

Actividad antimicrobiana de extractos de *Ariocarpus fissuratus* y *Flourensia cernua*

Bejarano-Castro M. G.^{aa}, De la Fuente-Salcido N.^a, Linaje Treviño M., Hernández-Terán F.^a Valencia-Castro C. M.^{a*}

a Bioprospección y Bioprecesos, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Coahuila, Campus-Torreón. Blvd. Torreón Matamoros, km 7.5, CP 27104 Torreón, Coahuila, México.

aa Alumna de la Maestría en Ingeniería Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas.

* cmanuel53@yahoo.com.mx

RESUMEN:

Existen plantas que contienen un gran número de metabolitos secundarios, que son compuestos que se generan sobre todo en plantas que viven en condiciones ambientales adversas como lo son las regiones áridas. Estos metabolitos secundarios son generados además como mecanismo de defensa contra insectos y patógenos, por lo cual se les atribuye que son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos, en la actualidad se está dando un enfoque a la búsqueda de nuevos compuestos como alternativas para el control de plagas y enfermedades, y así en un futuro poder producir nuevos medicamentos en base a estos compuestos vegetales. Las especies de *Ariocarpus fissuratus* y *Flourensia cernua* son capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de algunas cepas representativas; los extractos etanólico, metanólico y cloroformo de *Ariocarpus* presentaron mayor inhibición contra las cepas utilizadas, mostrando una MIC de 18 mg/ml, mientras que los extractos cloroformo, etanol y metanol de *F. cernua* fueron capaces de inhibir el crecimiento bacteriano hasta 165 UA, mostrando un perfil fotoquímico alto por presentar la mayoría de los metabolitos..

ABSTRACT:

There are plants that contain a large number of secondary metabolites, which are compounds that generated mainly in plants that live in adverse environmental conditions as they are in arid regions. These secondary metabolites generated as a defense mechanism against insects and pathogens, which is why it's believe that they can inhibit the growth of bacteria and fungi. Currently, an approach is being taken to search for new compounds as alternatives for pest control and diseases, and so in the future, to be able to produce new medicines based on these plant compounds. The species of *Ariocarpus fissuratus* and *Flourensia cernua* are able to inhibit the bacterial growth of some representative strains. The ethanol, methanol and chloroform extracts of *Ariocarpus* showed greater inhibition against the strains, showing a MIC of 18 mg / ml, while the chloroform, ethanol and methanol extracts of *F. cernua* were able to inhibit bacterial growth up to 165 AU, showing a high phytochemical profile for presenting most of the metabolites..

Palabras clave: *Ariocarpus fissuratus*, *Flourensia cernua*, Inhibición, MIC.

Área: Microbiología y biotecnología

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (2017) afirma que el tratamiento para combatir las enfermedades de neumonía, tuberculosis, gonorrea, y salmonelosis se ha vuelto más difícil en los últimos años debido a la pérdida de eficacia de los antibióticos, ya que en los últimos años se han producido una gran cantidad de antibióticos para erradicar a los microorganismos responsables de muchas enfermedades, sin embargo, estos antibióticos produjeron mutaciones en estos microorganismos que los vuelven resistentes a varios medicamentos o antibióticos. Dentro de los métodos para la obtención de nuevos fármacos se encuentra la síntesis química de nuevos compuestos, sin embargo, el uso de compuestos a partir extractos vegetales sigue siendo la principal fuente, por lo cual las investigaciones hoy en día están cambiando su enfoque hacia las plantas medicinales que se conocen como fuente de antimicrobianos y que son usadas para fines medicinales (Camacho 2013, Gupta et al 2016).

En México las zonas áridas y semiáridas cubren el 48.29% de su territorio estas se presentan en el centro y norte de la república, estas zonas cuentan con 6,000 especies de plantas, debido a su hidrología, fisiografía y edafología en estas zonas áridas las plantas han desarrollado adaptaciones para sobrevivir bajo estas condiciones adversas, las cuales les permiten afrontar los largos periodos de sequía, activando también sus defensas para enfrentar estas

