

## Antioxidant and antimicrobial activity of Barchata (*Zizhipus Obtusifolia*)

## Actividad antioxidante y antimicrobiana de Barchata (*Zizhipus Obtusifolia*)

Silva-Beltrán N.P.<sup>1</sup>, Balderrama- Carmona A.P.<sup>2</sup>, López-Cuevas O.<sup>3</sup>, Portela-Márquez M. A.<sup>1</sup>,  
Umsza Guez M.A.<sup>4</sup>, López-Mata M.A.<sup>1</sup>

Universidad de Sonora <sup>1</sup>Campus Cajeme. Departamento de Ciencias de la Salud, Ejido Providencia, C.P. 85010, Cajeme, Sonora, México. <sup>2</sup>Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Unidad Regional Sur. Blvd. Lázaro Cárdenas 100, Colonia Francisco Villa C.P. 85880, Navojoa, Sonora, México.

<sup>3</sup>Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Coordinación Culiacán, C.P. 80110, Culiacán, Sinaloa, México.

<sup>4</sup>Universidad Federal Bahía, Departamento de Biointeracción do Instituto de Ciências da Saúde. Avenida Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, CEP 40-110-100, Salvador, Bahia. Brasil.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Silva-Beltrán N.P., Balderrama- Carmona A.P., López-Cuevas O., Portela-Márquez M. A., Umsza Guez M.A. and López-Mata M.A. (2019). Antioxidant and antimicrobial activity of Barchata (*Zizhipus Obtusifolia*). *Revista Bio Ciencias* 6, e523. doi: <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.06.01.06>



### ABSTRACT

The barchata (*Ziziphus obtusifolia* [Hook, ex Torr. & A. Gray]) is a common shrub in northwestern Mexico. This plant is traditionally used to combat gastrointestinal and degenerative diseases. In the present work the antioxidant and antimicrobial capacity of extracts obtained from barchata branches was evaluated. Extracts were obtained with different solvents: acidified ethanol (EtOH-ac) and water (Ac). Each one was evaluated for its antioxidant capacity measured by the inhibition of the ABTS radical, DPPH, and the hemolysis test. The antimicrobial activity was carried out in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and in parallel the antiviral effect was evaluated, using the Av08 bacteriophage as an enteroviral model. Ac and EtOH-ac extracts inhibited ABTS and DPPH radicals, showing values from  $17.41 \pm 0.02$  to  $25.03 \pm 3.73$  mmol/ETge, respectively. In the hemolysis test, higher

### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: November 15<sup>th</sup> 2017.

Accepted/Aceptado: April 18<sup>th</sup> 2018.

Available on line/Publicado: March 21<sup>st</sup> 2019.

### RESUMEN

La barchata (*Ziziphus obtusifolia* [Hook. ex Torr. & A. Gray]) es un arbusto común en el noroeste de México. Esta planta se utiliza tradicionalmente para combatir padecimientos gastrointestinales y degenerativos. En el presente trabajo se evaluó la capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos obtenidos de ramas de barchata. Se obtuvieron extractos con diferentes solventes: etanol acidificado (EtOH-ac) y agua (Ac). A cada uno se le evaluó su capacidad antioxidante medida por la inhibición del radical ABTS, DPPH, y la prueba de hemólisis. La actividad antimicrobiana se realizó en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* y en paralelo se evaluó el efecto antiviral, utilizando al bacteriófago Av08 como modelo enteroviral. Los extractos Ac y EtOH-ac, inhibieron los radicales ABTS y DPPH mostrando valores desde  $17.41 \pm 0.02$  a  $25.03 \pm 3.73$  mmol/ETge, respectivamente. En la prueba de hemólisis se encontraron porcentajes de inhibición más elevados en el extracto Ac con 46.3 %, mientras que en el etanólico fue de 36.8 %. En la

### \*Corresponding Author:

Silva-Beltrán N.P. Universidad de Sonora. Campus Cajeme. Departamento de Ciencias de la Salud, Ejido Providencia, C.P. 85010, Cajeme, Sonora, México. Phone: +52(644)4105239. E-mail: [norma.silva@cajeme.uson.mx](mailto:norma.silva@cajeme.uson.mx)

percentages of inhibition were found in the Ac extract with 46.3%, while in the ethanol one it was 36.8 %. In the inhibitory capacity on *E. coli* and *S. aureus*, inhibition haloes of 8.00 to 12.90 mm in diameter were obtained for both extracts against both bacteria. In the antiviral assay it was observed that the Ac extract at the concentration of 10 mg/mL and time of 60 minutes showed a reduction of up to 7.40 log<sub>10</sub> PFU/mL of the Av08 bacteriophage. These results suggest the presence of several bioactive compounds with antioxidant and antimicrobial potential on bacteria and viruses of interest; as well as a protective effect of the aqueous extracts on human erythrocytes.

---

### KEY WORDS

---

Antioxidant, antimicrobial, Barchata

---

### Introduction

*Ziziphus obtusifolia* (Hook. ex Torr. & A. Gray) is a plant that grows in a bush-like form, belonging to the *Rhamnaceae* family and it is commonly known as barchata. Research studies about this particular species are scarce.

Sharma *et al.* (2014), performed a review of the therapeutic properties of different species of the genera *Ziziphus* and found that their leaves, fruits, seeds, barks, and roots have the potential for the development of medications. In addition, it has been observed that there is an increasing demand for species of the genera *Ziziphus*, due to their potential application on human health.

On the other hand, it has been documented that some species of *Ziziphus* contain numerous therapeutic capacities like antibacterial agents with antioxidant and anti-cancer properties (Sharma *et al.*, 2014). Moreover, for their high protein content, Bowers *et al.* (1993) and Ramirez *et al.* (2001) have proposed barchata (*Ziziphus obtusifolia*) as forage for ruminants.

Barchata is commonly found in northwestern Mexico, and Sonora is one of the endemic regions of this species, being an autochthonous plant; because of its accessibility, the ethnic population uses it as an aqueous infusion in alternative remedies for fighting cancer. Previous studies have proven that *Ziziphus obtusifolia* have antiproliferative and apoptotic activities (Ramirez *et al.*, 2001; Molina *et al.*, 2018). However, there are not enough studies that confirm the benefits and properties of this species on human health.

capacidad inhibitoria sobre *E. coli* y *S. aureus* se obtuvieron halos de inhibición que variaron de 8.00 a 12.90 mm de diámetro para ambos extractos contra ambas bacterias. En el ensayo antiviral se pudo observar que el extracto Ac en la concentración 10 mg/mL y tiempo de 60 minutos presentó una reducción de hasta 7.40 log<sub>10</sub> PFU/mL del bacteriófago Av08. Estos resultados sugieren la presencia de varios compuestos bioactivos con potencial antioxidante y antimicrobiano sobre bacterias y virus de interés; así como, efecto protector de los extractos acuosos sobre eritrocitos humanos.

---

### PALABRAS CLAVE

---

Antioxidantes, antimicrobianos, barchata

---

### Introducción

*Ziziphus obtusifolia* (Hook. ex Torr. & A. Gray) es una planta que crece en forma arbustiva, perteneciente a la familia *Rhamnaceae* y se le conoce comúnmente como barchata. Los estudios de esta especie en particular son escasos.

Sharma *et al.* (2014), realizaron una revisión de las propiedades terapéuticas de distintas especies del género *Ziziphus* y encontraron que sus hojas, frutos, semillas, cortezas y raíces tienen potencial para el desarrollo de fármacos. Adicionalmente se ha observado que existe una creciente demanda para especies del género *Ziziphus* debido a su potencial aplicación en la salud humana.

Por otro lado, se ha documentado que algunas especies de *Ziziphus* contienen numerosas capacidades terapéuticas como agentes antibacterianos con propiedades antioxidantes y anticancerígenas (Sharma *et al.*, 2014). Además por su alto contenido proteico. Bowers *et al.* (1993), y Ramirez *et al.* (2001), han propuesto a la barchata (*Ziziphus obtusifolia*) como forraje en alimentos para rumiantes.

La barchata se encuentra de manera común en el noroeste de México, y Sonora es una de las regiones endémicas de esta especie, siendo una planta autóctona, por lo que es de fácil acceso, la población étnica la utiliza como infusión acuosa en remedios alternativos para combatir el cáncer. Estudios previos han mostrado que *Ziziphus obtusifolia* tiene actividades antiproliferativas y apoptóticas (Molina *et al.*, 2018; Ramirez *et al.*, 2001). Sin embargo, no existen suficientes estudios que confirmen el beneficio y las propiedades de esta especie hacia la salud humana.

