del 50% se muestran en el Apéndice 2, mientras que los resultados de los extractos que permitieron la determinación de la CF₅₀ se presentan a continuación.

En las Figuras 4 y 5 se presentan las gráficas resultantes del análisis de Probit. Los datos muestran que una inhibición del crecimiento micelial superior al 50% se alcanzó con una 8 mg/mL de extracto de AcOEt de tallo de *E. americana* en las cuatro especies de hongos evaluados. Se evidenció que el hongo más sensible fue *F. subglutinans*, ya que presentó el valor más bajo de CF₅₀ = 5.73; mientras que *F. sp.* tuvo el valor más alto de CF₅₀ = 7.01.

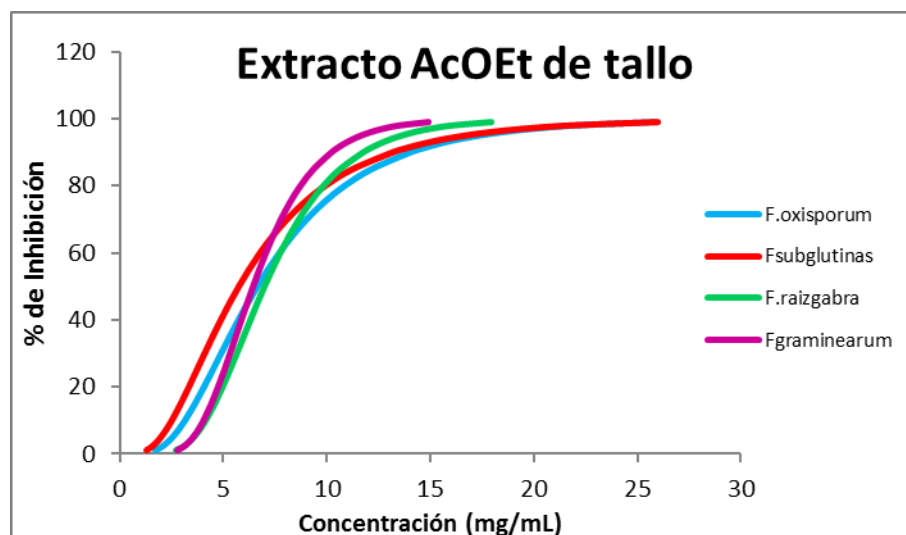


Figura 4. % de inhibición del extracto de acetato de etilo de tallo sobre 4 hongos fitopatógenos. CF₅₀: *F. oxysporum* = 6.63 mg/mL, *F. subglutinans* = 5.73 mg/mL, *Fusarium sp.* = 7.01 mg/mL y *F. graminearum* = 6.44 mg/mL.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Erythrina americana* Miller y *Erythrina coralloides* DC. (FABACEAE)

Con respecto al extracto de AcOEt de flores de *E. americana* (Figura 5), se encontró que éste presentó la mayor actividad de todos los extractos, pues con la concentración de 8 mg/mL se inhibió más del 70% del crecimiento radial de los cuatro hongos. De éstos, *Fusarium* sp. (raíz de *Gerbera*) fue el más sensible $CF_{50} = 2.94$ mg/mL, en contraste, el microorganismo más resistente fue *F. graminearum*. $CF_{50} = 5.92$ mg/mL.

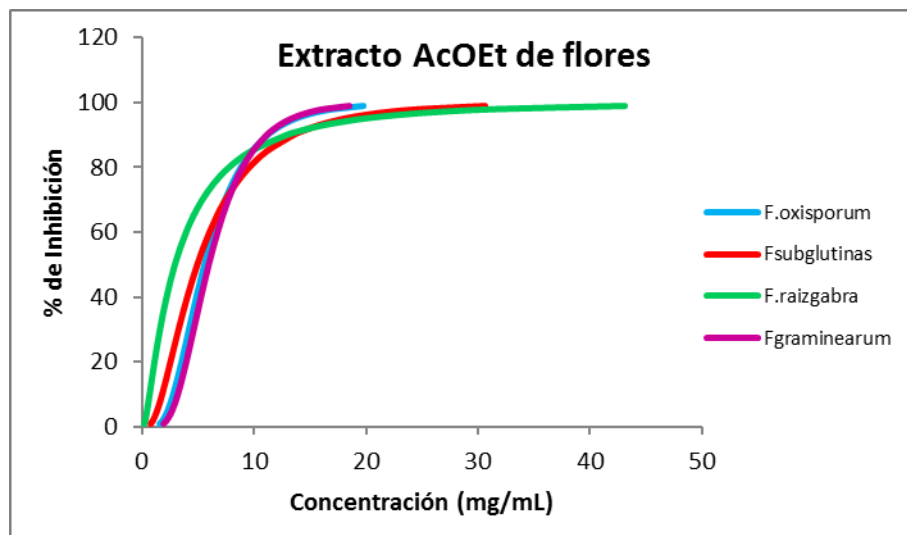


Figura 5. % de inhibición del extracto de Acetato de etilo de tallo sobre 4 hongos fitopatógenos. CF_{50} : *F. oxysporum* = 5.55 mg/mL, *F. subglutinans* = 4.49 mg/mL, *Fusarium* sp. = 2.94 mg/mL y *F. graminearum* = 5.92 mg/mL.

En el Cuadro 4 se muestran los valores de CF_{50} calculados después del análisis de Probit con el extracto de AcOEt de tallo y de AcOEt de flores de *E. americana*.

Cuadro 4. CF_{50} de extractos acetato de etilo de flores y de tallo de *E. americana*

Hongo	CF_{50} (mg/mL)	
	Ext. AcOEt Flores	Ext. AcOEt Tallo
<i>F. oxysporum</i>	5.55	6.63
<i>F. subglutinans</i>	4.49	5.73
<i>F. sp</i>	2.94	7.01
<i>F. graminearum</i>	5.92	6.44

Los extractos acuoso liofilizado de tallo y acuoso liofilizado de hojas de *E. americana* y la fracción de alcaloides libres en metanol de *E. coralloides* no inhibieron el crecimiento radial de los cuatro hongos probados.

