

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA**

**PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN  
CIENCIAS AMBIENTALES**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**EXTRACCIÓN, CUANTIFICACIÓN Y VALORACIÓN BIOLÓGICA DEL  
EXTRACTO DE HOJAS DE *Larrea tridentata* (SESSÉ & MOC. EX DC.)  
COVILLE PARA SU USO COMO AGENTE BIOCIDA**

**PRESENTA:**

**SAMUEL LÓPEZ AGUIRRE**

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Juan Carlos García López

**ASESORES:**

Dr. Juan Manuel Pinos Rodríguez

Dra. Leticia Yáñez Estrada

**ENERO DE 2017**

## **CRÉDITOS INSTITUCIONALES**

### **PROYECTO REALIZADO EN:**

Instituto de Investigación de Zonas Desérticas, Centro de Biociencias y Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

### **CON FINANCIAMIENTO DE:**

Nutrición y Genética Saludable, S.A. de C.V. León, Guanajuato. Con recursos del FINNOVA numero 190601. 2012-02 CONACyT, México

### **A TRAVÉS DEL PROYECTO DENOMINADO:**

Nuevo Aditivo Alimenticio 100% Natural Orgánico como Alternativa a los Antibióticos usados en el Sector Animal

### **AGRADEZCO A CONACYT EL OTORGAMIENTO DE LA BECA-TESIS**

Becario No. 336732

**EL DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES RECIBE APOYO A TRAVÉS  
DEL PROGRAMA NACIONAL DE POSGRADOS DE CALIDAD (PNPC)**

## **DEDICATORIAS:**

A mi esposa Dulce María y mis hijos Ian Josafath y Alejandra Jocelyn, por su paciencia y apoyo

A mis padres Lino López Márquez y Estela Aguirre Castro, por sus consejos

A mis hermanos y familiares

Juntos, son el motor que me mueve día a día

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Dr. Juan Carlos García López y al Dr. Juan Manuel Pinos Rodríguez, por sus enseñanzas, asesoría y apoyo durante todo el trabajo de investigación, por las facilidades prestadas, por enseñarme a tomar decisiones y al final de todo, por su inigualable aprecio y amistad. Me atreví a escribirles este agradecimiento juntos, ya que en conjunto, han sido el pilar de mi educación y formación.

A la Dra. Leticia Yáñez Estrada, por su apoyo, su ayuda, las enseñanzas que me brindó y las facilidades otorgadas para este trabajo de tesis.

A la Dra. Yamile López Hernández, por su amistad, por haberme enseñado y apoyado en el trabajo de laboratorio y redacción del artículo derivado del presente trabajo así como al Dr. Gregorio Álvarez Fuentes.

Al Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera, por el apoyo, regaños y consejos que desde mi formación profesional he recibido ayudándome a superarme profesionalmente.

Al Dr. Juan Manuel Núñez M. por su apoyo y por brindarnos un punto de vista diferente y enriquecer el presente trabajo con sus comentarios

Y finalmente la parte más difícil, durante esta travesía, conocí y recibí apoyo de muchas personas, cuyos nombres no alcanzaría a escribirlos, pero, aunque no los detalle aquí, ustedes saben que formaron parte activa durante mi preparación. Al personal de los PMPCA de la UASLP, al personal del IIZD de la UASLP y a quien se nos adelantó en el camino, al personal del Centro de Biociencias de la UASLP, Al personal del Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Ciencias Morfológicas de la Facultad de Medicina de la UASLP, a mis compañeros y amigos de la Facultad del Agronomía y Veterinaria de la UASLP y del Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario 196.

A los Sres. José Luis Castro Flores y Margarita Prado Buendía

## ÍNDICE

Resumen General.....	7
CAPÍTULO I. <i>Larrea tridentata</i> , extracción y susceptibilidad antimicrobiana de <i>S. typhimurium in vitro</i> a sus metabolitos.....	8
CAPÍTULO 2. Mass spectrometric identification and toxicity evaluation of an aqueous extract of <i>Larrea tridentata</i> .....	37
CAPÍTULO III. Empleo de un extracto acuoso de hojas de <i>Larrea tridentata</i> para desinfección de instalaciones avícolas .....	66
Conclusiones Generales.....	82

## RESUMEN GENERAL

Para evaluar el efecto biocida de extractos de hoja de *L. tridentata* para ser usado como desinfectante en instalaciones avícolas, primero se establecieron las condiciones de extracción para obtener el mejor rendimiento de fitoquímicos, para ello, se usaron tres disolventes y cuatro tiempos de incubación. Con los extractos obtenidos se realizaron pruebas *in vitro* para conocer las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas sobre *S. typhimurium*. Los resultados mostraron que la extracción fue más eficiente a los 40 minutos de incubación usando agua por proceso de decocción, obteniendo hasta un 36.57% de material extractable, la concentración más baja con efecto inhibitorio sobre *S. typhimurium* fue de 0.2 gr mL<sup>-1</sup> con un halo de inhibición de 10 mm, mientras que la concentración mínima bactericida fue de 0.3 gr mL<sup>-1</sup> con un halo de inhibición de 13 mm con esta misma técnica de extracción. A este extracto, se le realizó una caracterización espectrofotométrica para identificar la presencia de ácido nordihidroguayarético, compuesto químico presente en mayor proporción al cual se le atribuyen diversas propiedades, así como otros compuestos. La espectrofotometría de masas, mostró la presencia del ácido nordihidroguayarético y kaempferol entre otros compuestos no identificados. Posteriormente, se realizó un estudio de toxicidad administrando por vía oral a un grupo de ratas cepa Wistar dosis única y dosis repetidas del extracto acuoso, y se midieron parámetros bioquímicos, citoquinas y expresión genética de toxicidad. Las ratas tratadas con dosis única del extracto acuoso, no mostraron manifestaciones clínicas de toxicidad, mientras que las ratas que consumieron dosis repetidas durante cuatro semanas, mostraron una disminución

en la concentración de enzimas hepáticas, así como en la expresión génica para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y IL-6 con respecto al grupo control, pero manteniendo los valores dentro de los parámetros normales de referencia, lo que indica que al menos bajo las condiciones experimentales, el extracto acuoso de hojas de *L. tridentata* no causa toxicidad en los animales que la consumieron. Finalmente, para determinar la efectividad del extracto como desinfectante en instalaciones avícolas, se realizó una prueba de campo en una granja comercial productora de pollo de engorda, comparando la cantidad de unidades formadoras de colonia detectadas en el techo, pared, piso y cortinas de la nave bajo tres escenarios: cuando no se desinfectaba, cuando se realizaba el proceso de lavado y desinfección de rutina y cuando se desinfectaba usando el extracto acuoso de hojas de *L. tridentata*. A las unidades formadoras de colonia aisladas en las instalaciones, se les realizaron pruebas bioquímicas diferenciales para corroborar la presencia de *S. typhimurium*.

Los resultados muestran que cuando se usó el extracto acuoso de *L. tridentata*, como desinfectante en las instalaciones, la concentración de unidades formadoras de colonias de *S. typhimurium* disminuyeron hasta en dos órdenes comparado a la concentración encontrada cuando las instalaciones no se desinfectaron ( $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^5$  UFC), por lo que se concluye que el uso del extracto acuoso de *Larrea tridentata* puede ser una alternativa natural, segura y eficiente como agente biocida para desinfectar instalaciones avícolas.

**CAPÍTULO I. *Larrea tridentata*, EXTRACCIÓN DE SUS METABOLITOS Y  
EVALUACIÓN *in vitro* DE LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA USANDO *S.*  
*typhimurium***

**RESUMEN**

Para identificar las condiciones de extracción de metabolitos de hoja de *L. tridentata*, con el mayor rendimiento y eficiencia bactericida, se probaron tres disolventes y cuatro tiempos de incubación para obtener los extractos, posteriormente, se realizaron pruebas *in vitro* para conocer las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas sobre *S. typhimurium*, así como la correlación entre los puntos de corte y diámetros de halos de inhibición para conocer los criterios de susceptibilidad antimicrobiana. La extracción fue más eficiente a los 40 minutos de incubación y usando agua por proceso de infusión (35.43%) y agua por proceso de decocción (36.57%). La concentración más baja con efecto inhibitorio sobre *S. typhimurium* fue de 0.2 gr mL<sup>-1</sup> con agua por decocción, con un halo de inhibición de 10 mm, mientras que la concentración mínima bactericida fue de 0.3 gr mL<sup>-1</sup> con un halo de inhibición de 13 mm. Por lo que el uso del extracto acuoso de las hojas de *L. tridentata* puede representar una opción viable y segura para controlar el crecimiento de *Salmonella* en las áreas donde se aplique este extracto.

Palabras clave: *Larrea tridentata*, extracto acuoso, desinfectante.



## INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción avícola en México, las instalaciones (naves, comederos, bebederos) son una importante fuente de transmisión de agentes patógenos, entre los que destaca *Salmonella*, bacteria que puede transmitirse al hombre a través de la carne de aves y sus productos derivados. Para prevenirlo, éstas se desinfectan usando productos químicos comerciales y lavando con agua y jabón para eliminar residuos de los compuestos empleados por su toxicidad para los animales y para el hombre (Parra *et al.*, 2002; Rojas y Masdeu, 2002). Una opción natural para desinfectar estas instalaciones, podría ser el uso de extractos de la planta Gobernadora (*Larrea Tridentata*), arbusto perenne característico de los desiertos Chihuahuense, Sonorense y Mojave. Experimentos *in vitro*, han demostrado una acción antifúngica contra 17 hongos fitopatógenos e incorporada al suelo han comprobado que inhibe el crecimiento de hongos, además de tener efecto nematocida y nematostático. En humanos, bioensayos han demostrado que más de 45 bacterias, 10 levaduras, 9 hongos y 3 parásitos intestinales son susceptibles a esta planta, además de tener efecto antiviral contra los causantes de polio, VIH y herpes (Lira *et al.*, 2006). Sin embargo, los resultados reportados en estos trabajos no son consistentes, éstos pueden atribuirse a las técnicas, tiempo y disolventes usados para la extracción de los fitoquímicos. Un punto a resaltar es que su uso como desinfectante en instalaciones pecuarias aun no está reportado.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Descripción botánica

*Larrea tridentata* es un arbusto muy ramificado, perennifolio, de 0.6 a 3m de altura, perteneciente a la familia Zygophyllaceae, sus hojas están formadas por 2 folíolos unidos entre sí en la base. Los folíolos son oblicuamente ovados a lanceolados o falcados, divaricados, de 4 a 15 mm de largo por 3 a 8 mm de ancho, enteros, coriáceos, resinosos, de olor penetrante, verde o verde amarillentos. La copa tiene un volumen promedio de 0.124 m<sup>3</sup> x arbusto. Erecto ramificado desde la base, con flores solitarias de 2.5 cm de diámetro, sépalos elípticos de 6 mm de largo por 4 mm de ancho, pubescentes, caedizos; pétalos de color amarillo fuerte, oblongos a lanceolados, de 1 cm de largo por 3 a 5 mm de ancho, caedizos. Sus frutos son subgloboso a obovoide, de 7 mm de largo, coriáceo, con pelos blancos, sedosos, que se vuelven café-rojizos con el tiempo, 5 mericarpios con una semilla cada uno (Shreve y Wiggins, 1964; Correll y Johnston, 1970; Martínez, 1979; Rzedowski y G. Rzedowski, 1994). Las semillas son de color café a negras, algo curvadas, de 2 a 4 mm de largo, con contornos triangulares. Embrión con los cotiledones paralelos al plano longitudinal, su sistema radical superficial, poco profundo y muy extenso llega a ocupar casi el total del espacio que hay entre un arbusto y otro. Su número cromosómico depende la región geográfica donde se localice, por ejemplo, en el desierto de Chihuahua se encuentran plantas diploides (n=13), en el desierto de Sonora tetraploide (n=26) y en el desierto de Mojave hexaploides (n=39). Su follaje es

perennifolio y florece durante todo el año, con mayor frecuencia entre febrero y abril. Es capaz de producir múltiples fases reproductivas durante una misma estación de crecimiento, fructifica de marzo a abril y noviembre a diciembre (Rzedowski y G. Rzedowski, 1994; Marshall, 1995; Vázquez-Yanes *et al.*, 1999). Posee una excelente adaptabilidad para sobrevivir en el desierto. Tiene capacidad para un intercambio positivo de CO<sub>2</sub> y puede mantener un balance neto positivo de CO<sub>2</sub> a lo largo del año, aún a temperaturas extremas (superiores a los 43 °C) y estrés de agua (menores a los - 83 bares). Posee gran habilidad para mantener actividad fotosintética neta, aún a potenciales de presión de agua muy bajos. Su adaptación a tales ambientes (áridos y calientes) es debida a su alto nivel de tolerancia protoplásmica a la desecación y a las altas temperaturas. Es una planta prolífica y territorialista, tiene un efecto evidente en el desplazamiento de otras especies, impidiendo de esta manera la diversificación de la flora en el lugar donde se desarrolla. Bajo condiciones de humedad favorables y mediante mecanismos aún no clarificados, inhibe el crecimiento de la vegetación que se desarrolla a su alrededor. Posee un gran número de compuestos químicos en sus hojas, aparentemente como una estrategia anti-herbívoros. En sitios en donde el mezquite ha reemplazado a los pastos, la gobernadora puede reemplazar al mezquite al cabo de 70 a 80 años. La máxima tasa de crecimiento se obtiene cuando el agua es más abundante. Una característica muy importante es que no tiene periodos de latencia en su crecimiento y por ello puede responder a los cambios ambientales (Rzedowski y G. Rzedowski, 1994; Marshall, 1995; Villaseñor y Espinosa, 1998; Vázquez-Yanes *et al.*, 1999). La energía producida

por la fotosíntesis cuando hay humedad disponible, se dedica a las estructuras reproductivas. El crecimiento de las partes reproductivas (yemas florales, flores y frutos) se inicia si las condiciones de humedad son adecuadas. El crecimiento vegetativo se detiene o es más lento cuando se alcanza el máximo crecimiento reproductivo. Es muy sensible a la cantidad de humedad disponible para su crecimiento vegetativo y reproductivo. Las plántulas tienen una baja sobrevivencia, al parecer los hongos desempeñan un papel muy importante en el establecimiento de plántulas, debido a la formación de micorrizas. En condiciones naturales, se calcula que de cada 100 mericarpios solo es posible que se formen 20 plántulas a los 6 meses, después de germinadas en condiciones cercanas al óptimo. Su productividad energética primaria, se ha registrado un promedio, de 2,100 a 4,100 Mcal/ha/año. La biomasa de hojas representa el 47 % del total de la biomasa nueva de los tallos producidos por un crecimiento apical. No presenta casi variaciones en su producción de biomasa año con año en una misma región. En México, se distribuye abundantemente en el norte de país, de la Península de Baja California a Tamaulipas e Hidalgo, entre las altitudes de 400 a 1800 msnm, en los estados de Baja California, Coahuila, Chihuahua, Durango, Sinaloa, Sonora, Nuevo León, Tampico, Zacatecas, San Luis Potosí, Hidalgo y Querétaro, su hábitat se encuentra en terrenos planos, laderas, lomeríos bajos (originados de materiales geológicos del cretácico superior e inferior) y en planicies aluviales (Rzedowski y G. Rzedowski, 1994; Marshall, 1995; Villaseñor y Espinosa, 1998; Vázquez-Yanes *et al.*, 1999). Se desarrolla en lugares con temperaturas de 14 a 28 °C y presencia de 8 meses de sequía, en climas áridos (BS) y muy áridos (BW)

y en precipitaciones de 150 a 500 mm anuales. No prospera en zonas de clima isoterma. Los suelos en los que se desarrolla son de profundidad variable, textura franco arenosa, estructura granular, drenaje interno medio de consistencia friable, de color café grisáceo, compacto arcilloso, calcáreo, blanco-arenoso, aluvial con pH de 6.8 a 7.6. Es uno de los principales componentes de la vegetación árida y semiárida del país, la vegetación asociada con la que se encuentra es *Juniperus* sp., *Acacia* sp., *Yucca* sp., *Pachycereus* sp., *Prosopis* sp., *Bursera microphylla*, *Agave* sp., *Carnegiea gigantea*, *Jatropha* sp., *Berberis* sp., *Parthenium* sp., *Cercidium floridum*, *Fouquieria splendens*, *Opuntia* sp, formando comunidades exclusivas y extensas en varios tipos de vegetación, entre los que se encuentran el Bosque espinoso (perennifolio), Bosque tropical caducifolio, Matorral xerófilo (matorral subdesértico micrófilo, matorral inerme) (Martínez, 1979; Rzedowski y G. Rzedowski, 1994; Marshall, 1995; Villaseñor y Espinosa, 1998; Vázquez-Yanes *et al.*, 1999).