Therefore, the objective of this research work was to evaluate the antioxidant, antibacterial and antiviral capacity of the extracts of barchata branches.

## Materials and methods

### Reagents

AAPH (2,2'-azobis(2-methylpropionamide dihydrochloride), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) and DMSO (Dimethyl sulfoxide), were obtained from Sigma Aldrich, Co. (St. Louis Missouri, USA). The Mueller-Hinton agar, and the rest of the reagents and solvents not specified were bought in J.T. Baker (Baker-Mallinckrod, Mexico).

### Preparation of the extracts

Branches of barchata (*Ziziphus obtusifolia*) were obtained from southern Sonora, Mexico, during the period of May-December, 2016, and were identified by the herbarium of Universidad de Sonora (Specimen No. 20395).

For the preparation of the EtOH-ac extract, the method described by Sultana *et al.* (2009) was used. Branches of barchata (*Ziziphus obtusifolia*) were dried in the sun and ground with an industrial grinder. Ten grams of barchata powder were added to a 150-milliliter extractor solution (EtOH-ac) that consisted of a mixture of ethanol and acetic acid (95:5 % v/v) and was maintained in darkness for 48 h in maceration with intermittent shaking. After 12 h, the solution was filtered through a Whatman No. 1 filter paper and the extract was concentrated in a rotary evaporator (Yamato RE301-Japan) and was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 5 % for easier handling.

In order to produce aqueous infusions (Ac), 1 g of powder from the branches of barchata was placed in 100 mL of water and boiled for 3 minutes. The EtOH-ac extract was filtered and concentrated in the rotary evaporator; it was dissolved in water for its evaluation.

## Antioxidant capacity

### Inhibition of DPPH radical (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

The antioxidant capacity of the extracts was measured by means of the inhibition of the DPPH radical, according to Moein *et al.* (2010) with some adjustments.

Por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar su capacidad antioxidante, antibacteriana y antiviral de los extractos de ramas de barchata.

## Materiales y métodos

### Reactivos

AAPH (2,2'-Azobis (2-methylpropionamide dihydrochloride), DPPH (2,2-diphenil-1-picryl hidrazilo), ABTS (2,2'- azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico) y DMSO (Dimetil sulfóxido), fueron obtenidos de Sigma Aldrich, Co. (St. Louis Missouri, USA). El agar Mueller-Hinton, y todos los demás reactivos y solventes no especificados fueron comprados en J.T Baker (Baker-Mallinckrod, México).

### Preparación de los extractos

Las ramas de barchata (*Ziziphus obtusifolia*) fueron obtenidas del sur de Sonora, México, durante el periodo Mayo-Diciembre 2016, y se identificaron por el herbario de la Universidad de Sonora (Especimen No.20395).

Para la preparación del extracto EtOH-ac se utilizó el método descrito por Silva *et al.*, 2014. Las ramas de barchata (*Ziziphus obtusifolia*) se secaron al sol y pulverizaron con un molino industrial. Se tomaron 10 g del polvo de barchata y fueron añadidos a 150 mL de una solución extractora (EtOH-Ac) que consistía en la mezcla de etanol y ácido acético (95:5 % v/v), y se mantuvo en la oscuridad durante 48 horas en maceración con agitación intermitente. Después de 12 h, la solución se filtró a través de papel filtro Whatman No. 1 y el extracto se concentró en rotavapor (Yamato RE301-Japón) y se disolvió en sulfóxido (DMSO) al 5 % para su fácil manejo.

Para producir las infusiones acuosas (Ac), se colocó 1 g del polvo de ramas de barchata en 100 mL de agua y se hirvió por 3 minutos. El extracto EtOH-Ac se filtró y concentró en rotovapor, para su evaluación se disolvió en agua.

## Capacidad antioxidante

### Inhibición del radical DPPH (2,2-diphenil-1-picryl hidrazilo)

Se midió la capacidad antioxidante de los extractos mediante la inhibición del radical DPPH según Moein & Moein (2010) con algunas modificaciones. Una alícuota de

A 280  $\mu\text{L}$  aliquot of the solution of the DPPH radical (0.025 mg/mL in methanol) was mixed with 20  $\mu\text{L}$  of the extract, the reaction was kept for 30 min in complete darkness and the absorbance was read to a wavelength of 490 nm in a spectrophotometer Fluostar Omega (BMG Labtech, Chicago, IL, USA). Antioxidant activity was calculated using a calibration curve of trolox and results were expressed in mmol equivalent trolox/g of extract (mmol ET/ge).

#### **Inhibition of ABTS radical (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)**

It was determined according to the technic described by Re *et al.* (1999). ABTS radical was prepared by dilution (19 mg/5 mL of distilled water) and a potassium persulfate solution (37.8 mg/mL of distilled water). Eighty-eight  $\mu\text{L}$  of prepared ABTS radical were added to the solution of potassium persulfate. The mixture was let to rest for 12-16 h at room temperature. From this solution, 500  $\mu\text{L}$  were diluted in 30 mL of ethanol for adjusting absorbance at  $0.7 \pm 0.02$  units in a microplate reader at a wavelength of 750 nm. Finally, 295  $\mu\text{L}$  of the radical and 5  $\mu\text{L}$  of the extract were placed in the microplate, and initial measurements (Absi) and after 7 min (Absf) were performed. The antioxidant activity was calculated using a calibration curve of trolox and the results were expressed as mmol equivalent trolox/g of extract (mmol ET/ge).

#### **Protective effect on human red blood cells**

Hemolysis was induced by AAPH (2-2'-Azobis (2-methylpropionamide dihydrochloride) radical according to methodology of Luy *et al.* (2010). Human red blood cells were washed 3 times with PBS (phosphate-buffered saline) (37mM of NaCl, 2,7 mM of KCl, 8 mM of  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 2 mM of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  P/V) at pH 7.4. Once washed, a suspension of red blood cells at 5% in PBS was prepared. For the test, 50  $\mu\text{L}$  of the suspension of red blood cells, 50  $\mu\text{L}$  of the extract, and 200  $\mu\text{L}$  of AAPH radical were mixed, and the mixture was incubated at 37 °C in bain-marie with shaking (30 rpm) for 3h. A similar reaction mix was prepared without extract as a control (complete hemolysis). Once incubation finished, 1 mL of PBS was added, it was centrifuged at 3500 rpm for 10 min and the absorbance of the supernatant was measured in a microplate reader at 540 nm. The result was expressed in percentage of inhibition, which was calculated using the following formula:  $(\text{Abs. Control} - \text{Abs. Final}) / (\text{Abs. Control} * 100)$ .

280  $\mu\text{L}$  de la solución del radical DPPH (0.025 mg/mL en metanol) se mezcló con 20  $\mu\text{L}$  del extracto, la reacción se dejó reposar por 30 min en completa oscuridad y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm en un espectrofotómetro Fluostar Omega spectrophotometer (BMG Labtech, Chicago, IL, USA). La actividad antioxidante se calculó usando una curva de calibración de trolox y los resultados se expresaron como mmol equivalente trolox/g de extracto (mmol ET/ge).

#### **Inhibición del radical ABTS (2,2'- azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico)**

Se determinó de acuerdo a la técnica descrita por Re *et al.* (1999). El radical ABTS se preparó por dilución (19 mg/5 mL de agua destilada) y una solución de persulfato de potasio (37.8 mg/mL de agua destilada). Se tomaron 88  $\mu\text{L}$  del radical ABTS preparado y fueron añadidos a la solución de persulfato de potasio. Dicha mezcla se dejó reposar por 12-16 h a temperatura ambiente. De esta solución se tomaron 500  $\mu\text{L}$  y se diluyeron en 30 mL de etanol para ajustar la absorbancia a  $0.7 \pm 0.02$  unidades en un lector de microplacas a una longitud de onda de 750 nm. Finalmente, se colocaron 295  $\mu\text{L}$  del radical y 5  $\mu\text{L}$  del extracto y se realizaron las medición inicial (Absi) y después de 7 min (Absf). La actividad antioxidante se calculó usando una curva de calibración de trolox y los resultados se expresaron como mmol equivalente trolox/g de extracto (mmol ET/ge).