VII.5. Análisis Preliminar Fitoquímico

Se realizó la caracterización cualitativa de los metabolitos presentes en los extractos AcOEt de flores y AcOEt tallo de *Erythrina americana*, de AcOEt de hojas *Erythrina coralloides*. A través de pruebas colorimétricas se determinó la presencia de alcaloides y flavonoides en los extractos, el extracto de AcOEt de flores de *E. americana* dio la reacción colorimétrica más intensa para ambos metabolitos. La presencia de saponinas triterpenoides se detectó en el extracto AcOEt de tallo de *E. americana*, mientras que saponinas esteroidales y taninos derivados del catecol dieron prueba positiva en el extracto AcOEt de flores también de *E. americana*. En el caso del extracto de hojas de *E. coralloides* se detectó la presencia de alcaloides y flavonoides, con una reacción de coloración menos intensa (Cuadro 5).

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Erythrina americana* Miller y *Erythrina coralloides* DC. (FABACEAE)

Cuadro 5. Análisis Preliminar Fitoquímico de los extractos de acetato de etilo de flores y tallo de *Erythrina americana* y extracto de acetato de etilo de hojas de *Erythrina coralloides*

Compuestos	Extracto de Acetato de etilo de flores <i>E. americana</i>	Extracto de Acetato de etilo de tallo <i>E. americana</i>	Extracto de Acetato de etilo de hojas <i>E. coralloides</i>
Alcaloides	++	-	+
Flavonoides	++	++	+
Glucósidos cianogénicos	-	-	-
Azúcares reductores	-	-	-
Saponinas esteroideas	++	-	-
Saponinas triterpenoides	-	+	-
Taninos	++ derivados de catecol	-	-

Nota: + = presencia, - = ausencia. Quinonas, cumarinas, glucósidos cardiacos y sesquiterpenlactonas ausentes en los tres extractos.

VII.6. Cuantificación de flavonoides totales

La cuantificación de flavonoides totales se realizó en los extractos de AcOEt de tallo y flores de *E. americana* y hojas de *E. coralloides* y el contenido se expresó en mg equivalentes de quercetina (QE) por g de muestra (Cuadro 6). Los resultados mostraron que en el extracto de AcOEt de tallo de *E. americana* hay 08.10 ± 0.20 mg eq de QE/g de muestra, el extracto de AcOEt de hojas dio 23.11 ± 0.76 mg eq QE/g muestra, el extracto con más contenido de flavonoides fue el de acetato de flores con una concentración 35.33 ± 1.29 mg QE/g de muestra. Por último, se realizó la cuantificación del extracto acuoso-lioofilizado de hojas de *E. coralloides*, el cual mostro una concentración de 21.51 ± 0.35 mg QE/g de muestra.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE *Erythrina americana* Miller y *Erythrina coralloides* DC. (FABACEAE)

Cuadro 6. Cuantificación de flavonoides totales de extractos de *E. americana* y *E. coralloides*

Extracto	Concentración de flavonoides totales [mg eq. de Quercetina/g de muestra]
Hojas Acetato	23.11±0.76
Tallo Acetato	08.10±0.20
Flores Acetato	35.33±1.29
Hojas Acuoso Liof.	21.51±0.35

VIII. DISCUSIÓN

A partir del conocimiento que se tiene del uso de especies del género *Erythrina* para el tratamiento de infecciones respiratorias, de la piel, garganta y vías urinarias, así como la escasa evidencia científica de su actividad antifúngica y antibacteriana; en este estudio se evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de dos especies de *Erythrina* que crecen en nuestro país, sobre bacterias de importancia clínica y hongos fitopatógenos.

VIII. 1. Rendimiento de los extractos

Los datos de rendimiento obtenidos con los tres extractos del tallo de *E. americana*, sugieren que los compuestos de mediana polaridad son los más abundantes (extracto de acetato de etilo 3.22%) y que la presencia de compuestos no polares (extracto hexánico 0.070%) es mucho menor que de compuestos polares (extracto metanólico 2.73%). Los rendimientos obtenidos en este estudio con los extractos de tallo difieren de los reportados por Rukachaisirikul *et al.* (2007) quien alcanzó un rendimiento de 0.59% en el extracto hexánico de raíces de *E. stricta* y de 0.92% en el extracto hexánico de corteza de *E. subumbrans*; mientras que un rendimiento del 5.4% se obtuvo con el extracto cetónico de corteza de tallo de *E. fusca* (Chukwujekwu *et al.*, 2011). Estas diferencias pueden explicarse en términos del método de extracción ya que ellos extrajeron en equipo Soxhlet y por sonicación y en este estudio la extracción se hizo por maceración; así como el disolvente usado, la especie trabajada y el órgano vegetal analizado; esto último, ya que se sabe que los metabolitos se distribuyen en las diferentes partes de la planta dependiendo de la función que desempeña cada compuesto y las necesidades de la planta (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Por otra parte, con los extractos hexánico y de acetato de etilo de hojas de *E. coralloides*, los rendimientos fueron de 0.916 % y 0.5786% respectivamente. El rendimiento con el extracto hexánico de hojas fue similar a lo reportado por Rukachaisirikul *et al.* (2007) con el extracto de corteza de *E. subumbrans*.

En otro estudio, Calle *et al.* (1997) obtuvieron un rendimiento de 9.1% con el extracto etanólico de corteza de *E. fusca*, en este estudio el rendimiento con el extracto agua-EtOH liofilizado de hojas frescas fue de 1.32 % y con el de tallo fue de 0.25 %, ambos extractos de *E. americana*; aquí también las diferencias pueden explicarse en términos del método de extracción, la especie y órgano vegetal estudiado.