Figura 1.- *Larrea tridentata* en el Ejido El Leoncito, Villa Hidalgo, S.L.P.

### **Composición química de la resina de *Larrea tridentata***

Las hojas de este arbusto están envueltas en una gruesa capa de resina producida por tricomas glandulares durante el desarrollo de estas, y puede llegar a formar más del 20% del peso seco (Lira-Saldivar *et al.*, 2006). Su función es formar una barrera antitranspirante en la superficie de las hojas, disminuyendo la transpiración sin afectar las tasa de asimilación de CO<sub>2</sub>, además de servir como protector de rayos UV e inhibir el herbivorismo, debido a que esta planta mantiene sus hojas verdes todos los meses del año (Barbour *et al.*, 1977; Downum *et al.*, 1988; Meinzer *et al.*, 1990; Gonzalez-Coloma *et al.*, 1994). Los metabolitos secundarios que posee la resina y los tallos, también sirven como defensas

bioquímicas para repeler el ataque de microorganismos (Valesi *et al.*, 1972; Winsdom *et al.*, 1987; Rundel *et al.*, 1994). Entre el 16 al 21% del peso seco de la resina está compuesta por lignanos fenólicos, entre ellos: ácido dihidroguaiarético, hemi-norisoguaiacín, ácido nordihidroguaiarético (figura 2) cuya concentración en esta fracción es cercana al 50% y nordihidroguaiacín. Los flavonoides apigenin y kaempferol representan de un 5 a un 7.5 % del peso seco de las hojas; Las saponinas y los triterpenos larreagenin A y ácido larréico constituyen del 10 al 15%; Los Monoterpenos volátiles: alpha perene, delta-3-carene, limoneno, los aromaticos: benzaldehído, benzilacetato, benzilbutano, metil naftaleno, los esteroides: beta-sitosterol, colesterol, campesterol, en conjunto con taninos y los carbohidratos glucosa y sucrosa representan entre el 0.1 y 0.2% del peso seco de la resina (Sakakibara *et al.*, 1976; Brinker, 1993).

### **Usos de *Larrea tridentata***

Diversas enfermedades, principalmente de origen renal y ginecológicas, son combatidas con medicina tradicional, usando extractos acuosos o alcohólicos de hojas y tallos de *Larrea tridentata* (Arteaga *et al.*, 2005). Los usos etnobotánicos reportados desde hace décadas son muy amplios. Estudillo e Hinojosa (1988) y Brent (1999), reportaron su uso para combatir el acné, Brinker (1993) menciona que puede ser usado para problemas del tipo alérgico, además de regular la presión arterial (Argueta 1994; Sheikh *et al.*, 1997), otros estudios han mostrado que posee efecto analgésico y anti inflamatorio (Timmermann, 1977; Argueta, 1994; Kay, 1996 y Tyler and Foster, 1999), que mejora las condiciones de salud

de las personas que padecen anemia (Argueta, 1994), además de ser usado como antibiótico (Mabry *et al.*, 1979; Argueta, 1994), antifúngico (Mabry *et al.*, 1979, Barragán *et al.*, 1994 y Brent, 1999) y antiviral (Brent, 1999). Su uso como antiséptico es reportado por Timmermann (1977), Mabry *et al.*, (1979), Argueta (1994), Kay (1996) y Lara y Márquez (1996), entre otros usos mas; En el área de producción vegetal, *in vitro*, ha demostrado acción antifúngica contra 17 hongos fitopatógenos e incorporada al suelo han comprobado que inhibe hongos, tiene efecto nematicida y nematostático, (Lira, 2003) sin embargo, no existen estudios en la literatura en los que se haya reportado su uso como desinfectante en el área pecuaria.

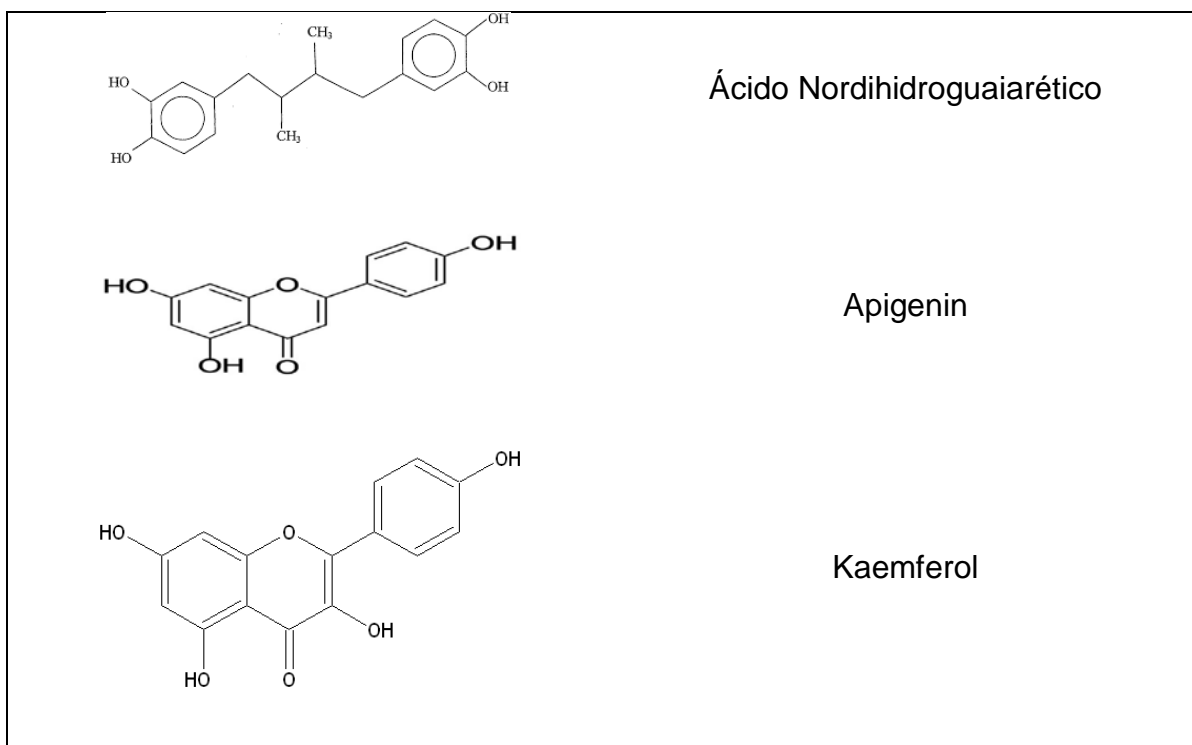


Figura 2.- Estructura química de los principales componentes de la resina de *Larrea tridentata*.



## **Extracción de compuestos bioactivos**

Los disolventes usados para obtener el material extractable, tales como el etanol, metanol (Tequida *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2009; Silvia *et al.*, 2012) y acetona (Moreno *et al.*, 2011; Silvia *et al.*, 2012) entre otros, los métodos de extracción como el de reflujo en equipo soxlet (Lira-Saldivar *et al.*, 2006), asistida por microondas (Martins *et al.*, 2009), o remojo (Tequida *et al.*, 2002) y los tiempos usado para la extracción, desde 1 minuto (Martins *et al.*, 2009) hasta 13 días (Moreno *et al.*, 2011) pueden ser factores que influyan en los porcentajes y concentraciones de los extractos obtenidos, así como en su respuesta antimicrobiana, lo que explicaría la inconsistencia de los resultados obtenidos en trabajos previos, debido a que cada método y disolvente usado, extrae de acuerdo a la capacidad de solubilizar y a su polaridad, diferentes fitoquímicos de las hojas de la planta, siendo los principales y de mayor proporción los lignanos fenólicos, flavonoides, triterpenos y saponinas en mayor proporción (más del 40% del peso seco de las hojas), así como monoterpenos, lípidos, vitaminas y minerales (Lira, 2003)..

## **El género Salmonella y su Taxonomía**

El género Salmonella fue descrito a principios del siglo XX por el bacteriólogo estadounidense Theobald Smith, recibiendo el nombre por su jefe David Salmon. Las salmonelas son bacterias entéricas y su taxonomía es compleja, son bacterias gram-negativas y su tinción se debe a sus diversas membranas que posee: la membrana externa, la pared celular (diez veces más

delgada que en las bacterias grampositivas), y la membrana interna. Las membranas externas e internas delimitan al periplasma, dando una apariencia en el microscopio de bacilos, o cilindros con puntas redondeadas. Actualmente, el género *Salmonella* consiste de una sola especie, que ha sido denominada *Salmonella* entérica, y siete subespecies, dependiendo de su capacidad para realizar diferentes reacciones bioquímicas, esta subdivisión ha sido caracterizada por varios métodos de hibridación ADN/ADN y métodos serológicos, cada subespecie, a su vez, está subdividida en serotipos o serovariedades, de acuerdo al tipo de antígeno H (flagelar: del alemán hauch, “por el halo producido en un medio de cultivo a raíz del movimiento”) u O (somático: del alemán ohne hauch, “sin movimiento”). El antígeno H está conformado por la proteína más abundante del flagelo, que es la estructura que permite el movimiento. El antígeno O está conformado por una cadena repetida de polisacáridos, que forma parte del lipopolisacárido (LPS), que se genera y sobresale de la membrana externa y que actúa como una barrera de protección a agentes externos (Pelczar, 1982; Calva, 2000).

### **Salmonelosis**

Es una enfermedad septicémica de importancia sanitaria para la producción avícola, tanto industrial como de traspatio, caracterizada por producir una alta mortalidad. Afecta también a pavos, codornices, faisanes, así como a un gran número de especies aviares. La *Salmonella* causa dos tipos de padecimientos: a) la fiebre entérica, que incluye la fiebre tifoidea causada por *S. typhi* en humanos, y

la fiebre paratifoidea que es patológica y clínicamente similar a la tifoidea pero con síntomas menos fuertes, causada por *S. paratyphi* A, B, o C. La fiebre entérica implica una infección sistémica, debido a la invasividad de la bacteria y b) La gastroenteritis o envenenamiento por alimentos, la cual es la más común de las infecciones, causada por muchos serotipos, estas infecciones no están acompañadas de una infección sistémica, siendo los serotipos más comunes en la salmonelosis no tifoidea *S. typhimurium* y *S. enteritidis* en aves. (Calva, 2000).

### **Patogenia**

El periodo de incubación de la Salmonella varía de 4 a 5 días, aunque en la práctica, determinar el periodo de incubación resulta difícil de establecer, pues la infección puede iniciar silenciosamente y provocar sus efectos semanas o meses más tarde. En la forma aguda se produce una anemia hemolítica severa con pérdida de más del 70% de los hematíes circulantes, debido a que las endotoxinas provocan una modificación de los eritrocitos *in vivo* y éstos son destruidos por el sistema reticuloendotelial, y ocurre una supresión de las funciones de eritrofagocitosis y eliminación de las endotoxinas, con lo que se incrementa la susceptibilidad del hospedador, produciéndose rápidamente la muerte del individuo (Márquez, 2007).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención del material vegetal

El material vegetal se colectó en el municipio de Matehuala, San Luis Potosí en el mes de diciembre de 2013, un ejemplar de la planta fue colectado y se identificó en el herbario Isidro Palacios del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Se cortó el último tercio de las plantas para asegurar el rebrote (Bruneton, 2001) y se secó a la sombra hasta peso constante, una vez seco, se separaron las hojas de los tallos. Las hojas se molieron en un molino willy hasta alcanzar un tamaño de partícula de 1 mm y se almacenó en un recipiente protegido de la luz a temperatura del medio (22° C) para su posterior uso.

### Obtención de extractos

Las extracciones de *L. tridentata* se realizaron usando tres diferentes disolventes: agua desionizada (AI), etanol (E) y metanol (M) grado analítico diluidos al 90% v/v por un proceso de infusión y cinco tiempos de incubación: 0, 10, 20, 30 y 40 minutos. Para la extracción, se colocaron en tubos de ensayo (20 x 200 mm) un gramo de las hojas secas y molidas y 40 mL de cada uno de los disolventes previamente mencionados y se incubaron en baño maría a 65°C durante 0, 10, 20, 30 y 40 minutos; también se evaluó un método de decocción pero únicamente usando agua como disolvente (AD), las muestras se incubaron

en los mismos tiempos descritos pero en un baño en ebulición (98°C). En ambos casos, se usaron tres tubos por disolvente y por tiempo de incubación (repeticiones), al término de cada tiempo de incubación, los tubos se sacaron del baño maría y se dejaron enfriar durante 30 minutos. Se transfirió un 1 mL de cada extracto a un crisol previamente identificado, seco y pesado y se colocó en una estufa de aire forzado a temperatura de 96°C hasta peso constante, determinando la concentración final por diferencia de pesos, y establecer el tiempo óptimo de incubación.

### **Procesos de deshidratación**

Los extractos obtenidos usando AI, E, M, y AD, se filtraron por vacío a través de papel wathman numero 4 y se concentraron en un rotavapor (Buchi R-124 y Watherbarth B-481) a presión reducida a 55°C y posteriormente se llevó a sequedad total por liofilización; Los extractos obtenidos usando AI y AD, se concentraron en una olla de impregnación al vacío Gastrovac (International Cooking Concepts. Barcelona, España), acoplada a un destilador a 39° C durante 45 minutos. El concentrado obtenido se llevó a sequedad total en una estufa de aire forzado a 50° C. Estos procedimientos se realizaron tres veces con una semana de diferencia entre cada proceso (réplica).

## **Métodos de estudio de susceptibilidad antimicrobiana de *S. typhimurium* a los extractos de *L. Tridentata*.**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), y la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos obtenidos de *L. tridentata* sobre *S. typhimurium*, se usó la cepa ATCC 14028, serotipo B donada por el Laboratorio Estatal de Salud Pública del Estado de San Luis Potosí. Las pruebas de sensibilidad se realizaron de acuerdo a los métodos estandarizados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003), usando caldo tripticasa de soya para la técnica de macrodilución en caldo, y agar mueller-hinton para la técnica de pozos en agar. Las concentraciones del extracto evaluado fueron de 0.0 mg mL<sup>-1</sup> como control positivo de crecimiento de la bacteria y 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1.0 g mL<sup>-1</sup> de agua estéril. Como control negativo se usó el antibiótico ceftriaxona con concentración de 1.0 mg mL<sup>-1</sup>. La interpretación de los resultados se realizó en función de las normas del NCCLS; además, se realizaron las gráficas de relación entre los puntos de corte y el diámetro de los halos de inhibición de los extractos de *L. tridentata* sobre *S. typhimurium* como lo describen Taroco *et al.*, (2006).