#### **Efecto protector sobre eritrocitos humanos**

La hemólisis fue inducida por el radical AAPH (2-2'-Azobis (2-methylpropionamide dihydrochloride) de acuerdo a la metodología de Luy *et al.* (2010). Los eritrocitos humanos fueron lavados en 3 tiempos con buffer salino PBS (37mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 2 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  P/V) a pH de 7.4. Una vez lavados, se preparó una suspensión de eritrocitos al 5% en PBS. Para el ensayo, se mezclaron 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de eritrocitos, 50  $\mu\text{L}$  del extracto y 200  $\mu\text{L}$  del radical AAPH, y la mezcla se incubó a 37 °C en baño maría con agitación (30 rpm) durante 3 h. Una mezcla de reacción similar se preparó sin extracto como control (hemólisis completa). Terminada la incubación, se agregó 1 mL de PBS y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min y se midió la absorbancia del sobrenadante en un lector de microplacas a 540 nm. El resultado se expresó en porcentaje de inhibición, la cual se calculó mediante la siguiente fórmula:  $(\text{Abs. Control} - \text{Abs. Final}) / (\text{Abs. Control} * 100)$ .

## Antiviral capacity

### Bacteriophage propagation

Av08 bacteriophage was obtained from the 'Laboratorio Nacional de Investigación en Seguridad Alimentaria of the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD)' in Culiacan, Sinaloa, Mexico. For the propagation of Av08 bacteriophage, the double-layer agar method described by Jamalludeen *et al.* (2009). Briefly, 100  $\mu$ L of the bacteriophage were mixed with 1 mL of the bacterial host (*E. coli* O157) in a tube containing 3 mL of tryptic soy broth (TSB) with 0.4 % agarose at 45-48 °C. The mixture was gently shaken and poured over Petri dishes with trypticase soy agar (TSA) medium; once the soft layer solidified, dishes were incubated for 18-24 hours at 37° C.

After incubation, 6 mL of SM buffer ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  8 mM, NaCl 100mM, pork gelatin type A at 0.002 % P/V) were added to each dish and were shaken by oscillation for 3 hours. Buffer and soft layer were recovered by removal with a bacterial inoculation loop and were emptied in a 50 mL tube, then it was centrifuged at 10,000 x g for 15 minutes at 4° C in order to eliminate bacterial detritus and TSB-agarose solid phase.

Supernatant was recovered and filtered through a nitrocellulose membrane (Whatman, USA) with pore size of 0.45  $\mu$ m for its subsequent quantification and use.

### Bacteriophage quantification

Decimal dilutions of the Av08 bacteriophage were prepared in SM buffer. Fifty  $\mu$ L from each dilution of the phage and 500  $\mu$ L of the bacteria *E. coli* O157 were placed in tubes containing 1.5 mL of TSB-agarose 0.4 %. The mixture was poured into Petri dishes with TSA corresponding to each dilution, and were left to solidify. Dishes were incubated at 37 °C for 24 hours and after this time, plates were read, counting the Plaque-Forming Units (PFU/mL) of each dish and bacteriophage concentration was calculated with the following formula: PFU/mL = Number of plates [PFU]/(Dilution factor) (inoculated volume [mL]).

### Antiviral test

The antiviral effect of EtOH-ac and Ac extracts was measured against Av08 bacteriophage whose genetic material is dsDNA. Extracts were dissolved in 5 % of DMSO

## Capacidad Antiviral

### Propagación del bacteriófago

El bacteriófago Av08 se obtuvo del Laboratorio Nacional de Investigación en Seguridad Alimentaria del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Culiacán, Sinaloa, México. Para la propagación del bacteriófago Av08, se utilizó el método de la doble capa de agar, descrito por Jamalludeen *et al.* (2009). Brevemente, se mezclaron 100  $\mu$ L del bacteriófago con 1 mL de la bacteria hospedera (*E. coli* O157) en un tubo que contenía 3 mL de TSB por sus siglas en inglés (Caldo de Soya Tripticaseína) con agarosa 0.4 % a 45-48°C. La mezcla se agitó suavemente y se vertió sobre cajas Petri con medio TSA (Agar de Soya Tripticaseína); una vez solidificada la capa suave, las cajas se incubaron durante 18-24 horas a 37°C.

Después de la incubación, a cada caja se le añadieron 6 mL de buffer SM ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  8 mM, NaCl 100mM, gelatina de piel de porcino tipo A al 0.002 % P/V) y se agitó por oscilación durante 3 horas. El buffer y la capa suave se recuperaron por remoción con un asa bacteriológica y se vació en un tubo de 50 mL, enseguida se centrifugó a 10,000 x g durante 15 minutos a 4°C para eliminar los detritus de la bacteria y la fase sólida del TSB-agarosa.

El sobrenadante se recuperó y se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa (Whatman, USA) con tamaño de poro 0.45  $\mu$ m para su cuantificación y posterior uso.

### Cuantificación del bacteriófago

Se prepararon diluciones decimales del bacteriófago Av08 en buffer SM. Se tomaron 50  $\mu$ L de cada una de las diluciones del fago, 500  $\mu$ L de la bacteria *E. coli* O157 y se colocaron en tubos que contenían 1.5 mL de TSB-agarosa 0.4 %. La mezcla se vertió en cajas Petri con TSA correspondientes a cada dilución y se dejaron solidificar. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas y transcurrido el tiempo se procedió a leer las placas, contando las Unidades Formadoras de Placa (PFU/mL) de cada caja y la concentración del bacteriófago se calculó con la siguiente fórmula: PFU/mL = No. de placas [PFU]/(Factor de dilución)(volumen inoculado [mL]).

### Ensayo antiviral

Se midió el efecto antiviral de los extractos EtOH-ac y Ac contra el bacteriófago Av08 cuyo material genético es dsDNA. Los extractos se disolvieron en 5 % de DMSO y se

and were sterilized through a membrane filter with a pore size of 0.45  $\mu\text{m}$ . Tested concentrations were 5 and 10 mg/mL. An aliquot of 100  $\mu\text{L}$  of the phage ( $1 \times 10^9$  PFU/mL) was confronted with 3 mL of the extract. Three contact times were evaluated: 0, 30 and 60 min. At the end of each time, the reaction was stopped by adding a neutralizing solution of soy phosphatidylcholine, according to SCFI (1999). Next, decimal dilutions were prepared in SM buffer ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-12}$ ) and the phage was quantified employing the double-layer agar technique. Viral reduction was expressed as  $\text{Log}_{10}$  PFU/mL.

### Antibacterial capacity

#### Bacterial strains and growth conditions

Microorganisms were obtained from the laboratory of Inocuidad Alimentaria del Centro de Investigacion e Innovacion en Biotecnologia, Agropecuaria y Ambiental (CIIBA) of the Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). *Staphylococcus aureus* (ATCC 65384) and *Escherichia coli* 0157 (ATCC 43890) bacteria were maintained in TSB with glycerol (20 %) at  $-40^\circ\text{C}$  until test. With an inoculation loop, an aliquot of each bacteria was transferred into tubes containing 10mL of TSB and was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 hours for its use in inhibition tests.

#### Antimicrobial susceptibility test

Antimicrobial activity was evaluated by means of the disk diffusion test, applying the technique described by Andrews (2001). Petri dishes with Mueller Hinton agar were inoculated with 100  $\mu\text{L}$  of the bacterial suspension ( $1 \times 10^8$  UFC/mL), which was homogeneously distributed with sterile glass perlites. Separately, 40  $\mu\text{L}$  of the corresponding extract (EtOH and Ac) were placed in sterile disks of paper filter (5mm in diameter, Whatman N° 1) which were placed on inoculated Petri dishes with each bacteria. Petri dishes were incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 24 hours for further measurement of inhibition halos. Negative controls were included, which consisted of DMSO coated disks (5 %).

#### Statistical analysis

The evaluation of antioxidant activity measured by inhibition of radicals (DPPH, ABTS and AAPH), in addition to the antimicrobial one was realized by means of a one-way variance analysis (ANOVA) with independent assays and totally randomized with three repetitions, considering the "extract" factor with two levels (EtOH-ac and Ac).

esterilizaron a través de un filtro de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ . Las concentraciones ensayadas fueron 5 y 10 mg/mL. Una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  del fago ( $1 \times 10^9$  PFU/mL) se confrontó con 3 mL del extracto. Se evaluaron 3 tiempos de contacto: 0, 30 y 60 min. Al finalizar cada tiempo, la reacción se detuvo añadiendo una solución neutralizante de lecitina de soya, de acuerdo con la SCFI (1999). A continuación, se prepararon diluciones decimales en buffer SM ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-10}$  y  $10^{-12}$ ) y empleando la técnica de la doble capa de agar se cuantificó al fago. La reducción viral se expresó como  $\text{Log}_{10}$  PFU/mL.