VIII. 2. Evaluación de la actividad antibacteriana

Los extractos (tallo: Hx, AcOEt, MeOH y liofilizado; hoja: liofilizado y flores: AcOEt de *E. americana*; hoja: Hx y AcOEt, la fracción de alcaloides libres en Me-OH y alcaloides liberados por hidrólisis de *Erythrina coralloides* fueron probados contra diez cepas bacterianas. El extracto de acetato de etilo de tallo de *E. americana* presentó la mayor actividad inhibiendo 6 de las 10 cepas. *S. aureus* resultó ser la cepa más sensible pues el extracto mostró un halo de 11.2 mm con la concentración de 2 mg/disco y la CMI fue de 0.5 mg/mL, mientras que la CMB fue de 4 mg/mL (Cuadro 2). Estos resultados son comparables con los reportados por Nagaraja *et al.* (2011), quienes obtuvieron con un extracto de cloroformo (polaridad cercana) de corteza de *E. mysorensis*, halos de 8, 12 y 16 mm con concentraciones de 50, 100 y 200 µg/mL y con el trabajo de Chukwujekwu *et al.* (2011) quienes reportaron para cuatro flavonoides obtenidos de un extracto cetónico de corteza de *E. senegalensis*, CMI de 31, 7.8, 3.9 y 125 µg/mL sobre *S. aureus*. Al igual que Sato *et al.* (2005) quienes hallaron MIC por debajo de 4 µg/mL de isoflavonas aisladas de un extracto cetónico de corteza de *Erythrina variegata*. Es importante hacer notar que las concentraciones del extracto de acetato de tallo activas evaluadas en este estudio, resultaron ser más altas que las de estos autores; diferencias que pueden ser debidas a la especie, el tejido en estudio y al método de extracción, Nagaraja *et al.* (2011) hicieron extracción clorofórmica de la corteza de tallo usando equipo Soxhlet. Por otro lado, Chukwujekwu *et al.* (2011) y Sato *et al.* (2005) evaluaron compuestos puros, lo que explica que las concentraciones activas hayan presentado los valores más bajos.

Los liofilizados de extractos acuosos de tallo y de hojas de *E. americana* presentaron inhibición únicamente sobre *S. typhi*. Dichos resultados difieren de lo encontrado por Nagaraja *et al.* (2011), quienes reportaron que el extracto etanólico (polaridad cercana) de la corteza de *E. mysorensis* presentó actividad con halos de 8-16 mm sobre 4 cepas bacterianas incluida *S. aureus*. El extracto hexánico de hojas de *E. coralloides* mostró inhibición sólo en *S. aureus*. Lo anterior sugiere la necesidad de probar concentraciones más altas para evaluar la actividad antibacteriana de estos extractos, y por otro lado, obtener extractos por el método de extracción en Soxhlet y evaluar su actividad.

La fracción de alcaloides libres en metanol de semillas de *E. coralloides* inhibió el crecimiento de *S. aureus* y *E. gglomerans*; sin embargo, en la prueba de CMI no mostró actividad inhibitoria. Finalmente, el extracto de alcaloides liberados de semillas *E. coralloides* presentó actividad inhibitoria en *S. typhi*, *K. rhinoscleromatis* y *S. aureus*. En la prueba de CMI y CMB, *S. aureus*, *E. agglomerans*, *K. rhinoscleromatis* y *S. typhi* presentaron valores de CMI de 0.5, 1.5, 2 y 0.75 mg/mL y una CMB de 0.75, 4 y 4 mg/mL respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportes sobre la actividad antibacteriana de algunos alcaloides aislados de diversas plantas (Wink y Schimmer, 1999).

VIII.3. Evaluación de la actividad antifúngica

El extracto con la mayor actividad antifúngica fue el de acetato de etilo de flores de *E. americana* que inhibió el crecimiento de los cuatro fitopatógenos *Fusarium* sp., *F. subglutinans*, *F. oxysporum* y *F. graminearum* con CF₅₀ de 2.94, 4.49, 5.55 y 5.92, respectivamente. Puede observarse que el hongo más sensible a este extracto fue *Fusarium* sp. La actividad notoria de este extracto puede deberse a la presencia de flavonoides, ya que este extracto presentó el mayor contenido de estos compuestos.

Por otro lado, el efecto inhibitorio con 4 mg/mL de extracto de acetato de etilo de tallo fue de 40% sobre a *F. subglutinans*, de 24% para *F. oxysporum*, de 7% para

F. graminearum y de 5% para *Fusarium* sp. Como era de esperarse, el incremento a 6 mg/mL, elevó considerablemente el porcentaje de inhibición en las cuatro especies mencionadas (*F. graminearum* 69%, *F. subglutinans* 61%, *F. oxysporum* 58% y *F. sp.* 55%). Estos datos muestran que *Fusarium* sp. resultó ser el hongo más sensible al extracto de acetato de etilo de tallo y *F. oxysporum* el más resistente.

La falta de inhibición del crecimiento micelial con los liofilizados de tallo y de hojas puede deberse a que hubiera baja concentración de metabolitos con propiedades anti fúngicas en estos extractos, o también pudo haber un efecto de bloqueo de la actividad debido a la sinergia entre los constituyentes del extracto, ya que actividad antifúngica ha sido reportada en los extractos acuoso y etanólico de la corteza de tallo de *E. mysorensis* (halos de 6 a 15 mm con 50, 100 y 200 µg/mL sobre *Aspergillus niger*) y en el extracto metanólico de la corteza de tallo de *E. senegalensis* (CMI de 30 mg/mL sobre *A. flavus* y *A. fumigatus*) (Nagaraja *et al.*, 2011 y Doughari, 2010).

El extracto de alcaloides libres en metanol de semillas de *E. coralloides* no tuvo actividad antifúngica, este resultado contrasta con lo reportado por Ibarra *et al.* (2009), quienes encontraron que el alcaloide erisovina (en una concentración de 8 mg/mL) tuvo efecto sobre cepas de *B. cinerea*, *F. oxysporum* y *M. fructicola*; y tuvo una actividad menor en *A. solani*, *Penicillium* sp. y *T. harzianum*. El resultado negativo obtenido en este estudio con el extracto de alcaloides libres en metanol, posiblemente se deba a que se está evaluando una mezcla de alcaloides y no un alcaloide puro, es decir, si algún alcaloide presente en este extracto tuviera actividad, ésta pudo verse disminuida por la presencia de otros alcaloides sin actividad incluidos en el extracto; por lo tanto, no se puede descartar la posibilidad de que esta fracción cuente con alcaloides con propiedad antifúngica. Es importante hacer notar que la inhibición con el alcaloide erisovina (Ibarra *et al.*, 2009), fue ligeramente menor a la inhibición reportada por San Miguel-Chávez y Soto-Hernández (2009) quienes trabajaron la actividad antifúngica de un extracto crudo de alcaloides. Los autores advierten que estas diferencias pueden deberse a la sinergia resultado de la

combinación de todos los componentes presentes en el extracto crudo. Por lo tanto, es necesario ampliar el estudio sobre el efecto anti fúngico de fracciones alcaloideas y alcaloides puros de especies de *Erythrina*.