### **Análisis estadístico**

Los resultados de la tasa de extracción se analizaron en un diseño completamente al azar, el análisis de la varianza y las pruebas de comparación de medias se efectuaron utilizando el procedimiento para modelos lineales generales (PROC GLM) y la prueba de tukey del paquete estadístico SAS (1991).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Extracción

El tiempo de incubación y el disolvente usado mostraron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ), en la obtención del porcentaje de extracto de las hojas de *L. tridentata*, siendo más eficiente la extracción a los 40 minutos de incubación (Cuadro 1). Con respecto a los disolventes, con el agua por proceso de infusión, se obtuvo el mayor porcentaje de extracción (36%), seguido del agua por proceso de decocción (35%), etanol (31.10%) y metanol (27.5%). Estos porcentajes de extracción son mayores a los reportados por Rhoades (1977) y Lira (2003), pero menores a los reportados por Brinker (1993), 20%, 26% y 40% respectivamente.

Cuadro 1.- Porcentaje de material extractable medido por peso constante usando diferentes disolventes y tiempos de incubación

Disolvente	Tiempo (minutos)				
	0	10	20	30	40
AI	6.10 <sup>c</sup>	13.17 <sup>c</sup>	19.28 <sup>c</sup>	27.52 <sup>c</sup>	36.57 <sup>d</sup>
E	8.01 <sup>c</sup>	14.33 <sup>c</sup>	18.16 <sup>c</sup>	22.00 <sup>c</sup>	28.00 <sup>d</sup>
M	9.24 <sup>b</sup>	16.22 <sup>b</sup>	22.66 <sup>b</sup>	26.28 <sup>b</sup>	31.22 <sup>c</sup>
AD	16.21 <sup>a</sup>	23.04 <sup>a</sup>	25.03 <sup>a</sup>	28.18 <sup>a</sup>	35.43 <sup>ab</sup>
EEM	0.014	0.013	0.013	0.013	0.014

AI= agua por proceso de infusión; E=Etanol por proceso de infusión; M=metanol por procesos de infusión; AD= agua por proceso de decocción; EEM= error estándar de la media Literales diferentes en columna, indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.01$ ).

## **Ensayo *in vitro***

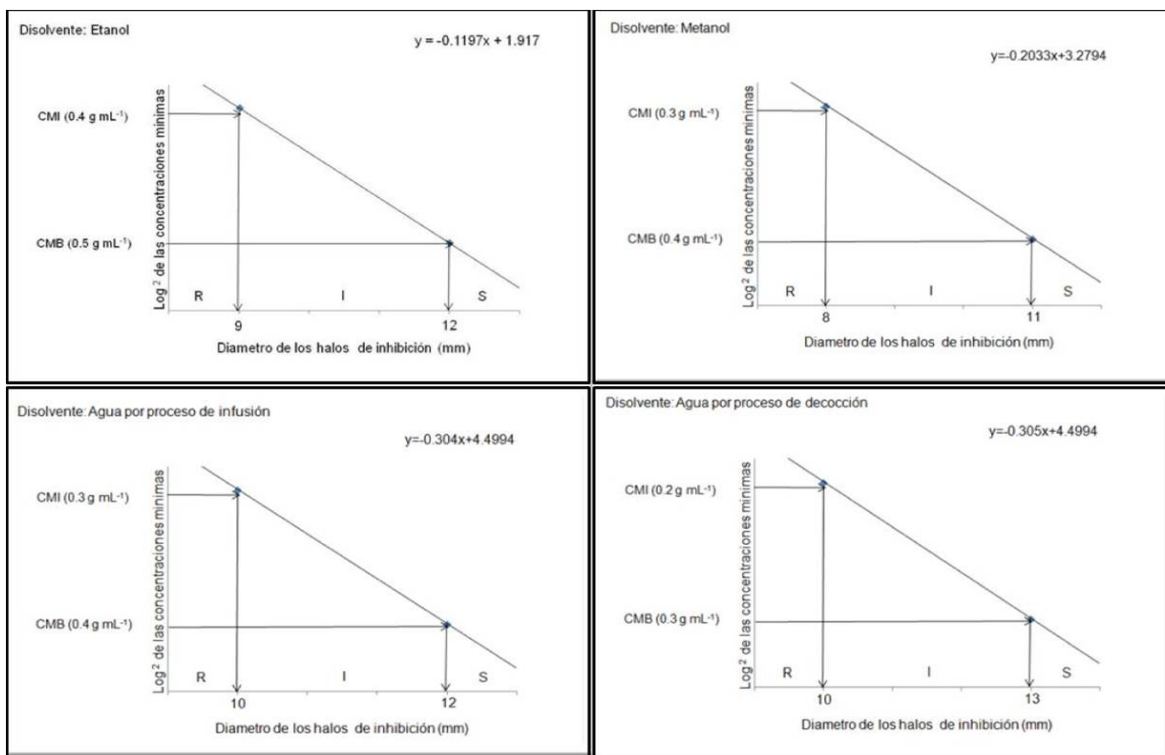
Se encontró que la concentración más baja con efecto inhibitorio (CMI) sobre *S. typhimurium* fue de 0.15 gr mL<sup>-1</sup> (técnica de micro dilución) y un halo de inhibición de 10 mm (técnica del pozo) y la concentración mínima bactericida (CMB) fue de 0.25 gr mL<sup>-1</sup> con un halo de inhibición de 13 mm cuando se usó agua como disolvente por el método de decocción. El disolvente menos efectivo como bacteriostático y bactericida fue el etanol (Cuadro 2). La relación entre las gráficas de relación entre los puntos de corte y el diámetro de los halos de inhibición de los extractos de *L. tridentata* sobre *S. typhimurium* (Figura 3) nos permite clasificar e interpretar el efecto inhibitorio de acuerdo a las categorías establecidas por la NCCLS (2003). sensible (si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico), resistente (si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida) o intermedio (cuando el éxito terapéutico es imprevisible). Este resultado puede ayudar a interpretar la sensibilidad de la bacteria al extracto, midiendo únicamente el diámetro del halo de inhibición a diferentes concentraciones, lo que podría optimizar el tiempo para evaluar su efecto antimicrobiano, una vez aplicados a las instalaciones pecuarias.



Cuadro 2.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) y promedio de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos de los extractos de *L. tridenata* sobre *S. typhimurium*

Disolvente	Concentración Mínima Inhibitoria		Concentración Mínima Bactericida	
	Concentración (gr mL <sup>-1</sup> )	Diámetro del halo (mm)	Concentración (gr mL <sup>-1</sup> )	Diámetro del halo (mm)
A* infusión	0.30	10	0.40	12
Etanol	0.40	9	0.50	12
Metanol	0.30	8	0.40	11
A*decocción	0.20	10	0.30	13
Ceftriazona	0.10	20	0.10	20

A\* = Agua Ceftriazona= Antibiótico



Criterios de susceptibilidad antimicrobiana según la relación entre el punto de corte y el diámetro de los halos de inhibición obtenidos en el antibiograma con extractos de *L. tridenata* sobre *S. typhimurium*. R= resistente, I= intermedio, S=sensible.

## DISCUSIÓN

Los diversos disolventes usados para obtener los extractos, tales como etanol, metanol (Tequida *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2009; Silvia *et al.*, 2013), y acetona (Moreno *et al.*, 2011; Silvia *et al.*, 2012) entre otros, así como los diferentes métodos de extracción como el de reflujo en equipo soxlet (Lira *et al.*, 2006), asistida por microondas (Martins *et al.*, 2009), o remojo (Tequida *et al.*, 2002) y los tiempo de incubación durante el proceso de extracción, desde 1 minuto

(Martins *et al.*, 2009) hasta 13 días (Moreno *et al.*, 2011), son factores que influyen en los porcentajes de extracto obtenido, así como en la respuesta antimicrobiana, lo que explicaría la inconsistencia de los resultados reportados en trabajos previos, debido a que en función del método empleado se pueden obtener diferentes fitoquímicos de las hojas de la planta, siendo los principales reportados en la literatura los lignanos fenólicos, entre los que destacan el ácido dihidroguayaretico, el hemi-norisoguayacin y el ácido nordihidroguayaretico, flavonoides, triterpenos y saponinas en mayor proporción (más del 40% del peso seco de las hojas). Lira *et al.*, 2006). Silva *et al.*, (2012) reportó que usando metanol como disolvente se obtiene la mayor concentración de lignanos fenólicos, sin embargo, la toxicidad de este limitaría su uso en áreas como las destinadas al alimento y la industria farmacéutica. En este estudio se demostró que el empleo de agua como disolvente, con 40 minutos de incubación, permite extraer un alto porcentaje de fitoquímicos de las hojas de la planta, con la ventaja que ésta, no representa toxicidad comparada con el metanol. Además, el ensayo *in vitro* mostró que el extracto acuoso obtenido por decocción inhibe el crecimiento de *S. typhimurium* con una mayor eficiencia, comparado con los extractos alcohólicos a una concentración de 0.15 g mL<sup>-1</sup> al observar halos de inhibición de mayor diámetro a menor concentración, lo que implica que las propiedades bactericidas se deben a los metabolitos presentes en el extracto acuoso y no al disolvente usado para su extracción.

## CONCLUSIÓN

Se concluye que el uso de agua como disolvente, la técnica de decocción y 40 minutos, es el método más eficiente para obtener la mayor cantidad de material extractable de las hojas de *L. tridentata*, así como también fue el extracto con una mayor eficiencia tanto bactericida como bacteriostática contra *S. typhimurium* lo que representa una opción natural sustentable, segura y eficiente para su posible uso como desinfectante de instalaciones pecuarias.

## LITERATURA CITADA

- Argueta, V. (Ed.), 1994. Atlas of the Traditional Mexican Medicinal Plants, vol. II. National Indigenous Institute, Mexico, pp. 669–670
- Arteaga, A. S., Andrade-Cetto, R. Cárdenas. 2005. *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid, J. Ethnopharmacol. 98 (2005) 231–239.
- Barbour M G., Cunningham G., Oechel W.O., and Bamberg S. A. 1977. Growth and development form and function. Pp 48-91. In: Creosote bush- Biology and Chemistry of Larrea in New World Desert. US/IBP Synthesus Serie 6. Dowden, Hutchinson & Roos Inc. Stroudsburg, PA, USA.
- Barragan, S., Alvarez, G., Zavalza, A., 1994. In vitro evaluation of the antifungic activity of *Larrea tridentata* against human pathogenic fungi. In: Proceedings of the First Mexican Congress of Ethnobiology, Summaries, Cuernavaca, M´exico, p. 17.
- Brent, J., 1999. Three new herbal hepatotoxic syndromes. Journal of Toxicology and Clinical Toxicology 37, 715–719.
- Brinker, F. 1993. *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (Chaparral or Creosote Bush). British Journal of Phytotherapy 3: 10-30.

- Bruneton J. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. 2ª edición, Zaragoza: Acribia, 2001
- Calva, E. 2000. *Salmonella typhi* y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. Instituto de Biotecnología, UNAM.D.F. México. Pag.23.
- Correll, D. S. y M. C. Johnston, 1970. Manual of the vascular plants of Texas. Texas Research Foundation. Renner, Texas.
- Downum K. R., Dole J. and Rodriguez E. 1988. Nordihidroguayaretic Acid: inter and intrapopulation variation in the Sonoran Desert creosote bush (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae). *Biochemical Systematic nad Ecology* 16:551-551.
- Estudillo, R.L., Hinojosa, A.L. 1988. Catalog of Sonoran Medicinal Plants. University of Sonora, Hermosillo, 131 pp.
- Tyler, V., Foster, S., 1999. Tyler's Honest Herbal: A Sensible Guide to the Use of Herbs and Related Remedies. Haworth Herbal Press, New York, pp. 109–111.
- Gonzalez-Colomba A., Windsom C. S., Sharifi M. R., and Rundel P. W. 1994. Water and nitrgen manipulation of the desert shrub *Larrea divaricata* subsp tridentata (Zylgophyllaceae). *Journal of Arid Enviroment* 28:139-146.

- Kay, M. 1996. Healing with Plants in the American and Mexican West. University of Arizona Press, Tucson, pp. 178–181.
- Lara, F., Marquez, C. 1996. Medicinal Plants from Mexico: Composition, Uses and Biological Activity. UNAM, México, pp. 59–61 (in Spanish).
- Lira-Saldivar RH, Hernández-Suárez M, Hernández-Castillo FD. 2006. Activity of *Larrea Tridentata* (D.C.) Coville. Extracts and chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 12(2): 211-216.
- Lira-Saldivar RH. 2003. Estado Actual del Conocimiento sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora *Larrea tridentata* (D.C.) Coville. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2):214-222
- Mabry, T., DiFeo, D., Sakakibara, M., Bohnstedt, C., Sleiger, D., 1979. The natural products chemistry of *Larrea*. In: Mabry, J., Hunzinker,
- Márquez, M. 2007. Las principales enfermedades de carácter infectocontagioso que sufren las aves. *Avicultores*, UNAM, México. 57, Pag.24-27.
- Marshall, K. Anna. 1995. *Larrea tridentata*. In: Fire Effects Information System, [Online]. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory (Producer). Disponible en: <http://www.fs.fed.us/database/feis/> fecha de consulta 2016, Junio 9.

- Martínez, M., 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Martins S. L., Aguilar C. N., De La Garza-Rodriguez I., Mussatto S. I., Teixeira J. A. 2009. Kinetic study of nordihydroguaiaretic acid recovery from *Larrea tridentata* by microwave-assisted extraction. En: Book of Abstracts of MicroBiotec09. Vilamoura Algarve, Portugal.
- Meinzer F. C., Wisdom C. S., Gonzalez-Colomba A., Rundel P. W., and Shultz L.M. 1990. Effects of leaf resin on stomatal behavior and gas exchange of *Larrea tridentata* (D.C) Cov. *Functional Ecology* 4:579-584
- Moreno-Limón, S.; L.N. González-Sólís; S.M. Salcedo-Martínez; M.L. Cárdenas-Avila; A. Perales-Ramírez. 2011. Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*. 32. 193-205.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. NCCLS Document M2-A7. 2003. Wayne, Pennsylvania.
- Parra M, Durango J, Máttar S. 2002. Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por *Salmonella*. *Revista MVZ Córdoba* 7(2): 187-200
- Pelczar, M. J. 1982. *Microbiología*. Editorial Mc. Graw Hill, Cuarta Edición, México. 1436 p.



- Rhoades, D.F. 1977. Integrated antiherbivore, antidesiccant and ultraviolet screening properties of creosotebush resin. *Biochemistry and Systematics Ecology* 5: 281–290.
- Rojas, GM, Masdeu V. 2002. Resultados del análisis microbiológico de yacijas de paja de arroz utilizadas en la avicultura. *Rev. Cubana de Ciencia Avícola*. 26: 121-123.
- Rundel P. W., Sharifi M. R., and Gonzalez-Colomba A. 1994. Resource availability and herbivory in *Larrea tridentata* pp. 105-114. In: *Plant-Animal interaction in Mediterranean-Type Ecosystems*. Kluwer Academic Publisher. Netherlands.
- Rzedowski, J. y G. Rzedowski C. de, 1994. *Zygophyllaceae*. En: Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes*. Fascículo 30. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Sakakibara M., Difeo D., Nakatani N., Timmerman B., and Mabry T.J. 1976. Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. divaricata*. *Phytochemistry* 15:727-731
- SAS Institute (1991) *SAS Users Guide: Statistics*. SAS Institute Inc., Cary, NC. Ver 9.0.