### Capacidad Antibacteriana

#### Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Los microorganismos se obtuvieron del laboratorio de Inocuidad Alimentaria del Centro de Investigación e Innovación en Biotecnología, Agropecuaria y Ambiental (CIIBA) del Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). Las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 65384) y *Escherichia coli* O157 (ATCC 43890) se mantuvieron en caldo de soya y tripticaseína (TSB) con glicerol (20 %) a  $-40^\circ\text{C}$  hasta su uso. Con un asa bacteriológica se transfirió una alícuota de cada bacteria a tubos conteniendo 10 mL de TSB y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h para su uso en los ensayos de inhibición.

#### Prueba de susceptibilidad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en disco, empleando la técnica descrita por Andrews (2001). Placas Petri con agar Müller Hinton se inocularon con 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión bacteriana ( $1 \times 10^8$  PFU/mL), la cual se distribuyó de manera homogénea con perlas de vidrio estériles. Por separado, se colocaron 40  $\mu\text{L}$  del extracto correspondiente (EtOH y Ac) en discos estériles de papel filtro (5 mm de diámetro, Whatman N° 1) y éstos fueron colocados sobre las placas inoculadas con cada bacteria. Las placas fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas para su posterior medición de los halos de inhibición. Se incluyeron tratamientos de testigos negativos, que consistieron en discos impregnados con DMSO (5 %).

#### Análisis Estadístico

La evaluación de la actividad antioxidante medida por la inhibición de los radicales (DPPH, ABTS y AAPH), además de la antimicrobiana se realizó a través de un análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía con experimentos independientes y totalmente al azar con tres repeticiones, considerando el factor "extracto" con dos niveles (EtOH-ac y Ac).



In the statistical analysis of antiviral activity against Av08 phage data, a totally randomized three-factors design was used. The factors were “extract” with two levels (EtOH-ac and Ac); “concentration” with two levels (5 and 10 mg/mL), and “contact time” with three levels (0, 30, and 60 min). All the experiments were performed in duplicates with two repetitions each. All data were analyzed using Statgraphics version 15 statistical software through ANOVA and  $\alpha=0.05$ .

En el análisis estadístico de los datos de actividad antiviral contra el fago Av08, se utilizó un diseño de tres factores totalmente al azar. Los factores fueron “extracto” con dos niveles (EtOH-ac y Ac); “concentración” con dos niveles (5 y 10 mg/mL), y “tiempo de contacto” con tres niveles (0, 30 y 60 min). Todos los experimentos se realizaron por duplicado con dos repeticiones cada uno. Todos los datos fueron analizados con el paquete estadístico Statgraphics versión 15 mediante ANOVA y  $\alpha=0.05$ .

## Results and discussion

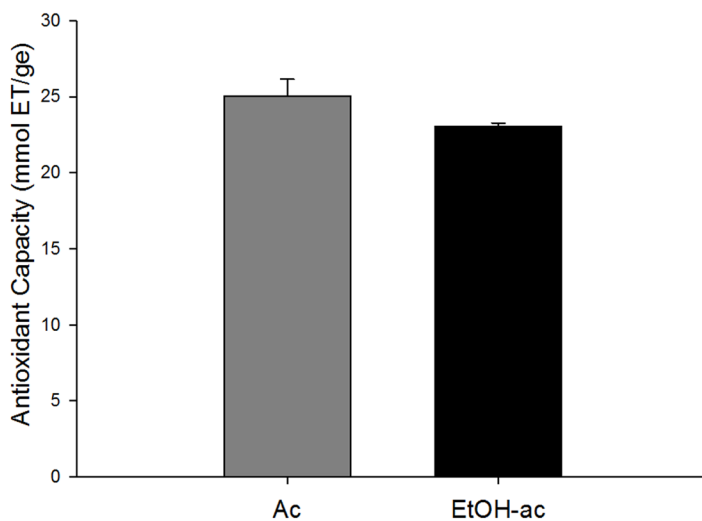
### Antioxidant capacity of the extracts by means of DPPH radical

In this research study, the capacity of EtOH-ac and Ac extracts of barchata to inhibit DPPH radical was evaluated. Radical inhibition was shown in Figure 1. Inhibition values of  $25.03 \pm 3.73$  mmol ET/ge y  $23.06 \pm 0.24$  mmol ET/ge can be observed for Ac and EtOH-ac extracts, respectively. Results showed that the antioxidant capacity of the extracts vary according to their chemical nature and to the solvents used in the extraction of substances with biological activity.

## Resultados y Discusión

### Capacidad antioxidante de los extractos mediante el radical DPPH

En este estudio se evaluó la capacidad de los extractos EtOH-ac y Ac de barchata para inhibir el radical DPPH. En la Figura 1 se muestra la inhibición del radical. Se pueden observar valores de inhibición de  $25.03 \pm 3.73$  mmol ET/ge y  $23.06 \pm 0.24$  mmol ET/ge para los extractos Ac y EtOH-ac, respectivamente. Los resultados muestran que la capacidad antioxidante de los extractos varía de acuerdo a la naturaleza química de los mismos y a los solventes empleados en la extracción de sustancias con actividad biológica.



**Figure 1. Antioxidant capacity by DPPH assay of Ac and EtOH-ac extracts from barchata (*Zizhupus obtusifolia*). The values are the mean  $\pm$  standard deviation ( $n=3$ ). ET, Equivalent Trolox (homolog of vitamin C) ge, gram of extract.**

**Figura 1. Capacidad antioxidante por medio del ensayo DPPH de extractos Ac y EtOH-ac de barchata (*Ziziphus obtusifolia*). Los valores son la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). ET, Equivalente Trolox (homólogo de la vitamina C) ge, gramo de extracto.**

The results obtained in this research study were in agreement with those described by Kang *et al.* (2003), where they performed assays on antioxidant capacity of natural extracts with different solvents, not only polar but also non-polar, and concluded that the antioxidant capacity was affected by the solvent used.

During the present work, research studies that documented the antioxidant features of *Ziziphus obtusifolia*, measured by inhibition of synthetic radicals like DPPH, were not found. However, Dias *et al.* (2013), observed that ethanol extracts of species of *Ziziphus* have aglycones that present capacities of free radical reduction up to 25 %, and reported that the extracts presenting a high concentration of glycosylated saponins reduced their antioxidant activity. Similarly, Navas & Carrasquero (2012) studied the antioxidant activity provided by ether extracts of *Ziziphus mauritiana* in refined soybean oil at high temperatures, observing a high protection from oil by this extract, and they attributed the activity to the presence of bisphenols, flavonoids, and tannins.

#### Antioxidant capacity of the extracts by means of radical ABTS

In this work, the capacity of the extracts to inhibit the ABTS cationic radical (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Figure 2 shows

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con lo descrito por Kang *et al.* (2003), quienes realizaron ensayos de capacidad antioxidante de extractos naturales con diferentes solventes tanto polares como no polares, y concluyeron que la capacidad antioxidante se ve influenciada por la polaridad del solvente utilizado.

Durante el presente estudio, no se encontraron investigaciones que documenten las propiedades antioxidantes de *Ziziphus obtusifolia* medidas por inhibición de radicales sintéticos como DPPH. Sin embargo, Dias *et al.* (2013), observaron que extractos etanólicos de especies de *Ziziphus* poseen agliconas que presentan capacidades de reducción de radicales libres hasta en un 25 %, y reportaron que los extractos que presentan alta concentración de saponinas glucosiladas reducen su actividad antioxidante. Así mismo, Navas & Carrasquero (2012), estudiaron la actividad antioxidante que proporcionaban los extractos etéreos de *Ziziphus mauritiana* en el aceite refinado de soya a altas temperaturas, observando una alta protección al aceite por dicho extracto, y atribuyeron la actividad a la presencia de biofenoles, flavonoides y taninos.