El análisis preliminar fitoquímico de los extractos de acetato de etilo de las dos especies de *Erythrina* reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos y saponinas; siendo los dos primeros los más abundantes. Estos datos son consistentes con lo reportado por Pino *et al.* (2004) quienes indican que flavonoides y alcaloides son los metabolitos más frecuentes en el género *Erythrina*. Por otro lado, la cuantificación de flavonoides totales indicó que el extracto con la mayor concentración de flavonoides expresados como mg de quercetina/g de extracto fue el de acetato de etilo de flores (35.33 ± 1.29 mg eq de QE/mg de extracto) y el extracto con la menor cantidad de flavonoides fue el de tallo (8.10 ± 0.20 mg eq de QE /mg de extracto), ambos obtenidos de *E. americana*.

Este análisis también evidenció que flavonoides y taninos estuvieron presentes en flores (extracto de AcOEt) de *E. americana*, mientras que tallos y hojas (extracto de AcOEt) de *E. coralloides* sólo presentaron flavonoides; lo que sugiere que la actividad inhibitoria de las flores, hojas y tallos sobre algunas de las bacterias y los hongos filamentosos (ver apartado de Resultados) puede deberse a estos metabolitos secundarios detectados en *E. americana* y *E. coralloides*. Esta propuesta se sustenta en reportes que indican que los flavonoides y taninos presentes en las plantas, son importantes en la defensa contra infecciones y lesiones, y que en general actúan como buenos agentes antimicrobianos (Ekbote, 2010 y Croteau, *et al.*, 2000). Adicionalmente. Sato *et al.* (2006) reportaron que las isoflavonas de la corteza de tallo de *Erythrina poeppigiana* inhibieron el crecimiento de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina; mientras que otras isoflavonas que no presentaron actividad, incrementaron la susceptibilidad de estos microorganismos, cuando fueron combinadas con meticilina u oxacilina. Calle *et al.* (1997) observaron que dos fracciones del extracto de cloruro de metileno de corteza de *E. fusca* inhibieron el crecimiento de *Mucor sp.*, *F. oxysporum dianti* y *Aspergillus niger*. Tales fracciones

contenían flavonoides. Algunos de los mecanismos propuestos para explicar la actividad antimicrobiana de los flavonoides es que interfieren en la incorporación de H³-Serina (Xu y Lee, 2001), pueden inhibir la incorporación de timidina y la incorporación de glucosa responsable de la producción de ácidos orgánicos (Sato *et al.*, 2003). Mientras que los taninos pueden inhibir la actividad enzimática (Wink y Schimmer, 1999). También hay reportes señalando que los taninos inhiben a la β -lactamasa, pueden afectar la integridad de la membrana y se pueden unir directamente al peptidoglicano provocando un desacomodo de esta capa (Reichling, 2009).

Alcaloides y saponinas esteroidales, que estuvieron presentes en el extracto de AcOEt de flores de *E. americana*, pueden estar involucrados en la actividad antifúngica de este extracto. Esto concuerda con Doughari (2010), quien reportó la presencia de los mismos metabolitos en extractos de la corteza del tallo de *E. senegalensis*, dichos extractos mostraron también actividad antifúngica. Entre los varios mecanismos propuestos para explicar tal actividad, están los siguientes: se sabe que los alcaloides inhiben enzimas de metabolismo de carbohidratos, también pueden intercalarse con el ADN para detener la síntesis de proteínas o provocar síntesis de proteínas defectuosas (Wink y Schimmer, 1999). Algunos alcaloides reaccionan con grupos aniónicos y grupos nucleofílicos de aminoácidos o de otras moléculas como receptores o enzimas, inhibiendo su función. Otros interaccionan con enzimas de transcripción (Sepúlveda, *et al.*, 2003). El extracto de acetato de flores de *E. americana* también dio prueba positiva para saponinas y se ha indicado que éstas causan tensión de las biomembranas y fugas (escape/filtración) (Wink y Schimmer, 1999) lo que puede explicar la actividad antifúngica de este extracto.

Los resultados de la cuantificación de flavonoides totales indicaron que el extracto de AcOEt de tallo presentó la menor cantidad de estos compuestos; a pesar de ello, este extracto mostró actividad inhibitoria en el crecimiento de cuatro hongos (*F. oxisporum*, *F. subglutinans*, *F. sp.* y *F. graminearum*) superior al 50%. En contraste, el extracto acuoso liofilizado de tallo tuvo una mayor presencia de

flavonoides (21.51 mg eq de QE/g de muestra), pero no presentó actividad antifúngica. Estos resultados sugieren que aunque hubo más flavonoides en el extracto liofilizado, estos metabolitos no tienen propiedades antifúngicas, mientras que los flavonoides presentes en el extracto de AcOEt de tallo si tienen tales propiedades. Esta idea puede ser apoyada por el trabajo de Tsai y Phillips (1991) quienes encontraron que algunos flavonoides de semillas de alfalfa promovieron el crecimiento de las hifas del hongo *Glomus* sp., algunos no tuvieron este efecto, y otros tuvieron un efecto inhibitorio de la germinación de esporas.

Es importante mencionar la usencia de glucósidos, esteroides y compuestos fenólicos en los extractos de las dos especies de *Erythrina* aquí estudiados; estos metabolitos ya se han reportado en los extractos de la corteza de tallo de *E. mysorensis* (Nagaraja *et al.*, 2011).

Hay un consenso generalizado sobre el uso de concentraciones entre 2 y 4 mg de una sustancia para evaluar su potencial como antimicrobiano. Sin embargo, con base en el efecto antifúngico alto obtenido en esta investigación con dosis superiores (6 y 8 mg/mL), se considera que es necesario ampliar el intervalo de las concentraciones para las pruebas de actividad antimicrobiana, ya que el uso de las concentraciones estándar mencionadas puede dar lugar a conclusiones parciales o sesgadas.

En términos generales, los resultados del presente estudio permiten proponer a flavonoides, alcaloides, taninos y/o saponinas como los constituyentes responsables de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de *E. americana* y *E. coralloides*.