- Sheikh, N., Philen, R., Love, L., 1997. Chaparral-associated hepatotoxicity. *Archives of International Medicine* 157, 913–919.
- Shreve, F. y I. L. Wiggins, 1964. *Vegetation and flora of the Sonoran desert. Vol. II.* Stanford University Press. Stanford, California.
- Silvia M, Amorim E, Tadeu PS, Saraiva AM, Pisciotano M, Aguilar C, Teixeira JA, Solange IM. 2013 Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. *Industrial Crops and Products* 41: 306– 311
- Silvia-Martins A, Cristóbal N, Aguilar B, Teixeira JA, Solange IM. 2012. Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *Separation and Purification Technology* 88: 163–167
- Taroco R, Seija V, Vignoli R. 2006. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. en: *Temas de Bacteriología y Virología Médica.* Uruguay.
- Tequida, M., Cortez, R., Rosas, B., Lopez, S., Corrales, M., 2002. Effect of alcoholic extracts of wild plants on the inhibition of growth of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium poae* moulds. *Revista Iberoamericana de Micología* 19, 84–88.

- Timmermann, B., 1977. Practical uses of Larrea. In: Mabry, T., Hunziker, J., Difeo, D. (Eds.), Creosote Bush. Biology and Chemistry of Larrea in New World Deserts. Dowden Hutchinson Ross Inc., USA, pp. 252–257.
- Valesi A. G., Rodriguez E., Vander-Velde G. and Mabry T. J. 1972. Methylated flavonols in Larrea cuneifolia Phycochemistry 11:2821-2826
- Vázquez-Yanes, C., A. I. Batis Muñoz, M. I. Alcocer Silva, M. Gual Díaz y C. Sánchez Dirzo. 1999. Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto J084. CONABIO-Instituto de Ecología, UNAM
- Villaseñor, R., J. L. y F. J. Espinosa G., 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Windsom C.S., Gonzalez.Colomba A., and Rundel P. W. 1987. Ecological tannins assays: evaluation of proanthocyanidins, protein binding assays and protein precipitating potential. Oecologia 72:395-401.

## CAPITULO II. MASS SPECTROMETRIC IDENTIFICATION AND TOXICITY EVALUATION OF AN AQUEOUS EXTRACT OF *Larrea tridentata*.

### ABSTRACT

The use of antimicrobial compounds obtained from natural sources has been gaining impact in recent years. However, when planning to use these compounds in living beings, careful and exhaustive examination of potential toxicity is necessary. In the present work, we characterized the chemical composition of an aqueous extract of *Larrea tridentata* and evaluated the toxicity when administered orally to Wistar rats in both single and repeated dosing regimens. Spectrometric characterization of the aqueous extract was performed. Female Wistar rats were inoculated orally with single and repeated doses of the vegetable leaf extract and biochemical parameters and cytokine gene expression were evaluated. Mass spectra of the aqueous extract showed the presence of nordihydroguaiaretic acid and kaempferol along with other non-identified compounds. Rats treated with one dose of the aqueous extract did not show clinical manifestations of acute toxicity. However, treatment over four consecutive weeks, showed significant differences between the study groups in observed food and water consumption and hepatic enzyme levels ( $P < 0.05$ ). Down-regulation of genes coding for TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 with respect to the control animals was observed in liver and kidney of the animals receiving the aqueous extract.

**Keywords:** *Larrea tridentata*, NDGA, mass spectrometry, toxicity

## INTRODUCTION

*Larrea tridentata* (*Zygophyllum tridentatum*), also known as creosote brush or chaparral, is a plant belonging to the family Zygophyllaceae and is closely related to the South American species *Larrea divaricata* (Arteaga *et al.*, 2005). Its popular name of Governor is given for its ability to inhibit the development of other plants in their immediate surroundings, a strategy for obtaining more water in these desert regions. This plant has been used for several years as natural remedy against a great number of diseases. Several studies have demonstrated that extracts obtained from *Larrea tridentata* have *in vitro* antifungal action against at least 17 pathogenic fungi (Verastegui *et al.*, 1996). Antibacterial and antiviral action against *M. tuberculosis* and Herpes Simplex Virus has also been reported (Chen *et al.*, 1998, Guzman-Beltran *et al.*, 2016).

Chaparral has been marketed for years to consumers for the treatment of arthritis, rheumatism and bursitis (Lu *et al.*, 2010). It has also been consumed to enhance the immune system against different kinds of cancers such as melanoma, leukemia and ovarian cancer (Lu *et al.*, 2010, Gnabre *et al.*, 2015). Reports of chaparral toxicity are inconsistent, as native populations in the southern United States have consumed it for decades without signs of toxicity. The main chemical compound of chaparral is nordihydroguaiaretic acid (NDGA). By 1943, NDGA at 0.02% (w/w) was used as an antioxidant in many foods to prevent fermentation. 25 years later, NDGA lost its previous status (generally recognized as safe) and the FDA required their removal from most foods (Arteaga *et al.*, 2005). There are at least 15 reported cases of hepatotoxicity temporally related to chaparral use (Smith

and Desmond 1993, Alderman *et al.*, 1994, Batchelor *et al.*, 1995, Sheikh *et al.*, 1997). No clear dose response between the amount of chaparral tea and the severity of the non-infectious hepatitis has been found in those patients (2005). Animal studies evaluating NDGA did not show hepatotoxicity but did exhibit renal damage (Goodman *et al.*, 1970).

Currently, the use of extracts from vegetables with proven bactericidal and/or fungicidal activity is a better choice for use in agriculture with less adverse environmental impact than the use of more aggressive chemical compounds. The combined effects of all the constituents in this plant could lead to a synergism that amplifies the effect of one primary active compound. The antimicrobial activity of an aqueous extract of *Larrea tridentata* has been *in vitro* and *in vivo* tested by our group (unpublished results). The aim of the present work is to chemically characterize an aqueous extract from *Larrea tridentata* and to evaluate both the possible toxicity and anti-inflammatory effects when the extract is administered orally to Wistar rats.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Plant material and chemicals**

The vegetal material was collected in the autumn in Matehuala, San Luis Potosi. Plants were dried under mild sunlight to constant weight and leaves were separated from tails. A voucher specimen was identified and deposited at Isidro Palacios Herbarium from Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Air-dried leaves were ground in a grinding machine until a particle size of 1 mm was obtained. This material was kept from light at 22°C for their subsequent use. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ethanol, acetonitrile and methanol were purchased from Honeywell (MI, USA). Ultrapure water from a Milli-Q-System (Millipore Inc., USA) was employed.

### **Extraction Methodology**

Infusion process with deionized water was used for the extraction. The proportion of 40 ml of solvent per gram of poured and dry leaves was selected for the extraction procedure. Extraction was performed at 65°C for 40 minutes. After extraction, tubes were cooled for 30 min. 1 mL from each tube was transferred to one dried cresol, previously weighted and incubated at 96 °C until constant weight. The obtained suspension was filtered through wathman paper and concentrated in a rotary evaporator at reduced pressure and a temperature of 55 °C. Total dry was achieved by lyophilisation. The process was carried out by triplicate.

## **Spectrometric characterization**

At Centro de Biotecnología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí México, the separation and detection of the components was performed on a Waters ACQUITY UPLC system (Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled with a Waters Synapt™ High Definition TOF Mass system (Waters Corp., Milford, USA) equipped with the electrospray as ionization source. Chromatographic separations were achieved on an ACQUITY UPLC™ BEH C18 column (50 mm × 2.1 mm i.d., 1.7 μm, Waters Corp.) at 30°C and the flow rate of the mobile phase was 0.20 mL/min. Mobile phase A was acetonitrile while mobile phase B consisted of 0.1% formic acid in water. The column was eluted with a linear gradient of 10–90% A over initial 7.0 min, 90–10% A over 1.5 min, 10–90% A over 30 s. The mass spectrometric full-scan data were acquired in the negative ion by Z mode from 50 to 1200 Da with a 0.5 s scan time. Other conditions were as follows: Capillary voltage of 2.5 kV, sample cone voltage of 20–50 V, desolvation temperature of 150°C, source temperature of 80°C, cone gas flow of zero L/h and desolvation gas flow of 600 L/h for negative ion mode. Data were continuum and mass was corrected during the acquisition using an external reference (Lock-Spray™) consisting of a 200 pg/mL solution of leucine enkephalin infused at a flow rate of 0.01 mL/min via a lockspray interface, generating a reference ion for negative ion mode ( $[M-H]^- = 554.2615$  Da) to ensure accuracy during the MS analysis. Collision induced dissociation (CID) experiments were carried out using Argon as collision



gas and collision energies were in the range of 20–45 V. Data were analysed by MassLynx 3Æ5 software.

### ***In vivo* studies:**

#### **Animals**

The study was developed at animal facilities of the Centro de Biociencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México. Animal procedures were reviewed and supervised by a Bioethics Committee in accordance with the Official Mexican Regulations on Technical Specifications in the Production, Maintenance and Use of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999). Wistar rats were housed under normal conditions of temperature and humidity, and maintained on a free access diet of rodent chow and fresh water.

#### **Acute toxicity**

Wistar rats (n = 35, 8-9 weeks old) 226 g ( $\pm 18.26$ ) body weight, were randomly distributed in four separated groups and were orally inoculated with a single dose of the aqueous extract at 0.5, 1 and 1.5 g/Kg (of body weight) of the aqueous extract. Control treatment was a single dose of phosphate buffered saline solution (PBS). Intra-gastric cannula was used for the inoculation. Aliment was retired 4 h prior inoculation. Rats were observed for 15 days in order to determine the toxicity of the given doses and were weighed weekly. Water and feed intake was also recorded on a weekly basis. Blood was extracted by retro-orbital puncture under light anaesthesia at days 7 and 14. Blood samples were centrifuged at 4,000

x g for 15 min at 4°C and the recovered serum samples were stored at –80°C until analysed.

### **Chronic toxicity**

A group of ten Wistar rats 8-9 weeks old ( $245.30 \pm 19.08$  body weight) was daily inoculated with 1.5 g/Kg of body weight of vegetal extract by intra-gastric route over four weeks. Blood samples were collected under light ether anaesthesia from the medial cantus of the eye at days 0 and 28 and serum was obtained and properly stored. Water and food intake as well as body weight was monitored weekly. At day 28, rats were ethically sacrificed by diethyl ether inhalation. Liver and kidney were excised immediately, rinsed with PBS, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C until utilized.

### **Determination of biochemical parameters in sera**

Commercial kits (Spinreact, Spain) were used for determination of alanine transaminase (ALT), glutamic piruvic transaminase (TGP), glutamic oxalacetate transaminase (TGO), aspartate amine transferase (ASAT), alkaline phosphatase (ALP) and triglycerides, glucose in sera. Determinations were performed following manufacturer instructions.

## **RNA isolation and Real Time PCR**

For evaluation of gene expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$ , total RNA was extracted from frozen liver and kidney tissues using TRIzol Reagent following manufacturer instructions (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Reverse transcription was carried as follows: 10 min at room temperature, 37 °C for 90 min and 94 °C for 5 min (one cycle). Real-time PCR was performed in a 10  $\mu$ l of reaction solution containing 5  $\mu$ l of 2X SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 200 nM primers and cDNAs. The cycles for PCR were as follows: 95 °C for 5 min, 39 cycles of 95 °C for 30 seg, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s. Melting curves were determined by heat-denaturing PCR products with a temperature gradient. All samples were normalized by the corresponding expression of 18S. The expression level of the gene of interest in the extract-treated group relative to the control group expression level was calculated by using the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## **Statistical analysis**

Evaluation of the biochemical parameters between *Larrea tridentata*-treated groups and control group were performed using Student's t-test or Mann-Whitney Rank Sum Test. Differences in the cytokines mRNA expression levels were analysed using one way analysis of variance on ranks coupled to Dunn's Method. SigmaPlot v11 (Systat Software Inc., San Jose, CA) and Graph-Pad Prism 5 v5.03 (Graph-Pad Software, San Diego, California, USA) software were used to perform the statistical analysis. A significance level of 0.05 was considered.

## RESULTS

### Spectrometric identification

The identification of active compounds in the vegetable extract was performed by Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry (LC-ESI/MS). Figure 1 shows the mass spectra of the vegetal extract. Analysis of the aqueous extract by direct infusion revealed good ESI ionization efficiency in the negative ion mode, with molecular base ion at  $m/z$  301.1765 and  $m/z$  285.0980 for protonated  $[M- H]^-$ . These masses correspond to the monoisotopic masses reported for NDGA (Xiu-Qin *et al.*, 2009) and Kaempferol (Chen and Chen 2013) respectively.

When LC was performed, a major peak eluted with a retention time of 4.30 min and other minor fraction eluted at 6.41 min (Figure 2A). Analysis of the major peak by ESI/MS, revealed the presence of a molecular base ion at  $m/z$  301.2069, corresponding to the molecular mass of NDGA (Figure 2B).

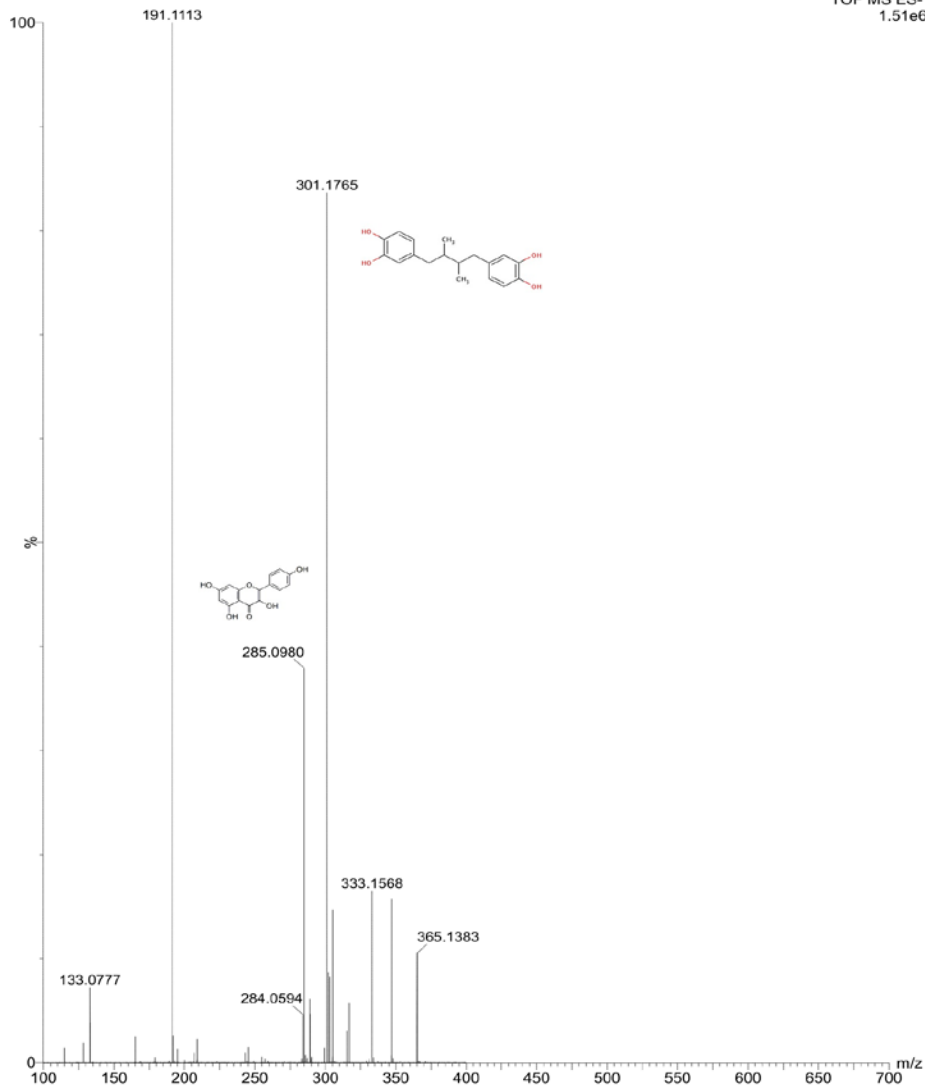


Figure 1: Mass spectra of the aqueous extract of *Larrea tridentata*. Direct infusion (ESI/MS) in negative mode revealed the presence of two peaks of m/z 301.1765 and 285.0980, corresponding to the monoisotopic mass of NDGA and Kaempferol respectively.