#### Capacidad antioxidante de los extractos mediante el radical ABTS

En este estudio también se midió la capacidad de los extractos para inhibir el radical catiónico ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio]). La Figura 2

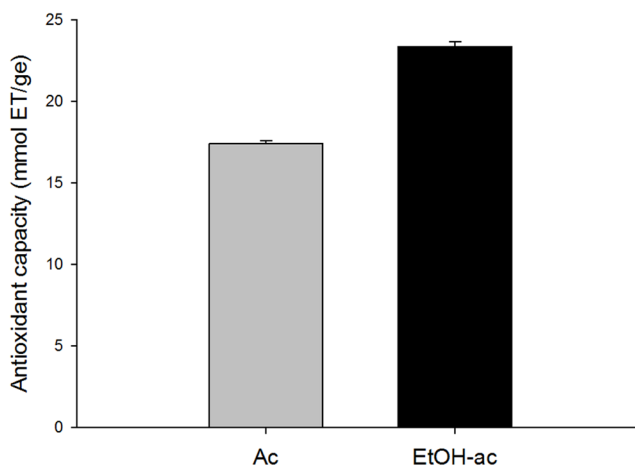


Figure 2. Antioxidant capacity by ABTS assay of Ac and EtOH-ac extracts from barchata (*Ziziphus obtusifolia*). The values are the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). ET in Equivalent Trolox (homolog of vitamin C) ge, gram extract

Figura 2. Capacidad antioxidante por medio del ensayo ABTS de extractos Ac y EtOH-ac de barchata (*Ziziphus obtusifolia*). Los valores son la media  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ). ET en Equivalente Trolox (homólogo de la vitamina C) ge, gramo de extracto.



the antioxidant capacity for the extracts by means of reduction of this radical, where the values  $17.41 \pm 0.01$  mmol ET/ge and  $23.35 \pm 0.02$  mmol ET/ge for the extracts Ac and EtOH-ac were obtained; respectively. As well, it was observed that the acidified ethanol extracts showed higher capacity to inhibit this radical. Dorta *et al.* (2013) observed that the acid systems were more effective at recovering bioactive compounds, and that they possibly could favor bioavailability and hydrolysis of N-glycosylated compounds. Barchata contains nitrogenous compounds such as glutamic acid and aspartic acid (Moran *et al.*, 2014), and according to Wu (2009) these active substances present antioxidant activity.

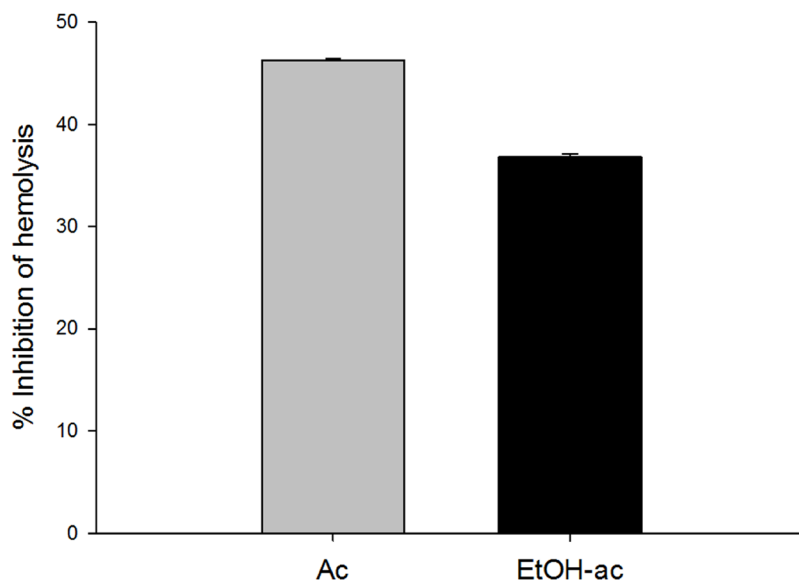
#### Antioxidant capacity by means of hemolysis with AAPH radical

Figure 3 shows the protective capacity of Ac and EtOH-ac extracts on human red blood cells, using AAPH radical. The graph indicates that the values for the percentage of inhibition of hemolysis were 46.3 % and 36.8 % for Ac and EtOH-ac extracts, respectively.

muestra la capacidad antioxidante para los extractos mediante la reducción de este radical, donde se obtuvieron valores de  $17.41 \pm 0.01$  mmol ET/ge y  $23.35 \pm 0.02$  mmol ET/ge para los extractos Ac y EtOH-ac, respectivamente. Asimismo, se observa que los extractos etanólicos acidificados mostraron mayor capacidad para inhibir este radical. Dorta *et al.* (2013) han observado que los sistemas ácidos son más efectivos en la recuperación de compuestos bioactivos, y que posiblemente podrían favorecer la biodisponibilidad e hidrólisis de compuestos N-glucosilados. La barchata contiene compuestos nitrogenados tales como el ácido glutámico y ácido aspártico (Moran *et al.*, 2014), y de acuerdo con Wu (2009) estas sustancias activas presentan actividad antioxidante.

#### Capacidad antioxidante mediante la prueba de hemólisis con el radical AAPH

La Figura 3 muestra la capacidad protectora de los extractos Ac y EtOH-ac sobre eritrocitos humanos, utilizando al radical AAPH. La gráfica indica los porcentajes de inhibición de hemólisis, los cuales fueron de 46.3 % y 36.8 % para los extractos Ac y EtOH-ac, respectivamente.



**Figure 3. Antioxidant capacity by the assay of % inhibition of hemolysis induced by AAPH of acidified aqueous and ethanol extracts of barchata (*Ziziphus obtusifolia*).**

**Figura 3. Capacidad antioxidante por medio del ensayo de % de inhibición de hemólisis inducida mediante AAPH de extractos acuosos y etanólicos acidificados de barchata (*Ziziphus obtusifolia*).**

Recently, biological models like human red blood cells have been used, with the purpose of determining the antioxidant capacity of diverse bioactive substances on cell lipid peroxidation (Quihui *et al.*, 2017). This method is based on the induction of hemolysis generated by AAPH radical (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride). This radical causes the release of iron from the hemoglobin, acting as a pro-oxidant. The release of iron from red blood cells may increase the pro-oxidant effect of hydroperoxides coming from the reaction of oxygen and AAPH (Velioglu *et al.*, 1998).

No research works evaluating the capacity of barchata extracts to protect human red blood cells using AAPH radical were found. Similarly, no antecedents on *Ziziphus* genus, assessing this property were found. For the purposes of this research, results were compared with similar studies.

Magalhaes *et al.* (2009) analyzed the percentage of inhibition of hemolysis of methanol extracts from the peel and pulp of quince and reported values of 70 and 75 %, respectively. On the other hand, it was demonstrated that compounds like gallic acid, ellagic acid, chlorogenic acid, quercetin, catechin, rutin, carotenoids, among others, have a protective effect against the hemolysis induced on human red blood cells up to 99 % (Chirinos *et al.*, 2008; Hapner *et al.*, 2010). It has been reported that the extracts of leaves of the *Toona Sinensis* plant present inhibition values from 75 to 85 % (Hseu *et al.*, 2008).

In general, it was observed that diverse reports show values of the order of 30 % to 40% superior to those found in our research. This divergence could be explained based on the diversity of techniques used to obtain the extracts, or, to their composition. Previous reports show that species of *Ziziphus* contain saponins (Ribeiro *et al.*, 2013), which can cause hemolysis in red blood cells (Martinez, 2001), suggesting a certain cytotoxicity.

Studies realized by Molina-Romo *et al.* (2018) argued that *Ziziphus obtusifolia* has an antiproliferative effect, therefore its potentialities against tumor and cancer cells cannot be completely discarded.

#### **Antibacterial capacity**

Antibacterial activity in EtOH-ac and Ac extracts is presented in table 1, measured by inhibition halos.

Recientemente se han estado utilizando medios biológicos como eritrocitos humanos, con la finalidad de determinar la capacidad antioxidante de diversas sustancias bioactivas sobre la peroxidación lipídica de las células (Quihui *et al.*, 2017). Este método está basado en la inducción de hemólisis generada por el radical AAPH (2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride). Este radical provoca la liberación del hierro desde la hemoglobina, actuando como pro-oxidante. La liberación del hierro desde los hematíes puede aumentar el efecto pro-oxidante de hidroperóxidos provenientes de la reacción del oxígeno y el AAPH (Veiga *et al.*, 1997).

No se encontraron estudios donde se haya evaluado la capacidad de los extractos de barchata para proteger a los eritrocitos humanos utilizando el radical AAPH. Asimismo, no se encontraron antecedentes del género *Ziziphus* donde se haya evaluado esta misma propiedad. Para fines de esta investigación se compararon los resultados con trabajos semejantes.

Magalhães *et al.* (2009), analizaron el porcentaje de inhibición de hemólisis de extractos metanólicos de la cáscara y pulpa de membrillo y reportaron valores de 70 y 75 %, respectivamente. Por otro lado, se ha demostrado que compuestos como el ácido gálico, elálgico, clorogénico, quercetina, catequina, rutina, carotenoides, entre algunos otros, poseen un efecto protector contra la hemólisis inducida en eritrocitos humanos de hasta el 99 % (Chirinos *et al.*, 2008; Hapner *et al.*, 2010). Se ha reportado que extractos de hojas de la planta *Toona Sinensis* presentan valores de inhibición del 75 al 85 % (Hseu *et al.*, 2008).