Es importante resaltar que este es el primer trabajo donde se reporta la actividad antibacteriana de extractos de acetato de etilo de tallo de *E. americana* y fracciones alcaloideas de semillas de *E. coralloides*, especies que se distribuyen en nuestro país. También se reporta la actividad antifúngica de extractos de acetato de etilo de *E. americana* y *E. coralloides* en *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp.,

Fusarium subglutinans y *Fusarium graminearum*, todos ellos, hongos de importancia fitosanitaria ya que generalmente se encuentran en una gran variedad de productos agrícolas, y son los contaminantes naturales de los alimentos mayormente distribuidos a nivel mundial, además de que debido a la capacidad de producir micotoxinas también están relacionadas con enfermedades en humanos (Guarro, 2012, Méndez-Albores y Moreno-Martínez, 2009).

IX. CONCLUSIONES

1. Se evidenció el potencial antibacteriano del extracto de acetato de etilo de tallo de *Erythrina americana*.
2. La bacteria más sensible a este extracto fue *S. aureus*.
3. Las fracciones alcaloideas de semillas de *E. coralloides* tuvieron una actividad antibacteriana considerablemente menor, en términos de cepas inhibidas, en comparación al extracto de tallo de *E. americana*.
4. La cepa más sensible a la fracción de alcaloides liberados fue *S. typhi*.
5. La concentración de 8 mg/mL de los extractos de acetato de etilo de tallo y de acetato de etilo de flores de *E. americana* inhibieron más del 50% del crecimiento de los 4 hongos del género *Fusarium*.
6. *Fusarium subglutinans* fue el más sensible al extracto de AcOEt de tallo, mientras que *Fusarium sp.* fue el más resistente.
7. *Fusarium sp.* fue el más sensible al extracto de AcOEt de flores, *Fusarium graminearum* fue el más resistente.
8. Se determinó la presencia de flavonoides, alcaloides, taninos y saponinas en los extractos de acetato de etilo de *Erythrina americana* y *Erythrina coralloides*.
9. El extracto de acetato de etilo de flores de *E. americana* presentó el contenido más alto de flavonoides de acuerdo con la CFT y también de alcaloides, taninos y saponinas según las pruebas colorimétricas. Este extracto tuvo la mayor actividad antifúngica.

X. PERSPECTIVAS

1. Es necesario hacer más estudios enfocados a evaluar el efecto antimicrobiano de las fracciones alcaloideas y alcaloides puros obtenidos de semillas de especies de *E. americana* y *E. coralloides*.
2. Continuar con el aislamiento y caracterización de flavonoides presentes en flores y tallos de estas dos especies de *Erythrina*.
3. Realizar el fraccionamiento biodirigido de los extractos de *Erythrina* para identificar que otros compuestos podrían ser responsables de la actividad antimicrobiana.
4. Realizar estudios tendientes a determinar el mecanismo de acción antimicrobiano de tales compuestos.

XI. LITERATURA CITADA

- Arango, M. M. C. (2006). *Plantas medicinales: botánica de interés médico*. Colombia: Artes Gráficas Tizan.
- Ayala, L. A. L. & Espinosa, G. F. J. (2006). La química que entretiene a los seres vivos. *Ciencias*, 83: 4-13.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. Consultado el 6 de agosto de 2012 en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>
- Biodiversidad Mexicana. (2013). Consultado el 10 de octubre de 2013 en <http://www.biodiversidad.gob.mx/Difusion>
- Caballero, J. & Cortés, L. (2001). Percepción, uso y manejo tradicional de los recursos vegetales en México. En Rendón, B., Rebollar, S., Caballero, J. & Martínez, M.A. (Eds.). *Plantas, cultura y sociedad. Estudio sobre la relación entre los seres humanos y plantas en los albores del siglo XXI* (pp. 79-100). Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa y Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. México, D.F.
- Calle, A. J., Pinzón, S. R., Ospina, F. L., Medina, C. N., Carrión, A. & Bautista, E. (1997). Alcaloides isoquinólicos de la corteza y flores de *Erythrina fusca* Loureiro. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 26: 39-42.
- Chevallier, A. (2003). *Hierbas curativas: guía práctica*. Madrid, España: Pearson Educación.
- Chukwujekwu, J. C., Van Heerden, F. R. & Van Staden, J. (2011). Antibacterial Activity of flavonoids from the stem Bark of *Erythrina caffra* Thunb. *Phytotherapy Research*, 25: 46–48.
- CLSI (2013). Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. Consultado de 14 de enero de 2014 en www.clsi.org.
- Cordiés, L. J.; Machado, L. A. R. & Hamilton, M. L. C. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta médica*, 8(1):13-27.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. & Lewis, N. G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). En Buchanan, B., Gruissem, W. & Jones, R. (Eds), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (pp. 1250-1318). Estados Unidos: American Society of Plant Physiologists.

- Dirzo, R. (1985). Metabolitos secundarios en las plantas. *Ciencia*, 36: 137-145.
- Doughari J. H. (2010). Evaluation of antimicrobial potentials of stem bark extracts of *Erythrina senegalensis* DC. *African Journal of Microbiology Research*, 4(17): 1836-1841.
- Fernández, R. F., López, H. J., Ponce, M. L. M. & Machado, B. C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana Médico Militar*, 32(1): 44-8.
- Folkers, K. & Unna, K. (1939) *Erythrina* alkaloids V. Comparative Curare-like Potencies of Species of the Genus *Erythrina*. *J. Pharm Assoc*, 28:1019.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F. y Weissfeld, A. S. (2004). *Bailey & Scott Diagnóstico Microbiológico*. México: Médica Panamericana.
- Games, D. E.; Jackson, A. H.; Khan, N. A. & Millington, D. S. (1974). Alkaloids of some African, Asian, Polynesian and Australian Species of *Erythrina*. *Lloydia*, 37: 581-588.
- Garín-Aguilar, M. E., Ramírez, L. J. E., Soto Hernández, M., Valencia del Toro, G., & Martínez, V. M. (2000). Effect of crude extracts of *Erythrina americana* Mill. on aggressive behaviour in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 69(2): 189-196.
- Greca, A. A. (2000). La resistencia bacteriana y los nuevos antibióticos. VI Jornadas Internacionales de Medicina Interna - X Jornadas de Medicina Interna del Litoral Argentino. Enfermedades Regionales.
- Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(1): 33–39
- Hastings, R. B. (1990). Medicinal legumes of Mexico: Fabaceae, Papilionoideae, Part one. *Economic Botany*, 44(3): 336-348.
- Ibarra, E. E.; Téllez, M. R.; Soto, H. M.; Martínez, V. M.; García, M. R. & San Miguel, C. R. (2009). Actividad antimicótica in vitro de erisovina. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4): 327-330.
- Koneman, E. W. (2004). Pruebas de sensibilidad a agentes antimicrobianos. En Koneman, E. W. Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. & Winn, W. C. (Eds.), *Diagnóstico Microbiológico* (pp. 763-832). México: Médica Panamericana.
- Lozoya, L. X. (1989). La medicina tradicional en la realidad político-social de México. *Ciencias*, 27-33.
- Madigan, T. M., Martinko, M. J. Dunlap, V. P. & Clark, P. D. (2009). *Brock. Biología*