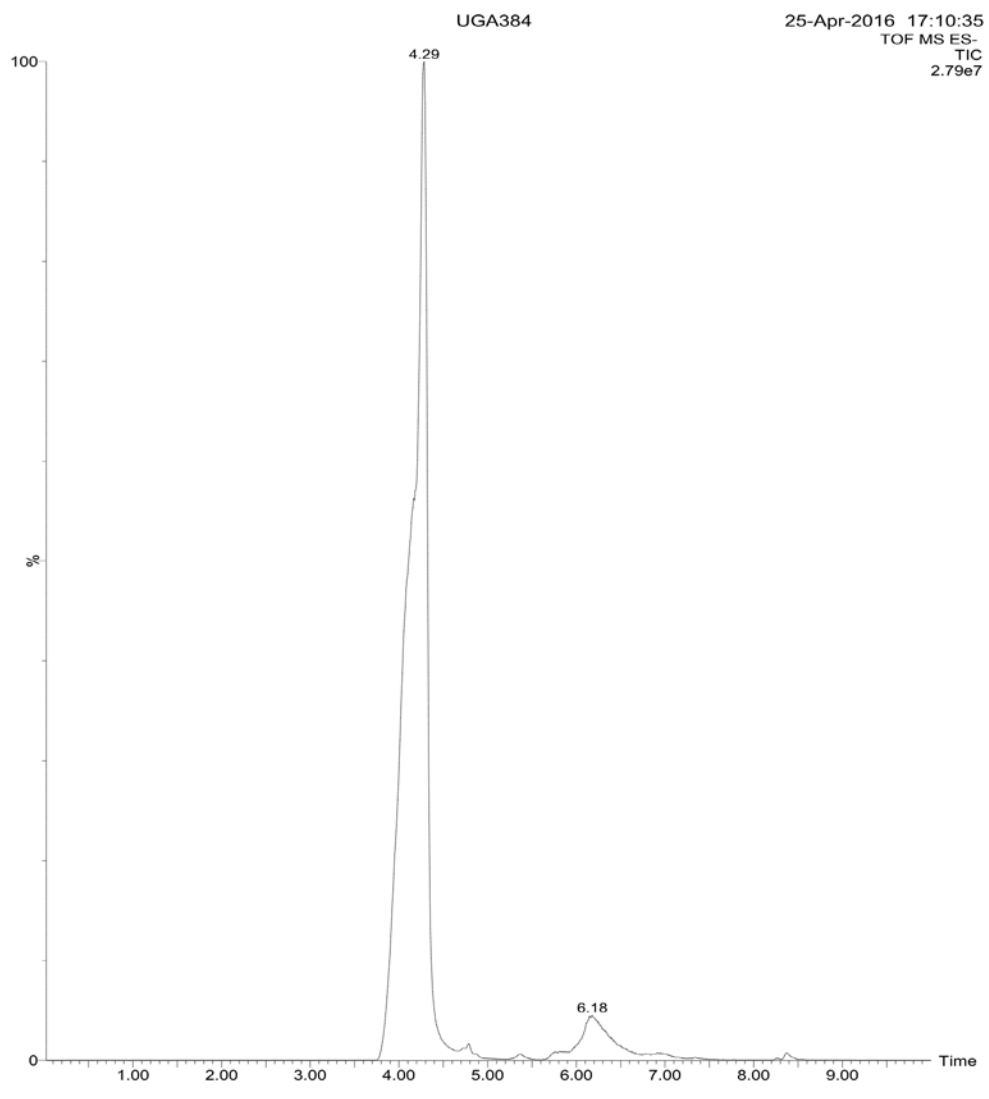


Figure 2: A: Chromatographic profile of the aqueous extract.

NDGA 50 mcg/ml H2O/ACN 1:2 IONIZACION NEGATIVA, IONES 301.20, 302 Y 303  
NDGA 080416\_A 1 (0.034)

08-Apr-2016 12:26:29  
TOF MS ES-  
4.41e6

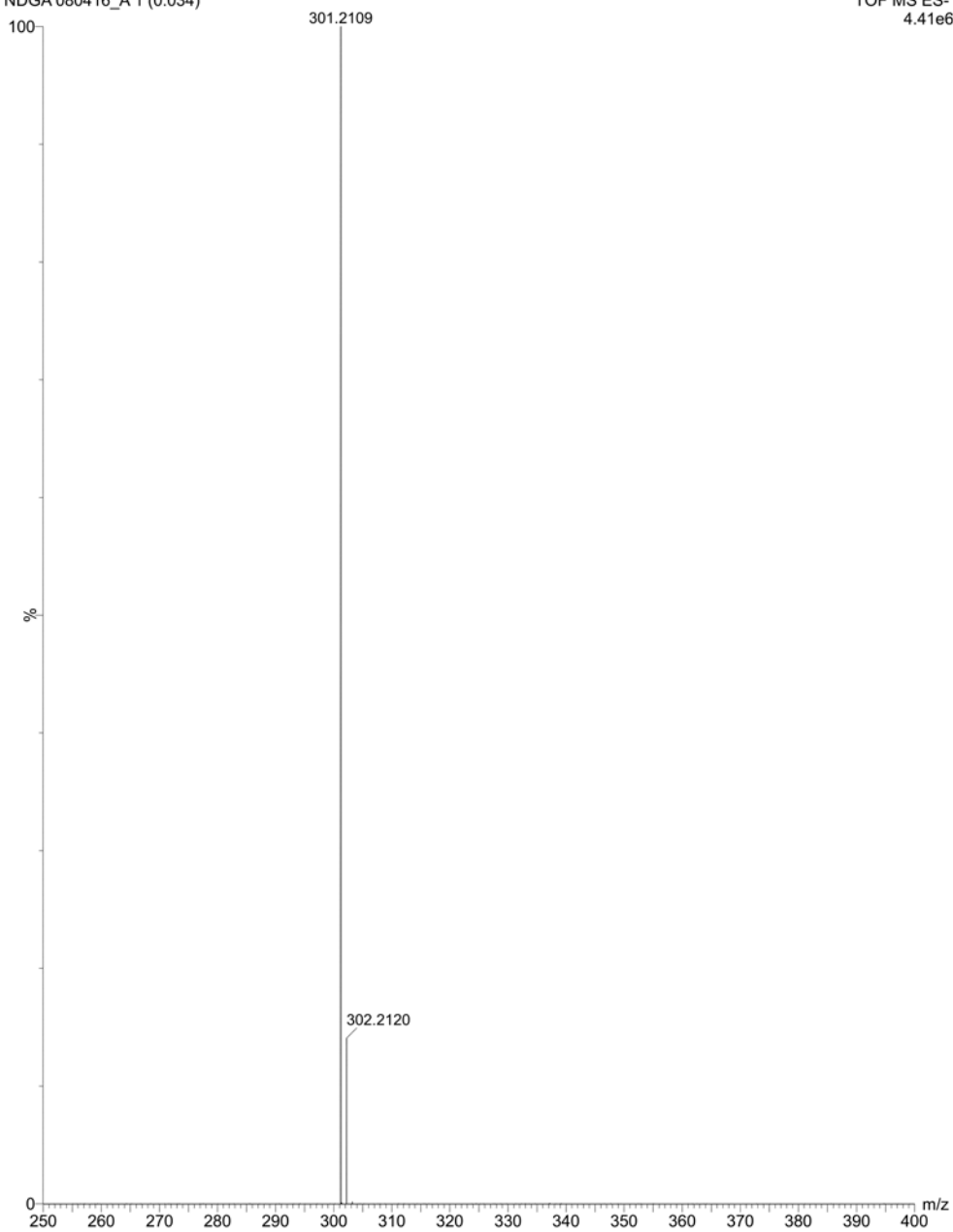


Figure 2:B: MS of the first eluted peak. The presence of the peak of m/z 301.2109 correspond to the molecular mass of NDGA.

To validate the identity of the NDGA, MS/MS analysis was performed and ions with molecular mass of 301.2069 were fragmented into daughter ions (collision energy 28). As a result, in both the standard and aqueous extract samples an identical fragmentation pattern was obtained, consisting of one fragment with  $m/z$  122.1174 for the extract and a fragment of  $m/z$  122.1017 for the standard, respectively (Figure 3A and 3B).

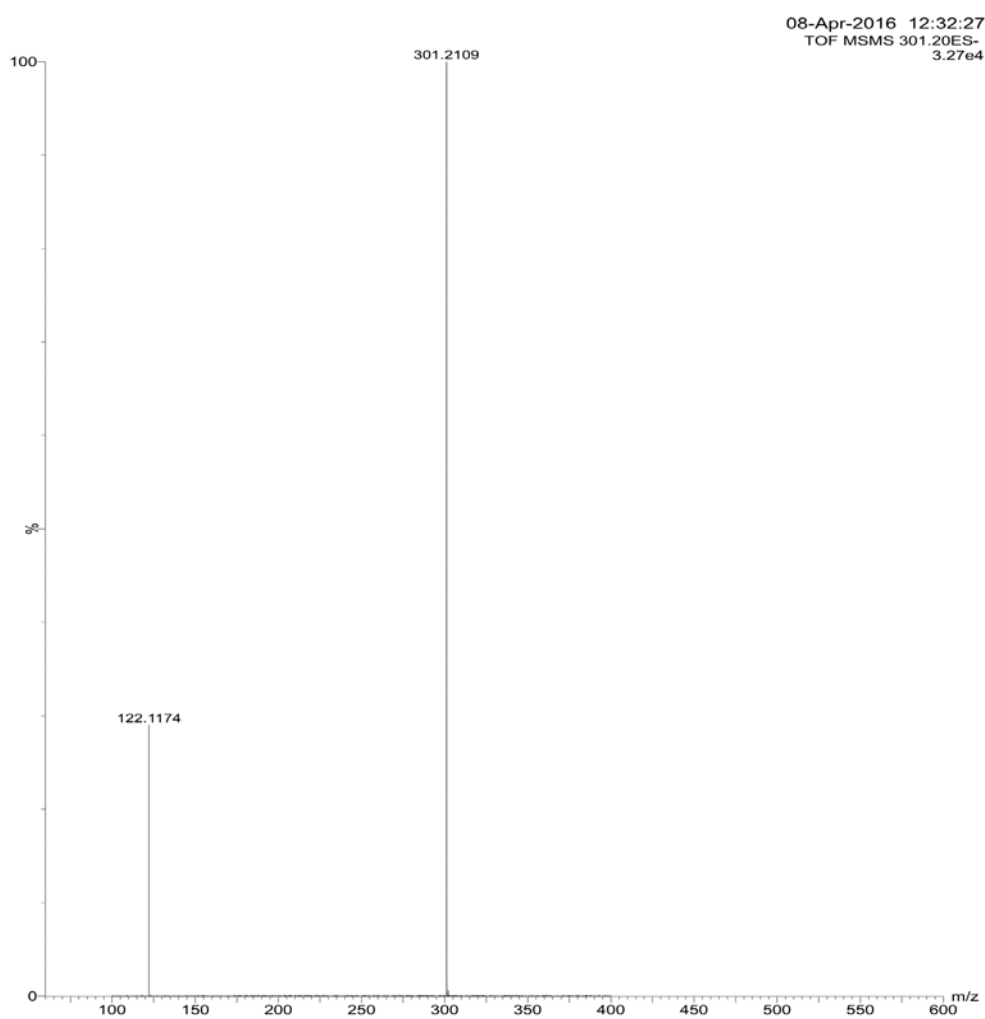


Figure 3: A: Fragmentation of peak  $m/z$  301.2109 from the first eluted peak of the aqueous extract rendering a fragment of  $m/z$  122.1174.



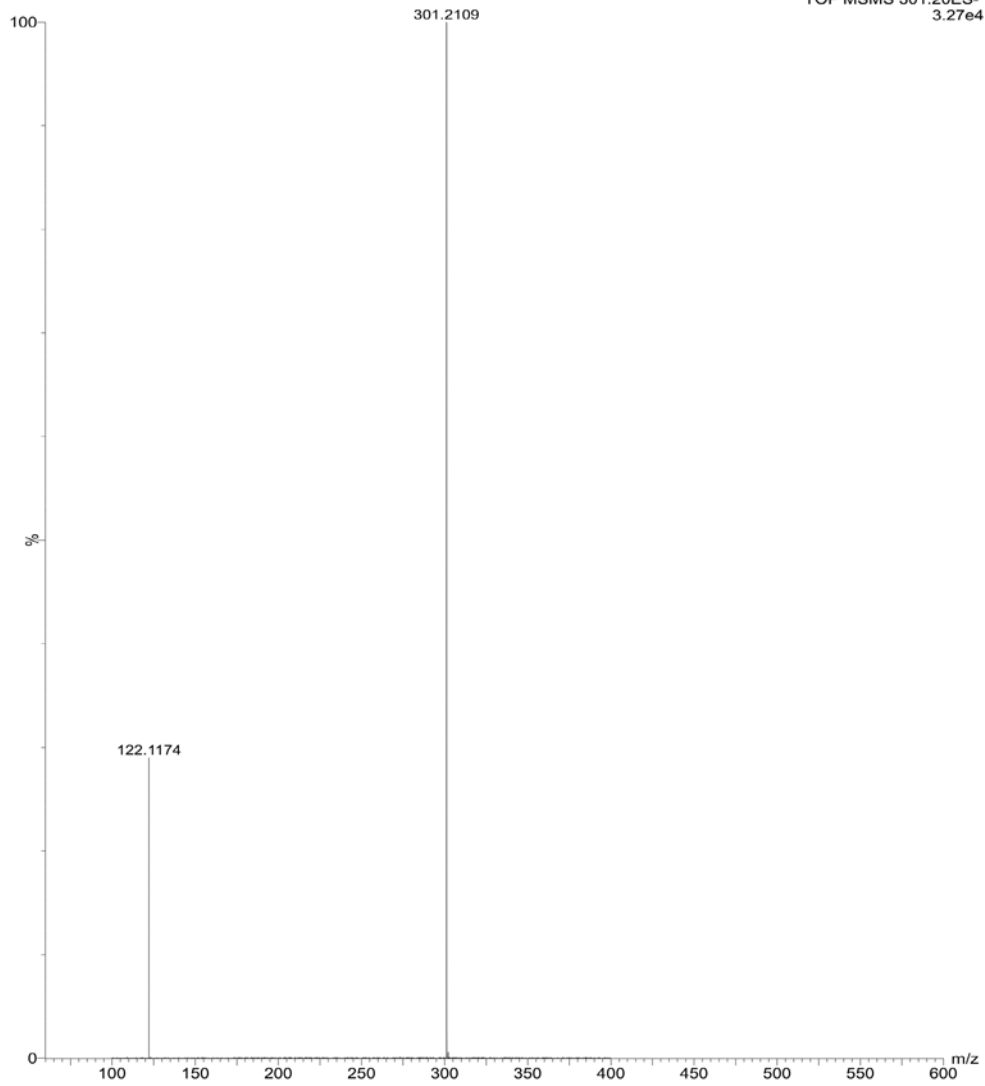


Figure 3:B: Fragmentation of the peak m/z 301.1841 from the NDGA standard rendering a fragment of 122.1017. Product ions observed were consistent with predicted fragmentation patterns NDGA with a base peak at m/z 122.1 Da.