En general, se observa que los diversos reportes muestran valores en el orden del 30 % al 40 % superior a los encontrados en nuestro estudio. Esta divergencia se puede explicar en base de la diversidad de técnicas utilizadas para obtener los extractos, o bien, a la composición de los mismos. Previos reportes muestran que especies de *Ziziphus* contienen saponinas (Ribeiro *et al.*, 2013), la cuales son capaces de causar hemólisis en los eritrocitos (Martínez, 1995). Por lo que se podría suponer cierta citotoxicidad.

Estudios realizados por Molina-Romo *et al.* (2018) argumentaron que *Ziziphus obtusifolia* tiene efecto antiproliferativo, por lo que no se pueden descartar completamente sus potencialidades contra células tumorales o cancerígenas.

#### **Capacidad antibacteriana**

En la tabla 1 se muestra la actividad antibacteriana presente en los extractos EtOH-ac y Ac, medida por halos de

Values for concentrations of 5 and 10 mg/mL, respectively, were the following: *E. coli* O157 bacteria, showed values from 7.83 to 10.16 mm in diameter in EtOH-ac extract, while in Ac extract, inhibition values ranged from 7.83 to 8.00 mm. For *Staphylococcus aureus* bacteria, EtOH-ac extract showed results from 8.00 to 9.00 mm in diameter and from 8.00 to 9.06 mm in Ac extract.

inhibición. Los valores que arrojaron para las concentraciones 5 y 10 mg/mL respectivamente fueron los siguientes. Para la bacteria *E. coli* O157 en el extracto EtOH-ac mostró valores de 7.83 a 10.16 mm de diámetro, mientras que en el extracto Ac los valores de inhibición fueron de 7.83 a 8.00 mm. Para la bacteria *Staphylococcus aureus* el extracto EtOH-ac mostró resultados de 8.00 a 9.00 mm de diámetro y en el extracto Ac se obtuvo una inhibición de 8.00 a 9.06 mm.

**Table I.**

**Antibacterial capacity of *Ziziphus obtusifolia* extracts. Each value represents the mean of three data.**

**Tabla I.**

**Capacidad antibacteriana de los extractos de *Ziziphus obtusifolia*. Cada valor representa la media de tres datos.**

Extraction	Concentration mg/mL	Bacterial inhibition	
		<i>E. coli</i> O157 mm	<i>S. aureus</i> mm
EtOH-ac	5	7.83±0.1	8.00±0.2
	10	10.16±0.5	9.00±0.5
Ac	5	7.83±0.8	8.00±0.5
	10	8.00±0.0	9.06±0.9
Control: DMSO 5 %	5	SA	SA
	10	SA	SA

NA: No activity  
SA- Sin actividad

A similar study on *Zanthoxylum* extracts mentions inhibition halos obtained from some antibiotics like tetracycline with 9.00 mm for *S. aureus* and 10.00 mm for *E. coli*; anthracycline with 12.00 mm for *S. aureus* and 10.00 mm for *E. coli*; and kanamycin with 9.00 mm for *S. aureus* and *E. coli* (Patiño et al., 2011). Generally, the results obtained from the two types of extracts were very similar to the antibiotics; therefore they could be considered as good antibacterial agents against the studied bacteria, in addition, these results were promising for continuing with more specific antimicrobial studies.

On the other hand, it was also observed that at increasing extract concentration, the inhibitory activity against the assessed strains increased as well, indicating that the antibacterial activity of the extracts depends on the concentration.

En un estudio similar de extractos de *Zanthoxylum* se mencionan los halos de inhibición obtenidos de algunos antibióticos como tetraciclina con 9.00 mm para *S. aureus* y 10.00 mm para *E. coli*; antraciclina con 12.00 mm para *S. aureus* y 10.00 mm para *E. coli*; y kanamicina con 9.00 mm para *S. aureus* y *E. coli* (Patiño et al., 2011). En general los resultados obtenidos de los dos tipos de extractos fueron muy similares a los antibióticos por lo que podrían ser considerados como buenos agentes antibacterianos contra las bacterias estudiadas, además estos resultados son promisorios para continuar con estudios antimicrobianos más específicos.

Por otro lado, también se observa que al aumentar la concentración del extracto, la actividad inhibitoria contra las cepas evaluadas también incrementó. Lo cual nos indica que la actividad antibacteriana de los extractos es dependiente de la concentración.

Barchata contains bioactive substances such as valine or leucine amino acids (Moran *et al.*, 2014). These compounds are classified as bacteriocins, which are effective against important pathogenic microorganisms like *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella spp.* (Beristain *et al.*, 2012); therefore these substances might contribute to the inhibition of the pathogenic bacteria used in this study.

On the other hand, in one of the studies realized on species of which this plant belongs, certain substances like tannins, saponins, resins, polyphenols, and cardiac glycoside were detected (Abalaka, 2010). As well, it has been reported that these compounds have antimicrobial activity (Moran *et al.*, 2014), allowing, as well, to suggest that these substances contribute to the inhibition of the microorganisms used in this study, which are pathogenic organisms of interest in public health. Moreover, it is known that in developing countries where medicine has a high economic value, research on antibacterial activities of ethnomedicinal plants keeps being a necessity to fight against pathogenic microorganisms, which represents an opportunity area to treat diseases originated by these organisms.

#### Antiviral capacity

Ac and EtOH-ac extracts were applied to Av08 bacteriophage in order to determine viral survival rate and the effective dose at the required time, thus observing the reduction of the virus, caused by the effect of the extract.

Logarithmic reductions can be observed in Figure 4 for EtOH-ac extracts and in Figure 5 for Ac extracts, which show the reductions of the virus expressed in  $\text{Log}_{10}$  PFU/mL for three contact times: 0, 30 and 60 minutes, using the two concentrations of 5 and 10 mg/mL. Similarly, it can be observed that in both extracts at time 0 minutes, there was no significant reduction in comparison to the control value ( $P < 0,05$ ), nevertheless, at 30 minutes of contact time, a significant reduction was observed.

On the other hand, in EtOH-ac extract in the first 30 minutes of contact with Av08 phage, the concentration of virus showed reductions of 1.5-1.8  $\text{Log}_{10}$  PFU/mL for concentrations of 5 and 10 mg/mL, respectively. At maximum contact times of the extract with the phage, a reduction of 4.30  $\text{Log}_{10}$  PFU/mL was observed at a contact time of 60 minutes for the concentration of 5 mg/mL, and at the concentration of 10

La barchata contiene sustancias bioactivas tales como los aminoacidos valina o leucina (Moran *et al.*, 2014). A estos compuestos se les clasifica como bacteriocinas, los cuales son efectivos contra microorganismos patógenos importantes como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* (Beristain *et al.*, 2012), por lo que es posible que estas sustancias pudieran estar contribuyendo en la inhibición de las bacterias patógenas que se utilizaron en este estudio.

Por otro lado, en uno de los estudios realizados sobre especies a la que pertenece esta planta, se detectaron ciertas sustancias como taninos, saponinas, resinas, polifenoles y glucósidos cardíacos (Abalaka, 2010). Así mismo, se ha informado que estos compuestos tienen actividad antimicrobiana (Moran *et al.*, 2014), lo que nos permite suponer también que estas sustancias contribuyen en la inhibición de los microorganismos utilizados en este estudio, los cuales son organismos patógenos de interés en la salud pública. Además, es conocido que en los países en desarrollo, donde la medicina tiene alto valor en la economía, la investigación de las actividades antibacterianas de plantas etnomedicinales siguen siendo una necesidad para atacar microorganismos patógenos, lo cual representa un área de oportunidad para tratar padecimientos originados por estos organismos.

#### Capacidad antiviral

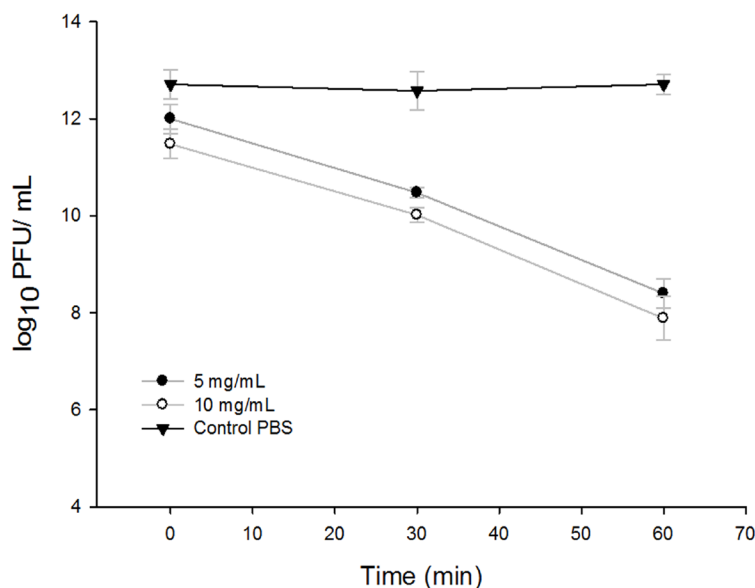
Los extractos Ac y EtOH-ac fueron aplicados al bacteriófago Av08 para determinar la tasa de supervivencia del virus y la dosis efectiva en el tiempo requerido y así observar la reducción del virus causado por el efecto de los extractos.