- de los microorganismos. Madrid, España: Pearson Prentice Hall.
- Martínez, M. (1996). *Las plantas medicinales de México*. México: Botas.
- Maruthi, E. T., Ramesh, C. K. & Mahmood, M. (2010). Evaluation of anthelmintic and antimicrobial activities of *Azima tetraacantha* Lam. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1): 375-381.
- Méndez-Albores, A. y Moreno-Martínez, E. (2009). Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. *Revista Ciencia*, 61: 1-7.
- Muñetón, P. P. (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Dr. Erick Estrada Lugo. *Revista Digital Universitaria*, 10(9): 1-9.
- Nagaraja, T. S., Mahmood, R., Krishna, V. & Maruthi, T. E. (2011). Evaluation of antimicrobial activity of *Erythrina mysorensis* Gamb. *International Journal of Drug Development & Research*, 3(2): 198-202.
- Neill, D. A. (1988). Experimental studies on species relationships in *Erythrina* (Leguminosae: Papilionoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 73(3): 886-969.
- Pino, R. S., Prieto, G. S., Pérez, R. M. E. & Molina, T. J. (2004). Género *Erythrina*: fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(2): 252-258.
- Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. (2002). *Microbiology*. Bogotá: McGraw-Hill.
- Redko, F., Clavin, M. L., Weber, D., Ranea, F., Anke, T. & Martino, V. (2007). Antimicrobial Isoflavonoids from *Erythrina crista galli* Infected with *Phomopsis* sp. *Z. Naturforsch C.*, 62(3-4): 164-168.
- Reichling, J. (2009). Plant-microbe interactions and secondary metabolites with antibacterial, antifungal and antiviral properties. En Wink, M. (Ed), *Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites* (pp. 214-347). Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
- Ribeiro, M. D.; Onusic, G. M.; Poltronieri, S. C. & Viana, M. B. (2006). Effect of *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in rats submitted to animal models of anxiety and depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(2): 263-270.
- Rivera-Arce, E., Chávez-Soto, M. A., Gattuso, M. & Lozoya, L. X. (2003). La hoja de guayabo en el tratamiento de afecciones gastrointestinales. *Revista de*

Fitoterapia, 3(2): 101-111.

Royal Botanic Gardens (2012). Kew Royal Botanic Gardens. Consultado el 27 de abril de 2012 en www.kew.org.

Rukachaisirikul, T., Saekee, A., Tharibun, C., Watkuolham, S. & Suksamrarn, A. (2007). Biological activities of the chemical constituents of *Erythrina stricta* and *Erythrina subumbran*. *Archives of Pharmacal Research*, 30(11): 1398-1403.

San Miguel-Chávez, R. & Soto-Hernández, M. (2009). Chemical composition and antifungal activity of the alkaloid extract of *Erythrina americana* Miller seedlings. *J. Agric. Food Chem.*

Sánchez, H. S., Soto, H. R. M., Kite, G. & García, M. M. R. (2001). Identificación de alcaloides en las inflorescencias de *Erythrina americana* Miller. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 7(1): 37-48.

Sato, M., Tanaka, H., Fujiwara, S., Hirata, M., Yamaguchi, R., Etoh, H., & Tokuda, C. (2003). Antibacterial property of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against cariogenic oral bacteria. *Phytomedicine*, 10(5): 427-433.

Sato, M., Tanaka, H., Tani, N., Nagayama, M. y Yamaguchi, R. (2006). Different antibacterial actions of isoflavones isolated from *Erythrina poeppigiana* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 43(3): 243-248.

Secretaria de Salud (2014). Anuarios. Consultado el 4 de septiembre de 2014 en www.dgepi.salud.gob.mx.

Sepúlveda, J. G., Porta, D. H. & Rocha, S. M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.*, 21(3): 355-363.

Setti-Perdigão, P.; Serrano, M. A. R.; Flausino, O. A.; Jr.; Bolzani, V. S.; Guimarães, M. Z. P. & Castro, N. G. (2013). *Erythrina mulungu* Alkaloids Are Potent Inhibitors of Neuronal Nicotinic Receptor Currents in Mammalian Cells. *PLOS ONE*, 8(12): 1-6.

Soto-Hernández R. M., García-Mateos, R., San Miguel-Chávez, R., Kite, G., Martínez-Vázquez, M. & Ramos-Valdivia, A. C. (2012). *Erythrina*, a Potential Source of Chemicals from the Neotropics. In Rasooli, I (Ed.), *Bioactive Compounds in Phytomedicine*, Available from: <http://www.intechopen.com/books/bioactive-compounds-in-phytomedicine/erythrina-a-potential-source-of-chemicals-from-the-neotropics>

The MathWorks, 2011. Programa matemático MATLAB Ver. 7.12.0 R2011a.

Tolosa, L. & Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 43(1-2): 187-204.

Tropicos. (2012). Missouri Botanical Garden. Consultado el 27 de abril de 2012 en www.tropicos.org.

Tsai, S. M. & Phillips, D. A. (1991). Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5): 1485-1488.

Upadhyay, B., Singh, K. P. & Kumar, A. (2010). Ethno-medicinal, phytochemical and antimicrobial studies of *Euphorbia tirucalli* L. *Journal of Phytology*, 2(4): 65-77.

Valencia, D. T. G. & Garín, A. M. E. (2010). *Manual de prácticas de productos naturales*. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología.

Wang, H. & Ng, T. B. (2002). Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*, 6(1): 1-6.

WHO (2011). World Health Organization, graphics. Consultado el 4 de septiembre de 2011 en <http://gamapserver.who.int>.