### **Acute toxicity**

For determining the possible toxicity of the aqueous extract, Wistar rats were inoculated orally with a sole dose of the extract. Rats were divided in four groups of five rats each, receiving 0.5, 1, 1.5 g/kg or PBS. After 15 days, no deaths were recorded. Rats did not present diarrhoea, pain, weight loss or changes in behaviour during the evaluated period. Table 1 shows the results of biochemical parameters determined in sera. At day seven, the group inoculated with 0.5 g/kg showed significant differences in the AST values when compared with control group ( $P = 0.015$ ). At day 14, all the groups treated with the extract showed significant diminution of ALT ( $P = 0.01$ ). At the moment of sacrifice, no macroscopic alterations in kidney, liver, intestine and spleen were observed.

### **Chronic toxicity**

For determining the effect of repeated administration of the aqueous extract, the selected dose of 1 g/kg was inoculated orally during 4 weeks. We observed a significant decrease in the level of ALT ( $P = 0.004$ ), AST ( $P < 0.001$ ) and ALP ( $P = 0.021$ ) respect to the control group (Table 2). In the first week there was significant difference in food intake ( $P = 0.002$ ) and water consumption ( $P = 0.002$ ). There were not significant differences in the body weight between control and treated animals. There were not macroscopic alterations in kidney, liver, intestine and spleen at the moment of sacrifice.

## Gene expression of IL-6, IL-1 $\beta$ and TNF- $\alpha$

In order to evaluate the effect of repeated administration of *Larrea tridentata* in the expression of genes coding for pro-inflammatory cytokines, real-time PCR was performed, amplifying mRNA from liver and kidneys of rats treated with the aqueous extract. Figure 4 shows the results from relative gene expression of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in liver (A) and kidney (B). In both organs, the expression level of the cytokines was significantly down-regulated ( $P < 0.05$ ) with respect to that in control rats.

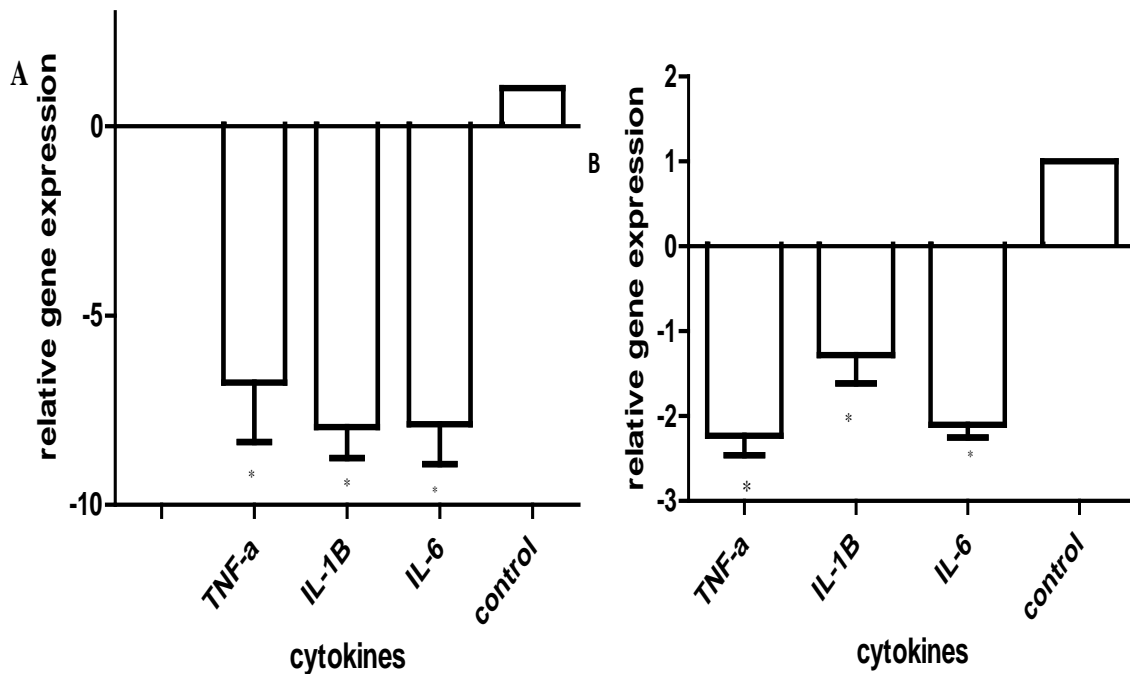


Figure 4: Relative gene expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  mRNA in liver (A) and kidneys (B) of rats administered with repeated dose of the aqueous extract at day 28. Expression of TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 was evaluated by quantitative RT-PCR

using the 18S as gene control. Results are expressed as the percentage of the relative mRNA intensity with respect to untreated cells. The data are shown as the mean +/- S.E.M. \* $P < 0.05$  compared to the untreated cells.

## DISCUSSION

The chemical composition of a vegetable extract depends strongly on the procedure and solvents used for fractionating the plant (Martins *et al.*, 2012). For this reason, it is necessary to characterize the extract obtained under specific extraction conditions. In the present work, the aqueous extract from *Larrea tridentata* was characterized by mass spectrometry. It was possible to identify the presence of NDGA and kaempferol, based on the coincidence in their isotopic molecular mass reported in the literature and chemical databases (ChemSpider, Royal Society of Chemistry). Moreover, the pattern of fragmentation of the standard NDGA was identical to that observed when a peak of  $m/z$  301 detected in the aqueous extract was fragmented under the same conditions (Figure 3A and 3B). The lignan NDGA is present in 5-10% of the leaves dry weight. The highest concentration of NDGA is in leaves (38.3 mg/g). However, in aqueous solutions, the NDGA is unstable and has relatively short half-life, which may explain the relatively low concentration of this metabolite in the aqueous extract. By comparison, kaempferol is a flavonoid found in many edible plants and, several preclinical studies have demonstrated the wide pharmacological effect of this product (Calderon-Montano *et al.*, 2011). Under the specific ionization conditions used in our study, it was not possible to identify other compounds such as

apigenin (monoisotopic mass 270.052826 Da) and dihydroguaiaretic acid (monoisotopic mass 330.183105 Da), commonly identified in different *Larrea tridentata* extracts. However, a major peak of m/z 191.1113 was observed. Although not confirmed, this peak could correspond to the molecular mass of quinic acid, which has the monoisotopic mass of 192.16658 g/mol and has been found in many different plants, such as tobacco leaves, carrot leaves, apples, peaches, pears, plums, vegetables. This compound is a cyclic polyol, and a cyclohexanecarboxylic acid, and its abundance in leaves is strongly dependant on season and growing stage. Further analysis will be required to confirm the presence of this compound in this extract.

In this study, the aqueous extract orally administrated to Wistar rats did not produce visible signs of stress (pain, diarrhoea, weight loss), which are commonly associated with toxicity. In the single dose experiment, none of the evaluated doses produced mortality during the 15 days of follow. Because the doses employed don't produce mortality the LD<sub>50</sub> was not possible to calculate. However, reported acute NDGA LD<sub>50</sub> for rodents range between 800 and 5500 g/kg body weight orally (Krubiner *et al.*,1972). At 14 days, significant decrease was observed in the levels of ALT between the different doses with respect to the control group. It was also observed that a tendency of AST and ALP levels to diminution with respect to the control group. These differences were more pronounced when the administration was done in repeated doses (chronic toxicity). In this experiment, we observed a significant decrease in the level of ALT, AST and ALP (P < 0.05) with respect to the control group (Table 2). Although several authors have reported the

increase of liver enzyme levels and hepatotoxicity associated with the consumption of chaparral, in those reported cases, the ingested doses have been elevated for long periods of time (Sheikh *et al.*, 1997). In our study, the dose employed for the experiment of chronic toxicity was 1 g/kg during four weeks, which is substantially lower than the equivalent doses employed in humans suffering from hepatitis. Release of liver mitochondrial enzymes is associated with increased levels of reactive oxygen species (ROS) produced in states of oxidative stress (Cichoz-Lach and Michalak 2014). The reduction of the level in hepatic enzymes could be related to the antioxidant character of NDGA and other polyphenols present in the extract, although the demonstration of the antioxidant level of NDGA was not conducted in our study. Several studies conducted in animals and humans have demonstrated this antioxidant property (Lu *et al.*, 2010, Guzman-Beltran *et al.*, 2013). It has been reported that NDGA is a potent peroxynitrite, singlet oxygen, hydroxyl radical, superoxide anion and hypochlorous acid scavenger, due to the presence of two catechol groups, in which, hydrogen atoms of the four phenolic hydroxyl groups react with reactive oxygen species (Paracatu *et al.*, 2015). It has been also reported that NDGA has the potential to act both as a pro- and anti-oxidant, depending on its concentration and biological environment (Sahu *et al.*, 2006, Hernandez-Damian *et al.*, 2014).

When the expression of pro-inflammatory cytokines after repeated oral administration of the aqueous extract was assessed, significant differences were obtained in the levels of these pro-inflammatory cytokines in liver and kidney with respect to control group (Figure 4 A, B). The relative gene expression of those

cytokines showed a down-regulation pattern when rats were treated with the aqueous extract. These cytokines are involved in inflammatory responses during acute or chronic rat liver injury. In the extract, due to the confirmed presence of NDGA and kaempferol, it is possible to suggest that both bioactive compounds could act synergistically reducing hepatotoxicity and inflammation. NDGA has been proven to selectively inhibit arachidonic acid 5-lipoxygenase activity, which reduces leukotriene and prostaglandin synthesis, thus leading to a reduction of inflammatory pathways (Bhattacharjee *et al.*, 1988). A recent study demonstrated that not only the antioxidant activity of NDGA but also its high hydrophobicity is a determinant in the pharmacological properties of this molecule (Paracatu *et al.*, 2015). Further studies with this extract are needed to demonstrate the anti-inflammatory effect in an *in vivo* model of induced inflammation. The antimicrobial effect of this extract (unpublished results) together with the absence of toxicity associated with the administration of this low dose of *Larrea tridentata* may suggest their use as a possible secure disinfectant in animal facilities, where its antimicrobial effect could lead to its being employed as a substitution for more aggressive chemical compounds.

## CONCLUSION

The aqueous extract from *Larrea tridentata* obtained in this work, contains NDGA and kaempferol, among other bioactive components. We demonstrated that the repeated administration of low doses of the aqueous extract did not produce acute or chronic toxicity in Wistar rats. Significant reduction in the level of hepatic enzymes was also observed after repeated oral administration. Moreover, the extract downregulates the expression of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6. These results allow to suggest the safe use of the aqueous extract of *Larrea tridentata* in animal facilities.



Table 1: Biochemical parameters evaluated in the acute toxicity experiment at 7 and 14 days post-inoculation with different doses of *Larrea tridentata*.

	7 days				P value
	0.5g/Kg	1 g/Kg	1.5 g/Kg	Control	
Glucose	155.4 ± 4.3	148.8 ± 3.8	149.0 ± 6.3	150.6 ± 8.9	0.334
Triglycerides	168.4 ± 9.2	172.2 ± 17.9	164.8 ± 9.2	166.0 ± 11.3	0.804
Cholesterol	119.2 ± 37.6	126.8 ± 34.9	125.8 ± 39.2	111.5 ± 40.0	0.808
ALT	40.8 ± 4.6	39.8 ± 4.0	40.4 ± 6.5	42.6 ± 7.4	0.886
AST	86.2 ± 2.7	82.0 ± 4.9	81.0 ± 2.7	77.2 ± 3.2	<b>0.015*</b>
ALP	110.2 ± 3.8	109.6 ± 9.8	111.4 ± 5.3	113.5 ± 5.2	0.823

	14 days				P value
	0.5 g/Kg	1 g/Kg	1.5 g/Kg	Control	
Glucose	149.4 ± 4.3	142.8 ± 3.8	143.0 ± 6.3	150.6 ± 2.0	0.051
Triglycerides	165.4 ± 9.2	169.2 ± 17.9	161.8 ± 9.2	102.6 ± 26.5	0.056
Cholesterol	116.2 ± 37.6	123.8 ± 34.9	122.8 ± 39.2	96.0 ± 19.0	0.61
ALT	37.8 ± 4.6	36.8 ± 4.0	37.4 ± 6.5	52.6 ± 9.2	<b>0.01**</b>
AST	83.2 ± 2.7	79.0 ± 4.9	78.0 ± 2.7	79.3 ± 3.2	0.158
ALP	107.2 ± 3.8	106.6 ± 9.8	108.4 ± 5.3	119.0 ± 4.0	0.083

\*Differences between group treated with 0.5 g/Kg and control group.

\*\*Differences between all treated- groups and control group

Table 2: Parameters evaluated in the experiment of chronic toxicity with repeated administration of 1 g/kg of the aqueous extract.

Parameter	Control	Extract 1 g/kg	P value
<b>Body Weigth</b>			
initial	245.3 ± 19.0	244.400 ± 19.552	0.918
Week 1	254.0 ± 17.9	250.778 ± 20.030	0.716
Week 2	263.2 ± 17.2	258.000 ± 20.609	0.557
Week 3	272.6 ± 16.2	266.333 ± 21.101	0.475
Week 4	278.1 ± 17.6	272.889 ± 21.734	0.572
<b>Feed Intake</b>			
Week 1	125.0 ± 8.6	116.6 ± 10.7	<b>0.002</b>
Week 2	141.6 ± 9.7	113.2 ± 12.4	<b>&lt; 0.001</b>
Week 3	137.4 ± 9.8	122.2 ± 11.2	0.019
Week 4	109.2 ± 6.9	104.4 ± 5.3	0.116
<b>Water intake</b>			
Week 1	339.6 ± 66.8	251.5 ± 32.4	<b>0.002</b>
Week 2	391.4 ± 91.8	325.3 ± 47.3	0.07
Week 3	401.0 ± 52.9	343.1 ± 104.3	0.128
Week 4	320.0 ± 67.8	286.6 ± 111.6	0.129
<b>Hepatic enzymes*</b>			
ALT	53.4 ± 7.8	43.6 ± 5.1	<b>0.004</b>
AST	146.7 ± 26.8	85.0 ± 5.6	<b>&lt; 0.001</b>
ALP	119.7 ± 3.6	114.0 ± 6.0	<b>0.021</b>

\*Hepatic enzymes were determined in the sera at day 28.