adversidades, y produciendo compuestos que son usados por la planta como estrategia de defensa, sintetizando enzimas que degradan la pared celular del microorganismo o que poseen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano. (Granaos et al 1998). Existen algunos estudios sobre diferentes plantas desérticas, como lo son *Ariocarpus fissuratus* y *Flourensia cernua*, que han demostrado tener eficacia en el control de algunos microorganismos patógenos. En un estudio realizado por Gutiérrez et al 2015 se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de *Ariocarpus fissuratus* con diferentes solventes contra bacterias gram positivas y gram negativas; mostrando una importante inhibición con los extractos de metanol y etanol. Por otra parte, Castillo et al 2015 probó la actividad de extractos etanólicos de *Flourensia cernua* contra los hongos *Rhizoctonia solani* encontrando una inhibición micelial casi del 100%; existen diferentes plantas que son usadas por sus propiedades medicinales dentro de las regiones áridas o desértica, sin embargo existe una falta de conocimiento sobre estas plantas y sobre sus compuestos fitoquímicos, por lo cual es necesario una mayor investigación de los componentes de estas plantas así como su probable actividad antimicrobiana como una nueva alternativa que permita tener opciones viables para el control de plagas y enfermedades. Es por esto que el objetivo de este trabajo es determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de extractos de *Ariocarpus fissuratus* con 7 diferentes solventes y evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Flourensia cernua*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Para la recolección de las muestras de *Ariocarpus fissuratus* se obtuvo un permiso de colecta científica de la Dirección General de Vida Silvestre, Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental de la SEMARNAT, según consta en el Oficio Núm. SGPA/DGVS 02824/15, y las de *Flourensia cernua* fueron facilitadas por los técnicos de la Reserva Ecológica Municipal Sierra y Cañón de Jimulco.

Obtención de los extractos

Se pesaron 3 g de muestra vegetal *Ariocarpus fissuratus* y *Flourensia cernua* respectivamente para cada uno de los extractos, estos se llevaron a cabo por extracción en aparato Soxhlet con 100 ml de solvente durante 4 horas; se usaron siete diferentes solventes y las extracciones se llevaron a cabo por orden de polaridad usando hexano, éter, diclorometano, cloroformo, acetona, etanol y metanol. Los extractos obtenidos fueron filtrados en embudo con papel Whatman No.1 y llevados a un horno a 60°C hasta la evaporación del solvente. El concentrado del extracto fue hidratado con 100 ml agua destilada y fueron esterilizados por filtro de membrana de 21µL y refrigerados a 4°C hasta su uso; teniendo una concentración final de 300 mg/ml.

Diluciones de extractos de *Ariocarpus fissuratus*

Se realizaron 4 diluciones a cada uno de los extractos de *Ariocarpus fissuratus*, tomando 1 ml del extracto con la concentración de 300 mg/ml y colocándolo en un tubo con 1 ml de solución salina, se mezcló un poco, se tomó 1 ml pasándolo a un tubo con 1ml de solución salina nuevamente, repitiendo 2 veces más este proceso para obtener así las concentraciones finales de 300 mg/ml, 150 mg/ml, 75 mg/ml, 37.5 mg/ml y 18.75 mg/ml.

Preparación de Sensidiscos

Se realizaron sensidiscos con papel filtro Whatman No.1 y fueron separados y esterilizados en autoclave, posteriormente se impregnaron con 100 µL de los 7 extractos de *Flourensia cernua* y las diferentes concentraciones de los extractos de *Ariocarpus fissuratus*.

Actividad antimicrobiana por difusión en disco

Se inoculo por asada las diferentes cepas utilizadas en tubos con medio de cultivo nutritivo preparado, los tubos se incubaron en termo-shaker a 30°C durante 24 h. después fueron ajustados según la escala de Mc Farland a 1×10^8 UFC en el espectrofotómetro a una absorbancia de 0.8 a 1.0 a 625 nm. Se tomaron 100 µL de cada cepa ajustada y se inocularon en cajas Petri con agar Mueller Hilton con asa Digrafsky y se colocaron los sensidiscos previamente preparados con los extractos de *Flourensia cernua*; las cajas fueron incubadas a 30°C por 24h. La determinación

de la actividad antimicrobiana de cada extracto de *Flourensia cernua* se utilizó la siguiente formula: $A = \pi r^2 = \pi \left(\frac{D}{2}\right)^2 = \pi \frac{D^2}{4}$

De acuerdo al área (A) calculada según el diámetro (D) o radio (r) del halo de inhibición. Los resultados fueron expresados en Unidades Arbitrarias (UA) siendo 1 UA= 1mm² del halo de inhibición del crecimiento de las bacterias.