Wink, M. & Schimmer, O. (1999). Modes of action of defensive secondary metabolites. En Wink, M. (Ed.), *Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology* (pp. 17-134). Inglaterra: Sheffield Academic Press.

Wosky, R. G. & Salatino, A. (1998). Analisis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, 37(2): 99-105.

Zar, J. (2010). Biostatistical analysis. New Jersey: Prentice Hall.

APÉNDICES

Apéndice 1



Figura 6. Ejemplar de *Erythrina americana* en Herbario IZTA.



Figura 7. Ejemplar de *Erythrina coralloides* en Herbario IZTA

Apéndice 2

Gráficas del % de inhibición de los hongos cuyos valores fueron menores al 50%.

El extracto metanólico de tallo de *E. americana* inhibió 26% del crecimiento de *F. subglutinans* (Figura 8), hasta 28% del crecimiento de *Fusarium sp* (Figura 9) y menos del 12% del crecimiento de *F. graminearum* (Figura 10). No mostró actividad sobre *F. oxysporum* (no se muestran datos).

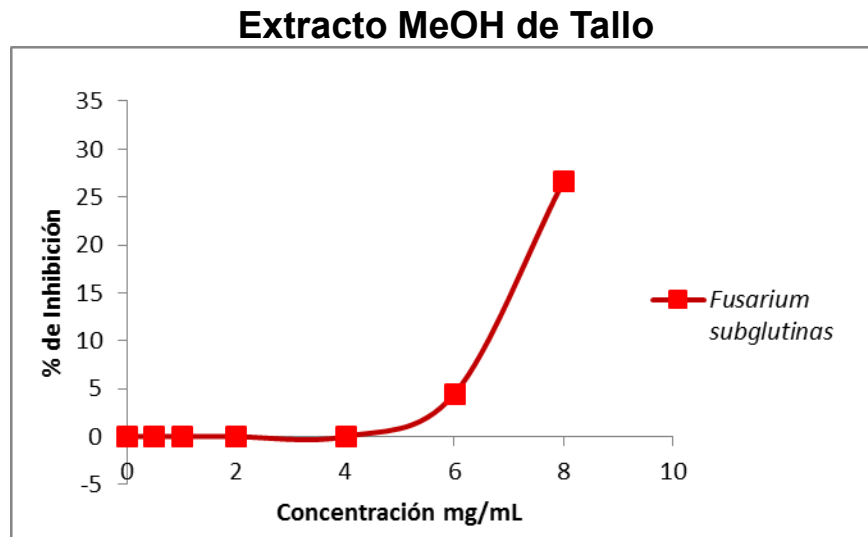


Figura 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto metanólico de tallo de *E. americana* sobre *Fusarium subglutinans*.

Extracto MeOH de Tallo

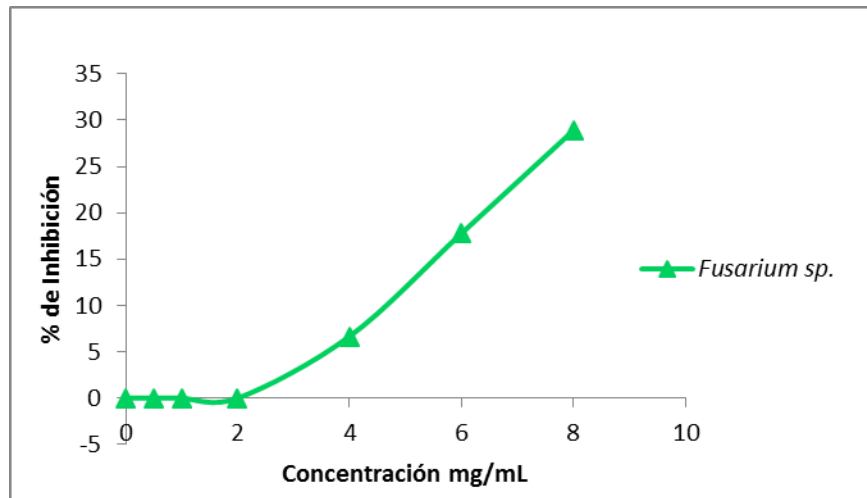


Figura 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto metanólico de tallo de *E. americana* sobre *Fusarium sp.*

Extracto MeOH de Tallo

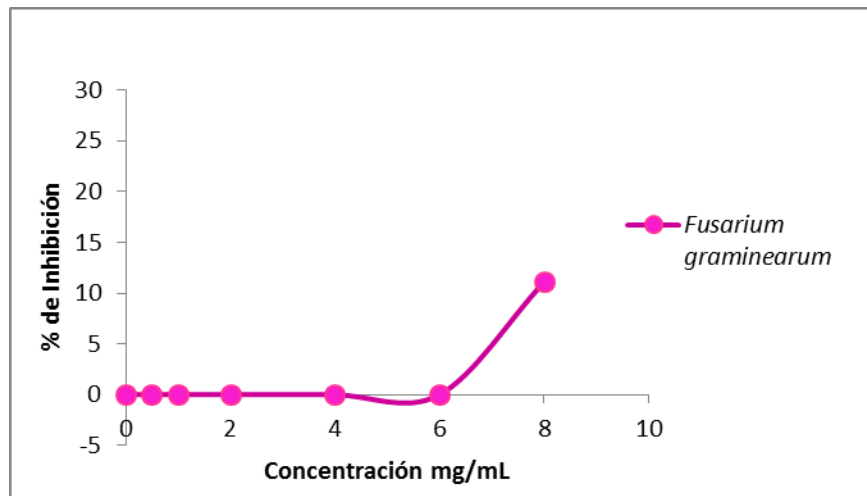


Figura 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto metanólico de tallo de *E. americana* sobre *Fusarium graminearum*.

Para el extracto de AcOEt de hojas de *E. coralloides* se puede observar que en *F. oxysporum* hubo la mayor inhibición (8.8 %) (Figura 11), en la dosis de 8 mg/mL. *F. subglutinans* (Figura 12) y *F. sp.* (Figura 13) resultaron poco sensibles a todas las dosis (inhibición menor a 3%) y *F. graminearum* presentó 6.6% de inhibición (Figura 14).