## REFERENCES

- Alderman, S., S. Kailas, S. Goldfarb, C. Singaram and D. G. Malone 1994  
Cholestatic hepatitis after ingestion of chaparral leaf: confirmation by  
endoscopic retrograde cholangiopancreatography and liver biopsy. *J  
Clin Gastroenterol.* 19 242-247.
- Arteaga, S., A. Andrade-Cetto and R. Cardenas 2005 *Larrea tridentata* (Creosote  
bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its  
metabolite nordihydroguaiaretic acid. *J Ethnopharmacol.* 98 231-239.
- Batchelor, W. B., J. Heathcote and I. R. Wanless 1995 Chaparral-induced hepatic  
injury. *Am J Gastroenterol.* 90 831-833.
- Bhattacharjee, P., N. K. Boughtonsmith, R. L. Follenfant, L. G. Garland, G. A.  
Higgs, H. F. Hodson, P. J. Islip, W. P. Jackson, S. Moncada, A. N.  
Payne, R. W. Randall, C. H. Reynolds, J. A. Salmon, J. E. Tateson and  
B. J. R. Whittle 1988 The Effects of a Novel Series of Selective  
Inhibitors of Arachidonate 5-Lipoxygenase on Anaphylactic and  
Inflammatory Responses. *Annals of the New York Academy of  
Sciences.* 524 307-320.
- Calderon-Montano, J. M., E. Burgos-Moron, C. Perez-Guerrero and M. Lopez-  
Lazaro 2011 A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev  
Med Chem.* 11 298-344.
- Cichoż-Lach, H. and A. Michalak 2014 Oxidative stress as a crucial factor in liver  
diseases. *World Journal of Gastroenterology.* 20 8082-8091.

Committee on the Framework for Evaluating the Safety of Dietary Supplements, Food and Nutrition Board, Board on Life Science, Institute of Medicine and National Research Council of the National Academies 2005 *Dietary Supplements: A Framework for Evaluating Safety*. The National Academies Press, Washington, DC.

Chen, A. Y. and Y. C. Chen 2013 A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food Chem.* 138 2099-2107.

Chen, H., L. Teng, J. N. Li, R. Park, D. E. Mold, J. Gnabre, J. R. Hwu, W. N. Tseng and R. C. Huang 1998 Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 2. Targeting herpes simplex virus replication by the mutation insensitive transcription inhibitor tetra-O-methyl-NDGA. *J Med Chem.* 41 3001-3007.

Gnabre, J., R. Bates and R. C. Huang 2015 Creosote bush lignans for human disease treatment and prevention: Perspectives on combination therapy. *J Tradit Complement Med.* 5 119-126.

Goodman, T., H. C. Grice, G. C. Becking and F. A. Salem 1970 A cystic nephropathy induced by nordihydroguaiaretic acid in the rat. Light and electron microscopic investigations. *Lab Invest.* 23 93-107.

Guzman-Beltran, S., J. Pedraza-Chaverri, S. Gonzalez-Reyes, F. Hernandez-Sanchez, U. E. Juarez-Figueroa, Y. Gonzalez, K. Bobadilla and M. Torres 2013 Nordihydroguaiaretic acid attenuates the oxidative stress-induced decrease of CD33 expression in human monocytes. *Oxid Med Cell Longev* 2013 1-14.

- Guzman-Beltran, S., M. A. Rubio-Badillo, E. Juarez, F. Hernandez-Sanchez and M. Torres 2016 Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and alpha-mangostin inhibit the growth of *Mycobacterium tuberculosis* by inducing autophagy. *Int Immunopharmacol.* 31 149-157.
- Hernandez-Damian, J., A. C. Anderica-Romero and J. Pedraza-Chaverri 2014 Paradoxical cellular effects and biological role of the multifaceted compound nordihydroguaiaretic acid. *Arch Pharm (Weinheim).* 347 685-697.
- Krubiner, A., A. Perrotta, H. Lucas and E. P. Oliveto 1972 Vanadium (IV) chloride induced allylic rearrangement of a steroidal alcohol. *Steroids.* 19 649-657.
- Lu, J. M., J. Nurko, S. M. Weakley, J. Jiang, P. Kougias, P. H. Lin, Q. Yao and C. Chen 2010 Molecular mechanisms and clinical applications of nordihydroguaiaretic acid (NDGA) and its derivatives: an update. *Med Sci Monit.* 16 RA93-100.
- Martins, S., C. N. Aguilar, J. A. Teixeira and S. I. Mussatto 2012 Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *Separation and Purification Technology.* 88 163-167.
- Paracatu, L. C., C. M. de Faria, M. L. Zeraik, C. Quinello, C. Renno, P. Palmeira, L. M. da Fonseca and V. F. Ximenes 2015 Hydrophobicity and antioxidant activity acting together for the beneficial health properties of nordihydroguaiaretic acid. *Food Funct.* 6 1818-1831.

- Sahu, S. C., D. I. Ruggles and M. W. O'Donnell 2006 Prooxidant activity and toxicity of nordihydroguaiaretic acid in clone-9 rat hepatocyte cultures. *Food Chem Toxicol.* 44 1751-1757.
- Sheikh, N. M., R. M. Philen and L. A. Love 1997 Chaparral-associated hepatotoxicity. *Arch Intern Med.* 157 913-919.
- Smith, B. C. and P. V. Desmond 1993 Acute hepatitis induced by ingestion of the herbal medication chaparral. *Aust NZ J Med.* 23 526.
- Verastegui, M. A., C. A. Sanchez, N. L. Heredia and J. S. Garcia-Alvarado 1996 Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. *J Ethnopharmacol.* 52 175-177.
- Xiu-Qin, L., J. Chao, S. Yan-Yan, Y. Min-Li and C. Xiao-Gang 2009 Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. *Food Chemistry.* 113 692-700.

### **CAPITULO III. EMPLEO DE UN EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *Larrea tridentata* PARA DESINFECCIÓN DE INSTALACIONES AVÍCOLAS**

#### **USANDO**

#### **RESUMEN**

En un estudio previo, se obtuvo el extracto acuoso de las hojas de *Larrea tridentata*, para evaluar su efecto biocida, éste se aplicó en una granja comercial productora de pollo de engorda y se comparó con la técnica de desinfección de rutina de la granja. La nave se dividió en tres áreas: 1.- desinfección con el método de rutina (MR), 2.- Área sin desinfectar (SD) y 3.- aplicación del extracto acuoso de *Larrea tridentata* (EA). La concentración empleada del extracto fue de 0.4 g mL<sup>-1</sup> de agua. Después de aplicar el método correspondiente, se tomaron muestra del piso, la pared, el techo y la cortina de la nave, los microorganismos presentes se sembraron e incubaron en medio específico para *Salmonella*, se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) que se desarrollaron y se emplearon pruebas bioquímicas para corroborar que se trataba de *Salmonella*. Los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa, entre los procesos de desinfección ( $p < 0.01$ ), encontrando la mayor concentración de UFC en las áreas SD. En el piso, el MR mostró la menor concentración de UFC comparado con el EA. En el techo y la cortina, el uso del MR y EA fue similar estadísticamente ( $p > 0.01$ ), mientras que en la pared, el uso del EA mostro una menor concentración de UFC, por lo que se concluye que el uso del extracto acuoso de *Larrea tridentata* puede ser una alternativa natural, segura, económica y eficiente como agente biocida para desinfectar este tipo de instalaciones

Palabras clave: instalaciones avícolas, extracto acuoso de *Larrea tridentata*.

## INTRODUCCIÓN

El estado sanitario de las instalaciones y equipo de los productores de aves de traspatio es muy deficiente, debido a que durante el proceso productivo la tecnología que tienen disponible es limitada, principalmente por falta de recursos económicos, dificultad de acceso a la tecnología, lejanía de sus unidades de producción con los centros urbanos o por falta de equipo de seguridad para la aplicación de diversos biocidas, por lo que los principios de limpieza y desinfección difícilmente son llevados a la práctica. Igualmente, en las instalaciones pecuarias tecnificadas, los procesos de desinfección juegan un papel muy importante al disminuir la mortandad y evitar que las aves sean potenciales vectores de enfermedades emergentes, como la Salmonelosis (Vignoli, 2006; Camacho-Escobar *et al.*, 2010). La gama de biocidas comerciales es muy diversa, encontrando entre otros, fenoles y cresoles en solución con ácido sulfúrico (Islas *et al.*, 1987), lo que limita su uso al ser considerado tóxico, cancerígeno y corrosivo (Vignoli, 2006); El hipoclorito de sodio, con la desventaja de que requiere ser aplicado en lugares cerrados, oscuros y templados, además de irritar la piel de las personas y ser corrosivo para las instalaciones; Los cuaternarios y tensoactivos de amonio tienen poder bactericida, inhiben el crecimiento de hongos y esporas, tienen efecto en sobre virus envueltos en cápsulas lipídicas, pero son inefectivos en los virus no envueltos (Mc Donell, 1999). Estos problemas han conducido a que diversos investigadores busquen alternativas de desinfección naturales, eficientes y seguras. De ahí que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto biocida del extracto acuoso de las hojas de *Larrea tridentata* sobre *S. typhimurium* empleando como un modelo una instalación avícola.



## REVISIÓN DE LITERATURA

### Salmonelas zoonóticas en México y América Latina

En América, las infecciones en los seres humanos representan alrededor del 57% de las enfermedades transmitidas por bacterias presentes en los alimentos, y cerca del 10% de estas infecciones son causadas por la ingesta de carne o huevo de aves de corral contaminadas por bacterias (Terzolo, 2012), encontrando reportes desde la década de los 80 que *S. typhimurium* se encontró presente en la carne de pollo y huevos (Quintana, 1998). Esta prevalencia de serovariedades de Salmonella en las aves de corral varía según el países y el períodos de tiempo que se consideren (estaciones del año, clima), ciertos serotipos surgen en un país o región durante un período determinado y luego desaparecen sin ninguna causa aparente o medida de intervención. Históricamente *S. Typhimurium* ha sido la serovariedad más frecuentemente aislada en los seres humanos como en las aves de corral. (Terzolo, 2012).

La incidencia de salmonelosis de origen alimentario ha aumentado considerablemente en el mundo industrializado y ha alcanzado proporciones epidémicas en varios países, este incremento es el resultado de una combinación de factores relacionados con el desarrollo de la industrialización en todas las fases de producción de alimentos, cambios en la práctica del manejo de estos, así como en el almacenamiento, distribución y preparación de los mismos, lo que ha traído como consecuencia nuevos problemas en la higiene de los alimentos al originar una fácil diseminación de Salmonella, así como de otros gérmenes patógenos (Gutiérrez *et al.*, 2000). En México, en el periodo de 1994 a 1998, las

notificaciones de casos por salmonelosis registrarón un incremento de 100,342 casos en 1994 a 215,155 en 1998 (tasa de 111.21 y 223.53 por 100, 000 habitantes, respectivamente), con una mayor incidencia en los individuos de 15 a 64 años de edad, siendo los de 25 a 44 años los más afectados. Con respecto a la temporalidad, ésta se intensifica a partir de los meses de abril y mayo, alcanzando un pico en julio, con una disminución en septiembre y octubre. Los estados más afectados han sido Tabasco, Coahuila, Chiapas y Quintana Roo (Gutiérrez *et al.*, 2000).

### **Mecanismos de transmisión de *Salmonella***

Existen diversas formas por las cuales se puede transmitir salmonella entre aves y unidades de producción de pollos:

- a) Transovarica o vertical: en la cual la gallina transmite la bacteria a su descendencia a través del proceso de formación y postura de huevo.
- b) A través del cascarón: Algunas bacterias en la que se incluye *Salmonella*, son permeables al cascarón de huevo, infectando la producción de la granja.
- c) Transmisión directa: En granjas con aves de diferentes edades, las aves que han sido infectadas y han superado la enfermedad, se les considera aves portadoras sanas y pueden infectar al resto de los animales.
- d) Transmisión indirecta: Este mecanismo está relacionado con las deficiencias en las normas de bioseguridad aplicadas, al introducir materiales y equipos sin desinfectar tales como jaulas, despicadoras y palas entre otros, así como equipo de transporte, personal de la granja que

ingresa sin hacer cambio de ropa y calzado y por un déficit en la desinfección de instalaciones en general e incrementado la probabilidad de enfermedades en granjas a donde el reusó de la cama es una práctica común para disminuir los costos de producción . (Quintana, 1998; Lovanh *et al.*, 2007; Volkova *et al.*,2009)

### **Desinfección de instalaciones avícolas**

La desinfección es un proceso que consiste en eliminar microorganismos infecciosos mediante el uso de agentes químicos (antimicrobianos o biocidas), medios físicos (lavado) o la combinación de ambos. Los agentes químicos que se usan en sanidad animal no siempre son efectivos y generalmente tóxicos. Los desinfectantes modernos se componen de formulaciones complejas que comprenden sustancias químicas, jabones (solidos), detergentes (polvos) y compuestos que favorecen la penetración de las sustancias activas, coadyuvando también para limitar la transmisión de enfermedades entre animales, en tanto que los medios físicos como el lavado, logran una desinfección por arrastre del microorganismo (Kahrs, 1995; Block, 2001).

En las condiciones de traspatio, sólo se puede tener una idea aproximada del riesgo de transmisión de enfermedades por el contacto con superficies contaminadas. El grado de este riesgo depende de la concentración de los microorganismos contaminantes, y de las condiciones específicas del medio (tipo de instalaciones, material de construcción, orientación respecto al norte) que pueden influir sobre la multiplicación o la mortalidad natural de estos organismos.

Las bacterias y los hongos pueden sobrevivir y multiplicarse en las superficies húmedas, sobre todo cuando hay rastros de materia orgánica (Kamada *et al.*, 1984; Chopra, 1990; Jefferey, 1995)

### **Tipos de desinfectantes usados en instalaciones avícolas**

Los desinfectantes naturales o sintéticos utilizados son muy variados, tales como el agua caliente, los surfactantes ácidos aniónicos (sustancias que mejoran la penetración reduciendo la tensión superficial del agua), los surfactantes anfotéricos, los bromuros, los cloruros, la clorhexidina, los yoduros, los compuestos fenólicos, el alcohol y el amonio cuaternarios entre otros. Su mecanismo de acción depende del sitio blanco donde actúan en los microorganismos (Arreguin y Macias, 2012; Cabrera *et al.*, 2007) con la desventaja de ser tóxicos para el hombre y contaminantes al medio ambiente (Kahrs, 1995; Block, 2001), es por ello que se han explorado alternativas tales como el empleo del oxígeno ionizado (Higgins, 2005) y el dicloroisocianurato de sodio (Ferreira, 2010) así como la búsqueda de nuevas estrategias empleando fitoquímicos presentes en las plantas nativas de cada región.