Las reducciones logarítmicas se pueden observar en la Figura 4 para los extractos EtOH-ac y Figura 5 para los extractos Ac, los cuales muestran la reducciones del virus expresadas en  $\text{Log}_{10}$  PFU/mL para tres tiempos de contacto: 0, 30 y 60 minutos, utilizando dos concentraciones de 5 y 10 mg/mL. Así mismo, se puede observar que en ambos extractos en el tiempo 0 minutos, no hubo una reducción significativa en comparación con el valor del control ( $p < 0,05$ ), sin embargo, a los 30 minutos de tiempo de contacto se observa una reducción significativa.

Por otro lado, en el extracto EtOH-ac en los primeros 30 minutos de contacto del fago Av08, mostró reducciones de 1.5- 1.8  $\text{Log}_{10}$  PFU/mL, para las concentraciones 5 y 10 mg/mL respectivamente. En los tiempos máximos de contacto del extracto con el fago, se observó una reducción de 4.30  $\text{Log}_{10}$  PFU/mL al tiempo de contacto de 60 minutos para la concentración de 5 mg/mL, y en la concentración 10 mg/

mg/mL at the same time, the concentration of virus showed a reduction of 4.82 Log<sub>10</sub> PFU/mL (Figure 4).

mL al mismo tiempo mostró una reducción de 4.82 Log<sub>10</sub> PFU/mL (Figura 4).



**Figure 4. Antiviral activity of the EtOH-ac extracts of *Ziziphus obtusifolia* measured by the reduction in Log<sub>10</sub> PFU / mL for the contact times 0, 30 and 60 minutes at two concentrations 5 mg /mL and 10 mg/mL.**

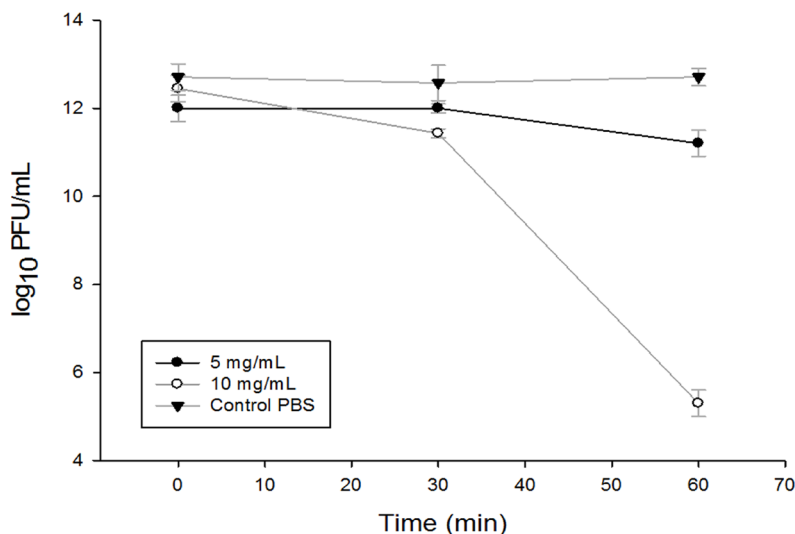
**Figura 4. Actividad antiviral de los extractos EtOH-ac de *Ziziphus obtusifolia* medida por la reducción en Log<sub>10</sub> UFP/mL para los tiempos de contacto 0, 30 y 60 minutos a dos concentraciones 5 mg/mL y 10 mg/mL.**

For Ac extract in both concentrations of 5 and 10 mg/mL, during the first 30 minutes, no significant reductions were observed, achieving values of reduction of the order of 0.70 Log<sub>10</sub> PFU/mL, and it was only until 60 minutes of contact that the concentration of virus decreased 1.50 logarithms at the concentration of 5 mg/mL. Nonetheless, the highest shown reduction was at the concentration of 10 mg/mL, decreasing up to 2 logarithms, possibly due to the depletion and reduction of the bioavailability of the active metabolites or compounds after 30 min of contact time with the extracts.

DNA Av08 bacteriophage used in this study was previously isolated from poultry feces. Some studies demonstrated that bacteriophages isolated from poultry are part of the environmental microbiota, which demonstrates the natural occurrence of phages in the intestinal tract. Similarly, with the afore-mentioned, its use as enteroviral model is justified (Lopez et al., 2012).

Para el extracto Ac en ambas concentraciones 5 y 10 mg/mL durante los primeros 30 minutos no mostraron reducciones significativas, arrojando valores de reducción por el orden de 0.70 Log<sub>10</sub> PFU/mL, y fue hasta los 60 minutos que disminuyó 1.50 logaritmos en 5 mg/mL. Sin embargo, la reducción más alta mostrada fue a los 10 mg/mL, disminuyendo hasta 2 logaritmos, posiblemente se debió al agotamiento y reducción de la biodisponibilidad de los metabolitos activos o compuestos después de 30 min del tiempo de contacto con los extractos.

El bacteriófago ADN Av08, utilizado en este estudio fue previamente aislado de las heces de aves de corral. Algunos estudios han demostrado que los bacteriófagos aislados de aves de corral son parte de la microbiota del medio ambiente, lo que demuestra la ocurrencia natural de fagos en el tracto intestinal. Así mismo, con ello se justifica su uso como modelo enteroviral (López et al., 2012).



**Figure 5. Antiviral activity of the aqueous extracts of *Ziziphus obtusifolia* measured by the reduction in Log<sub>10</sub> PFU / mL for contact times 0, 30 and 60 minutes at two concentrations 5 mg / mL and 10 mg / mL.**

**Figura 5. Actividad antiviral de los extractos acuosos de *Ziziphus obtusifolia* medida por la reducción en Log<sub>10</sub> UFP/mL para los tiempos de contacto 0, 30 y 60 minutos a dos concentraciones 5 mg/mL y 10 mg/mL.**

There are no specific studies in *Ziziphus obtusifolia* that demonstrate that the compounds are responsible for the biological activities in enterovirus; However, in a study of amino acids determination, it was found that barchata contains alanine, valine, and leucine (Moran *et al.*, 2014), which are substances to which antimicrobial capacities pertaining to some plants are attributed (Beristain *et al.*, 2012). Another study realized by Eun-Hye *et al.* in 2015, found that the betulinic acids derived from *Ziziphus jujuba* showed antiviral activity against A/PR/8 influenza virus induced in rats. Moreover, a study where the antiviral activity of medicinal plants was assessed against Hepatitis B virus (VHB) in cellular lines found that *Eucalyptus spp.* extracts showed the highest antiviral activity in the studied plants, where phenolic compounds were observed to be responsible for this inhibitory activity and, in *Ziziphus*, the presence of phenolic substances has already been documented (Gonzalez *et al.*, 2006). That is why the antiviral activity of these compounds is not discarded.

## Conclusions

EtOH-ac and Ac extracts of *Ziziphus obtusifolia* showed antioxidant and anti-hemolytic capacity against the

No existen estudios específicos en *Ziziphus obtusifolia* que demuestren que componentes son responsables de las actividades biológicas en enterovirus; Sin embargo, en un estudio de determinación de aminoácidos, se encontró que barchata contiene alanina, valina y leucina (Moran *et al.*, 2014) los cuáles son sustancias que se le atribuye capacidad antimicrobiana propias de algunas plantas (Beristain *et al.*, 2012). Otro estudio realizado por, Eun-Hye *et al.*, en el 2015, encontraron que los ácidos betulínicos derivados de *Ziziphus jujuba* mostraron actividad antiviral contra el virus de la influenza A/PR/8 inducido en ratones. Además, en un estudio donde se evaluó la actividad antiviral de plantas medicinales frente al virus del Hepatitis B (VHB) en líneas celulares se encontró que extractos de *Eucalyptus spp.* mostraron la mayor actividad antiviral de las plantas estudiadas, donde se observó que los compuestos fenólicos son los responsable de dicha actividad inhibitoria y en *Ziziphus* ya se ha documentado la presencia de sustancias fenólicas (Gonzalez *et al.*, 2006). Por lo que no se descarta la actividad de estos compuestos como antiviral.