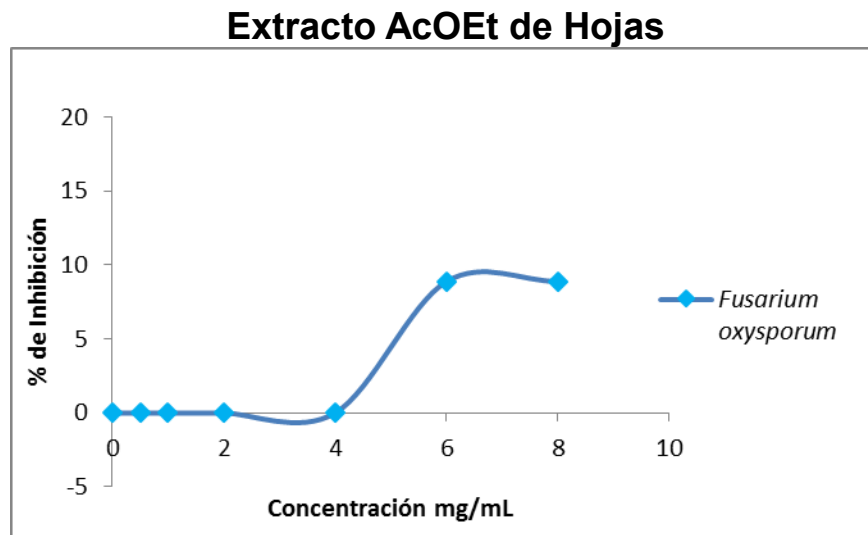


Figura 11. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto de acetato de etilo de hojas de *E. coralloides* sobre *Fusarium oxysporum*.

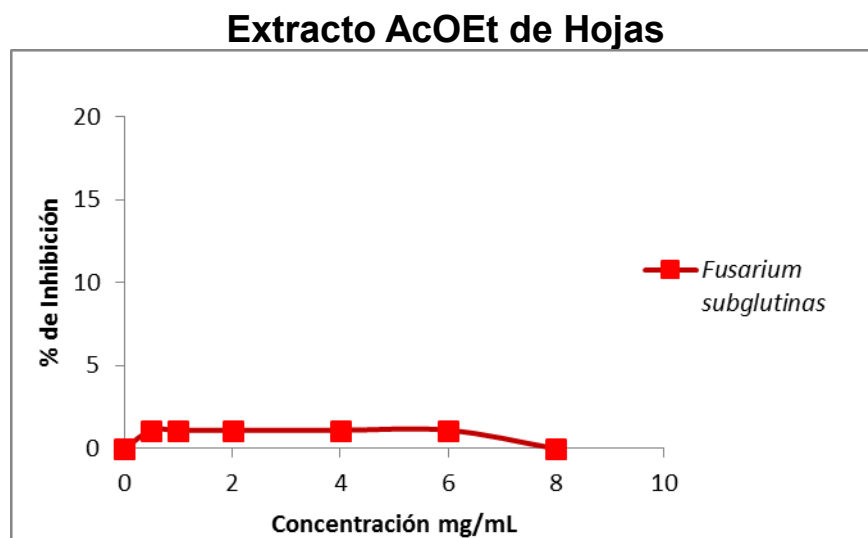


Figura 12. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto de acetato de etilo de hojas de *E. coralloides* sobre *Fusarium subglutinans*.

Extracto AcOEt de Hojas

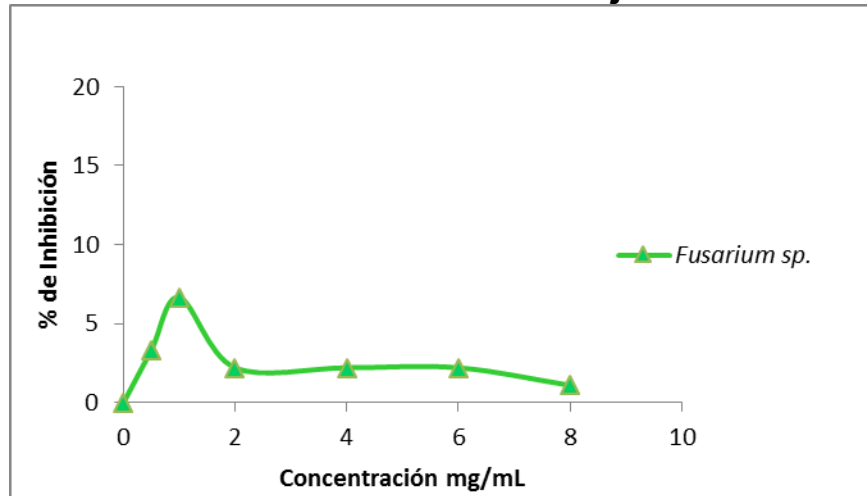


Figura 13. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto de acetato de etilo de hojas de *E. coralloides* sobre *Fusarium sp.*

Extracto AcOEt de Hojas

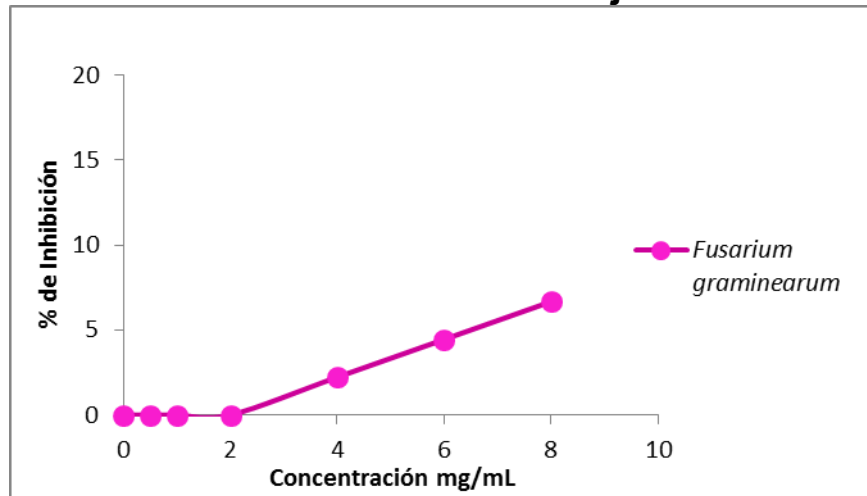


Figura 14. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del extracto de acetato de etilo de hojas de *E. coralloides* sobre *Fusarium graminearum*.