Tabla 1. Ingredientes activos de diferentes agentes biocidas y mecanismo de acción de acuerdo a los sitios blanco de acción en los microorganismos

<b>Ingrediente Activo</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Sitio de acción</b>
Glutaraldehído, EDTA	Unión cruzada a proteínas	Envoltura celular
Clorhexidina	Afecta la integridad de las membranas, a altas concentraciones causa congelamiento del citoplasma	
Diaminas	Induce a la pérdida de aminoácidos	
Fenoles*	Pérdida o desacople en los sitios activos	
Derivados del amonio cuaternario	Inactivación de proteínas y ruptura de la membrana, comprometen los fosfolípidos de las membranas citoplasmáticas	Citoplasma
Alcohol	Desnaturaliza las proteínas y en concentraciones mayores al 80% causa pérdida importante de líquido intracelular	
Formaldehído y Glutaraldehído	Unión cruzada de proteínas, ARN y ADN	Macro moléculas
Halógenos, peróxidos de hidrogeno e iones de plata	Inhiben la síntesis de ADN o causan ruptura de la hebra de ADN	Núcleo

\*Uno de los principales fitoquímicos presentes en las hojas de *Larrea Tridentata*. (Adaptado de Cabrera *et al.*, 2007; Arreguin y Macías, 2012)

## MATERIALES Y MÉTODOS:

### Ubicación de la granja y manejo sanitario:

El trabajo se realizó en una granja del municipio de Rio Verde, San Luis Potosí, adecuándose a las políticas internas de la misma. Al término del ciclo de engorda y salida de los pollos, se cerró la nave durante 24 horas (vacío sanitario), posteriormente se abrió y con pala mecánica se sacó la pollinaza (heces de los pollos). Una vez limpia la nave, se dividió en tres partes (figura 1) para hacer el proceso de desinfección y toma de muestras en piso, pared, techo y cortina.

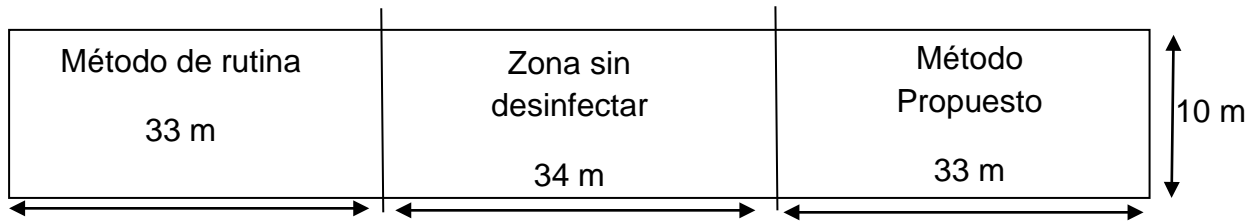


Figura 1. División de la nave para el proceso de desinfección

### Desinfección

Método de rutina: El Lavado del techo y pared se realizó empleando detergente en polvo, enjuagando conforme se iba aplicando, se dejó secar durante 24 horas. Al término de este tiempo, el piso, la pared, el techo y la costina se lavarón con Biosolve® (Bayer de México, S.A. de C.V.) 150 mL en 15 L de agua, se enjuagaron y se dejaron secar 24 horas más. Al término, de este tiempo se roció con cloro y una vez seco, se desinfectó con Farm Fluid ® (ácidos orgánicos, biocidas orgánicos, inorgánicos y surfactantes, BAYER DE MEXICO, S.A. de C.V.)

empleando una dilución 1: 200, posteriormente, se aplicó SPF 11-15® (NUTEK, S.A. de C.V, México) en una dilución de 1: 1000 utilizando una termonebulizadora

Método propuesto: Se preparó un extracto acuoso de hojas de *Larrea tridentata* con una concentración de 0.4 g mL<sup>-1</sup> de agua, se roció con atomizador con un flujo de 3 mL por disparo cubriendo un área de 100 cm<sup>2</sup> por disparo (10 x 10 cm), y se dejó secar durante 24 horas.

### **Toma de muestras y conteo bacteriano**

En las zonas desinfectadas y la zona sin desinfectar, se marcaron al azar 5 cuadros de 25 cm<sup>2</sup>, (5 x 5 cm) cada uno, distribuidos aleatoriamente en el piso, la pared, el techo y la cortina, dejando un espacio de 3 metros entre los límites de cada zona para evitar el efecto orilla. La toma de las muestras se realizaron siguiendo el protocolo de la granja, para ello se realizó un frote con un hisopo estéril en los cuadros delimitados y se colocaron en tubos de ensayo que contenían 9 mL de solución PBS (solución amortiguadora de fosfato salino). Inmediatamente después se trasladaron al laboratorio de control de calidad de la granja y se incubaron a 37°C por un periodo de 24 hrs. Al término de este tiempo, se realizaron diluciones dobles seriadas de cada muestra de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 y 1:5; de cada una de estas diluciones se tomó por triplicado una alícuota de 20 µL, se sembraron en placa con medio Salmonella Shigella (Becton Dickinson GmbH, Germany) y se incubaron a 37°C durante 24 h, al finalizar se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) identificadas por su color beige con centros

blancos, y se realizaron los cálculos para obtener el número de UFC de acuerdo a cada dilución (NCLS, 2012).

### **Pruebas bioquímicas diferenciales realizadas a las colonias aisladas**

De las UFC, aisladas en las diferentes partes de la nave, se tomó una muestra y se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas diferenciales (Tabla 2) usando un equipo VITEK 2 (BIOMÉRIEUX), siguiendo el proceso recomendado por el fabricante para una correcta lectura de las reacciones, consulta en base de datos e impresión de resultados (CLSI, 2012).

### **Análisis estadístico**

El número de UFC se transformo a logaritmo natural para que cumplieran con homogeneidad de varianza y se analizaron en un diseño completamente al azar, el análisis de la varianza y las pruebas de comparación de medias se efectuaron utilizando el procedimiento para modelos lineales generales (PROC GLM) y la prueba de Tukey del paquete estadístico SAS (1991).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Conteo bacteriano

El número de unidades formadoras de colonia (UFC) fue estadísticamente diferente entre los procesos de desinfección ( $p < 0.01$ ), encontrando la mayor concentración de UFC el área que no se lavó. En el piso, el método de lavado y desinfección de rutina mostró la menor concentración de UFC, en el techo y la cortina, el método propuesto usando *Larrea tridentata* fue similar estadísticamente ( $p > 0.01$ ) al proceso de lavado y desinfección de rutina, en tanto que en la pared, la aplicación del extracto acuoso de *Larrea tridentata* mostro una mejor capacidad desinfectante.

Tabla 2.- Numero de U.F.C\*. aisladas en las diferentes partes de la nave

Área/Método	Sin lavar	De rutina	Extracto	EEM
Piso	9.6 <sup>a</sup>	6.5 <sup>c</sup>	7.6 <sup>b</sup>	0.20
Pared	8.0 <sup>a</sup>	7.5 <sup>b</sup>	7.0 <sup>c</sup>	0.10
Techo	8.4 <sup>a</sup>	7.3 <sup>b</sup>	7.6 <sup>b</sup>	0.87
Cortina	6.9 <sup>a</sup>	5.5 <sup>b</sup>	5.0 <sup>b</sup>	0.10

<sup>a,b,c</sup> Literales diferentes en hilera, indican diferencia estadística significativa ( $p < 0.01$ ). Sin lavar= superficie sin lavar ni desinfectar; De rutina= lavado y desinfectado de acuerdo al protocolo de la empresa; Extracto= Desinfectado usando extracto de *L tridentata*. EEM= Error Estándar de la Media. \*UFC expresadas como Ln

La desinfección por lavado de rutina, requiere del uso de diversos agentes químicos y un gasto excesivo de agua, incluye el uso de detergentes que pueden contaminarse por bacilos gram negativos cuando se encuentran en forma solida, en tanto que los medios químicos, se necesitan que sean combinados debido a que su actividad bactericida es por diferentes mecanismos de acción (Kahrs 1995; Block, 2001) para poder ser eficientes, mas sin embargo generalmente son toxicos y dejan residuos contaminantes . Se puede apreciar el efecto biocida del extracto acuoso de hojas de *Larrea tridentata* aplicándolo sobre las superficies y dejándolo actuar durante 24 horas, sin necesidad de gastar grandes volumenes de agua y tiempo comparado con el procesorutinario, lo que confiere grandes ventajas en zonas donde la escases de agua es un factor limitante..

### **Identificación de microorganismos aislados**

La confirmación realizada por el equipo Vitek 2 con pruebas bioquímicas al microorganismo aislado en la nave, corresponde con un 99% de seguridad a la bacteria *Salmonella* serovariedad *typhimurium*, de acuerdo a los resultados de las reacciones bioquímicas (Tabla 3).



Figura 2. Identificación al microscopio óptico de una colonia aislada de *Salmonella typhimurium* con tinción de gram (10x)

Tabla 3. Resultados de las pruebas bioquímicas empleando un equipo Vitek 2 aplicadas al microorganismo aislado

Prueba Bioquímica							
Ala-Phe-Pro-Arylamidase	-	D Mannose	+	L Proline Arlamidase	+	Beta N Acetyl Galactosaminidase	-
Adonitol	-	Beta Xylosidase	-	Lipase	-	Alpha Galactosidase	+
L-Pyrrolydonyl-Arylamidase	-	Beta Alanine arytamidase pNA	-	Palatinose	+	Phosphatase	+
L-Arabitol	-	L Proline Arlamidase	-	Tyrosine Arylamidase	-	Glycine Arylamidase	-
D-Cellobiose	-	Lipase	-	Urease	+	Ornithine decarboxylase	+
Beta-Galactosidase	-	Palatinose	-	D Sorbitol	+	Lysine Decarboxylase	+
H <sub>2</sub> S Production	+	Tyrosine Arylamidase	+	Saccharose / Slicrose	-	Decarboxylase base	-
Beta-N-Acetyl-Glucosaminidase	-	Urease	-	D Tagatose	-	L Histidine assimilation	-
Gutaryl Arylamidase pNA	-	D Sorbitol	+	D Trehalose	+	Colimarate	+
D Glucose	+	Saccharose / Slicrose	-	Citrate Sodium	+	Beta Glucoronidase	-
Gamma Glutamyl transferase	-	D Tagatose	-	Malonate	-	O 129 Resistance (comp. Vibrio)	+
Fermentation Glucose	+	D Trehalose	+	S Keto D Gluconate	-	Glu Gly Arg Arylamidase	-
Beta Glucosidase	-	Citrate Sodium	+	L Lactate	+	L Malate assimilation	-
D Maltose	+	Malonate	-	alkalinisation	+	Ellman	-
D Mannitol	+	Beta Alanine arytamidase pNA	-	Alpha Glucosidase	-	L Lactate assimilation	-
				Sliccinate	-		
				alkalinisation	-		

Interpretación: Organismo identificado= *Salmonella typhimurium*, 99% de probabilidad; Guía de interpretación de acuerdo

a las reacciones bioquímicas diferenciales= Global CLSI based natural resistance (2012)

## CONCLUSIÓN

Se concluye que el extracto acuoso de hojas de *Larrea Tridentata* puede tener un uso potencial como agente biocida, en especial en instalaciones avícolas en granjas a nivel comercial altamente tecnificadas por las características antes descritas. Así mismo, se podría utilizar en el traspatio de zonas rurales donde la carencia de agua, instalaciones rusticas, y el alto costo de biocidas comerciales entre otros, son factores limitantes para llevara a cabo procesos de desinfección, siendo el extracto acuoso de las hojas de *Larrea tridentata* una alternativa natural, eficaz, de fácil aplicación y segura para los animales y el hombre.

## LITERATURA CITADA

- Arreguín V. y Juan H. Macías. 2012. Asepsia, uno de los grandes logros del pensamiento. *Revista Digital Universitaria*. (13) 1:11
- Camacho-Escobar M.A, Pérez-Lara E. García-López J. C., Arroyo-Ledezma J., Sánchez-Bernal E. I. Biocidas convencionales para uso en explotaciones de guajolotes de traspatio. En: XXXV Convención Anual ANECA 2010
- Chopra I. 1990. Bacterial resistance to disinfectants, antiseptics, and toxic metal ions. In *Mechanisms of action of chemical biocides, their study and exploitation* (S. Denyer & W.B. Hugo, edit.). Society for Applied Bacteriology, Technical Series No. 27. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 45-64.
- Ferreira A. J. P., Astolfi-Ferreira C. S., Chacón J. L., Revollo L., Gross R. and E. Cotrim E. 2010. In vitro virucidal and bactericidal activities of Aviclor (a formulation of sodium dichloroisocyanurate) against pathogens of poultry origin. *J. Appl. Poult. Res.* 19 :93–100
- Gutiérrez-Cogco L, Montiel-Vázquez E, Aguilera-Pérez P, González-Andrade M. C. 2000. Serotipos de Salmonella identificados en los servicios de salud de México. *Salud Pública Méx* (42):490-495.
- Higgins S. E., Wolfenden A. D., Bielke L. R., Pixley C. M., Torres-Rodriguez A., Vicente J. L., Bosseau D. Neighbor N., Hargis B. M. and Tellez G. 2005.

Application of ionized reactive oxygen species for disinfection of carcasses, table eggs, and fertile eggs. *J. Appl. Poult. Res.* 14:716–720

Islas AP, Valenzuela BJ, Jerardino SM y Mayer SH. 1987. Intoxicación aguda por fenoles. *Rev. Chil. Pediatr.* 58(5):402-404.

Kamada M., Wada R., Fukunaga Y. & Kumanomido T. 1984. Effects of disinfectants against *Klebsiella pneumoniae* capsule type 1 isolated from horses with metritis. *Bull. equine Res. Inst. Jpn. Raceway Assoc.*, 21,28-38.

Lovanh N, Cook KL, Rothrock MJ, Miles DM, Sistani K. 2007. Spatial shifts in microbial population structure within poultry litter associated with physicochemical properties. *Poult Sci*; 86:1840-1849.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. NCCLS. 2012. Wayne, Pennsylvania.

Terzolo H. R. 2012. Estudio bacteriológico de las salmonelosis de las aves (*S.pullurum*, *S. gallinarum*, *S. Enteritidis* y *S.Typhimurium*) en América Latina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Área de Producción Animal.

Vignoli, R. 2006. Esterilización, desinfección y antisepsia. In: Temas de bacteriología y virología médica. Universidad de la República – Facultad de Medicina. Montevideo, Uruguay. Pp. 609-629

Volkova VV, Bailey RH, Wills RW. 2009. Salmonella in broiler litter and properties of soil at farm location. PLoS One 4:6403.

Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI Publishes 2012 Antimicrobial Susceptibility Testing Standards. Wayne, Pennsylvania.

Quintana, L.JA.1988. La bioseguridad en la prevención y control de la enfermedad de Newcastle. Departamento de Producción Animal: Aves.F.M.V.Z.,UNAM. D.F. México. 84 p.

Kahrs R. F. 1995. Principios generales de la desinfección. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1995,14 (1), 143-163

Jeffrey D.J. 1995. Chemicals used as disinfectants: active ingredients and enhancing additives. In Desinfectantes: acciones y aplicaciones (H.A. McDaniel, edit.). Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 14 (1), 57-74.

McDonnell G and Russell A. D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clinical Microbiology Reviews 12(1):147-179.

Block, S. S. 2001. Disinfection, Sterilization, and Preservation. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia,PA.

Cabrera C. E., Gómez R. F., Zuñiga A. E. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Médica. (38): 149-158

SAS Institute. 1991. SAS User's Guide. SAS 9.1. SAS Inst. Inc., Cary, NC.



## CONCLUSIONES GENERALES

De acuerdo a los resultados del presente trabajo, el proceso de extracción de metabolitos de *Larrea tridentata*, fue más eficiente a los 40 minutos de extracción usando agua por proceso de decocción. De la prueba de toxicidad con ratas, se puede observar que el extracto a las dosis aplicadas no es toxico. Finalmente, este extracto mostró resultados favorables cuando se aplicó en una granja avícola como desinfectante, comparado con el proceso normal de desinfección, que utiliza jabones y productos químicos. Por lo tanto, el extracto acuoso de *Larrea tridentata* puede ser una alternativa natural, segura, no toxica y eficiente para desinfectar instalaciones avícolas.