## Conclusiones

Los extractos de EtOH-ac y Ac de *Ziziphus obtusifolia* mostraron capacidad antioxidante, y anti hemolítica,



hemolysis induced by AAPH radical; in addition to present effectivity in reducing the Av08 enteroviral model and pathogenic bacteria like *E. coli* and *S. aureus*.

contra la hemólisis inducida por el radical AAPH; además de presentar efectividad en la reducción del modelo enteroviral Av08 y bacterias patógenas como *E. coli* y *S. aureus*.

### Acknowledgements

To Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Programa de Fondos mixtos-2016-2017.

### Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Programa de Fondos mixtos-2016-2017.

### References

- Abalaka, M. E., Daniyan, S. Y. and Mann, A. (2010). Evaluation of the antimicrobial activities of two *Ziziphus* species (*Ziziphus mauritiana* L. and *Ziziphus spinachristi* L.) on some microbial pathogens. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4: 135-139. <https://academicjournals.org/journal/AJPP/article-abstract/E82D45830602>
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48(1): 5-16. [https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl\\_1.5](https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5)
- Beristain, S. C., Palou, E., and López, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 6(2): 67-78. <http://web.udlap.mx/tsia/files/2013/12/TSIA-62Beristain-Bauza-et-al-2012.pdf>
- Bowers, J.E., & Wignall, B. (1993). *Shrubs and Trees of the Southwest Deserts*. Southwest Parks and Monuments Association Tucson Arizona. 140.
- Bruneton, J. (2001). Saponósidos. In *Farmacognosia, Fotoquímica, Plantas Medicinales*. 2nd. Zaragoza, España. Acribia. 664-709 p. [https://tejadarossi.files.wordpress.com/2017/01/farmacognosia\\_bruneton.pdf](https://tejadarossi.files.wordpress.com/2017/01/farmacognosia_bruneton.pdf)
- Chirinos, R., Campos, D., Wamier, M., Pedreschi, R., Rees, J., and Larondelle, Y. (2008). Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological *in vitro* assays. *Food Chemistry*, 111(1): 98-105. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.03.038>
- Dias Ribeiro, B., Sales Alviano, D., Weingart Barreto, D., and Zarur Coelho, M. (2013). Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 436: 736-743. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.08.007>
- Dorta, E., Lobo, M. G., and González, M. (2013). Optimization of factors affecting extraction of antioxidants from Mango seed. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4): 1067-1081. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0750-0>
- Eun-Hye, H., Jae, H., Kyo, B., Sang, H., Hyun-Jeong, K., and Heejung, Y. (2015). Anti-Influenza Activity of Betulinic Acid from *Zizyphus jujube* on Influenza A/PR/8 Virus. *Biomolecules and Therapeutic*, 23(4): 345-349. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.019>
- González RL, Roque A, Morier R Rodríguez L. 2006. Evaluación de la actividad antiviral de plantas medicinales frente al virus de la hepatitis B (VHB) en las células PLC/PRF/5. *Revista Cubana Medicina*. 58 (2):103-108
- Hapner, C., Deuster, P., and Chen, Y. (2010). Inhibition of oxidative hemolysis by quercetin, but not other antioxidants. *Chemico-Biological Interactions*, 186(3): 275-279. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.05.010>
- Hseu, Y., Chang, W., Chen, C., Liao, J., Huang, C., Lu, F., Chia, Y., Hsu, H., Wu, J., and Yang, H. (2008). Antioxidant activities of *Toona Sinensis* leave extract using different antioxidant models. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.07.003>
- Jiménez, M., Navas, J., and Jimenez, R. (2005). Evolución de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, el agente de la Fusariosis vascular del garbanzo, en razas patogénicas y patotipos. *Vegetales y plagas*. 31: 59-69. <https://www.researchgate.net/publication/28160608>
- Jamalludeen N, She YM, Lingohr E, Griffiths M. 2009. Isolation and characterization of virulent bacteriophages against *Escherichia coli* serogroups 01, 02, and 078. *Poultry Sci*. 88: 1694-1702. <http://doi.org/10.3382/ps.2009-00033>

- Kang, D., Yun, C., and Lee, H. (2003). Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2-3): 231-236. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00142-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00142-9)
- López, O., Castro, N., León, J., Valdez, B. and Chaidez, C. (2012). Evaluation of bacteriophage AV-08 for simultaneous biocontrol of *Salmonella montevideo* and *Escherichia coli* O157:H7 in experimentally contaminated chicken skin. *Journal of Food Safety*, 32(3): 305-310. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2012.00381.x>
- Magalhães, A., Silva, B., Pereira, J., Andrade, P., Valentao, P. and Carvalho, M. (2009). Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6): 1372-1377. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.03.017>
- Martínez M. 1995. Oxygen Free radicals and human diseases. *Biochemical*. 77:147. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)88119-3](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)88119-3)
- Molina-Romo, E., Garibay-Escobar, A., Valenzuela-Antelo, O., Ruíz-Bustos, E., Hernández-Martínez, J., Vélazquez, C., Rascón-Valenzuela, L. and Roblez-Zepeda, R. (2018). Antiproliferative and Apoptotic Activities of the Medicinal Plant *Ziziphus obtusifolia*. *Pharmacognosy Research*, 10(1): 55-59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5855374/>
- Moran-Palacio, E.F., Tortoledo-Ortiz, O., Yañez-Farias, G.A., Zamora-Álvarez, L.A., Stephens-Camacho, N.A., Soñanez-Organis, J.G., Ochoa-López, L.M. and Rosas-Rodríguez, J.A. (2014). Determination of Amino Acids in Medicinal Plants from Southern Sonora, Mexico. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(4): 601-606. <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v13i4.17>
- Moein, S. & Moein, M. R. (2010). Relationship between antioxidant properties and phenolics in Zhumeriamajdae. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(7): 517-521. <https://doi.org/10.5897/JMPR10.292>
- Navas, P. B. & Carrasquero, A. (2012). Estudio cinético y termodinámico de la autooxidación del aceite refinado de soya en presencia de un extracto de ponsigué (*Ziziphus mauritiana*). *Interciencia*, 37(10): 757-761 <https://www.redalyc.org/html/339/33925472004/>
- Patiño L J.O., Prieto Rodríguez, J.A., Lozano Moreno J.M., Lesmes Sarmiento, L. and Cuca Sarmiento, L.E. (2011). Propiedades antibacterianas *in vitro* de metabolitos secundarios aislados de dos especies del género *Zanthoxylum* (Rutaceae). *Revista Cubana de Farmacia*, 5(3):431-438. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152011000300012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152011000300012)
- Quihui-Cota L., Morales-Figueroa, G.G., Valbuena-Gregorio, E., Campos-García, J.C., Silva-Beltrán, N.P. and López-Mata, M.A (2017). Membrana de Quitosano con Aceites Esenciales de Romero y Árbol de Té: Potencial como Biomaterial. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 38(1): 246-251. <https://doi.org/10.17488/RMIB.38.1.20>
- Ramírez, R.G., Haenlein, G. F. W., and Nuñez, M. A. (2001). Seasonal variation of macro and trace mineral contents in 14 browse species that grow in northeastern Mexico. *Small Ruminant Research*, 39(2): 153-159. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(00\)00184-X](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(00)00184-X)
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9): 1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- SCFI (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial). (1999). Métodos Generales de Análisis: Determinación de la Actividad Antimicrobiana en Productos Germicidas. Diario Oficial de la Federación [NMX-BB-040-SCFI-1999].
- Sharma, M., Bhatnagar, S. K., Parmar, K., Gupta, S., and Goyal, P. (2014). *Ziziphus*: A prospective multiapplication fruit tree. *Journal of Plant Rechearch*, 27 (1): 213-229. <https://doi.org/10.5958/j.2229-4473.27.1.033>
- Silva, N. P., Ruíz, S., Chaidez, C., Ornelas, J., López, M. A., Márquez, E., and Estrada, M. I. (2014). Chemical constitution and effect of extracts of tomato plants byproducts on the enteric viral surrogates. *International Journal of Environmental Health Research*, 25(3): 299–311. <https://doi.org/10.1080/09603123.2014.938030>
- Veiga E, Aguilar JA, Clavo B, Llanes L. 1997. Radicales libres, formación y daño celular. El sistema antioxidante como protector frente a los radicales libres. *Análisis Clínicos*, (22): 201-216.
- Wu, G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37: 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>