Determinación de la MIC

Se llevó a cabo el mismo proceso que la actividad antimicrobiana por difusión en disco, tomando los sensidiscos impregnados previamente con las diferentes diluciones de 7 diferentes extractos de *Ariocarpus fissuratus* e incubada a 30°C por 24h.

Análisis fitoquímico de extractos de *Flourensia cernua*

Se llevó a cabo la identificación de grupos funcionales para insaturaciones, grupo carbonilo, oxidrilos fenólicos, carbohidratos, cumarinas, esteroides y terpenos según la metodología descrita por Khan et al 2010 para cada uno de los 7 diferentes extractos de *Flourensia cernua*.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con siete extractos como tratamientos y dos repeticiones por tratamiento. Se llevó a cabo un análisis de varianza para separar el efecto de tratamientos. Cuando se encontró diferencia significativa entre tratamientos se realizó una prueba de comparación múltiple de medias de tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antimicrobiana por difusión en disco

Los extractos de *Flourensia cernua* mostraron actividad inhibitoria contra 16 cepas diferentes, los extractos de cloroformo, acetona, etanol y metanol fueron los que mostraron mayor actividad antimicrobiana (tabla I). Se trata de una información con pocos antecedentes en la literatura científica, ya que los extractos de *Flourensia cernua*, han dado mejores resultados en hongos. En el estudio de Jasso et al (2017) encontró actividad inhibitoria de los extractos etanolicos, en concentraciones de 5000 mg/L, contra *Rhizoctonia solani*, mostrando una inhibición de 92.63%. En el presente estudio, el extracto de éter fue el que menos presentó inhibición y concuerda con su análisis fitoquímico (tabla II) ya que dio negativo en la prueba de los metabolitos secundarios . Los extractos de acetona, etanol y metanol dieron positivo para todos los metabolitos lo cual se podría relacionar con su actividad inhibitoria; el extracto de cloroformo tiene todos lo metabolitos a excepción de cumarinas , pero fue el que presentó inhibición en todas las cepas (tabla I). Se encontró diferencia estadística entre la actividad inhibitoria media de las diferentes cepas con los diferentes extractos ($p < 0.05$).

Tabla I. Inhibición de Extractos de *Flourensia cernua* con solventes de Hex (hexano), Ét (éter), Cl (cloroformo), DC (diclorometano), Ac (acetona), EtOH (etanol), MetOH (metanol) sobre 16 diferentes cepas.

Cepas	Concentracion Minima Inhibitoria mg/ml						
	Hex	Ét	Cl	DC	Ac	EtOH	MetOH
<i>Bacillus cereus</i> 183	88.4 ±34.9	0.00	95.8 ±24.4	75.8 ±52.8	75.8 ±52.8	0.00	72.6 ±31.7
<i>Escherichia coli</i>	0.00	0.00	113.5 ±26.1	0.00	177.5 ±33.3	95.81±24.4 3	0.00
<i>Shigella sonnei</i>	38.48 ±0	0.00	113.8 ±26.6	0.00	113.9 ±26.7	124.5 ±41.7	0.00
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.00	0.00	165.3±16.1	0.00	0.00	44.4 ±8.3	44.4 ±8.3

<i>Pseudomona aureginosa</i>	0.00	0.00	71.07±10.55	44.4±8.3	0.00	0.00	95.8±24.4
<i>Myroides odoratus</i>	38.5±0.00	0.00	86.8 ±11.6	0.00	0.00	81.7± 44.4	38.5±0.0
<i>Streptococcus equi</i>	0.00	0.00	38.5 ± 0.0	0.00	0.00	56.9±9.5	72.6±31.6
<i>Staphylococcus capitis</i>	0.00	0.00	72.64±31.7	0.00	104.06±12.8	44.4±8.3	0.00
<i>Escherichia faecium</i>	50.3±0.00	38.5±0.0	38.5±0.0	38.5±0.0	38.48±0.00	44.4±8.3	44.4±8.3
<i>Salmonella Typhimurium</i>	56.9±9.44	0.00	56.9±9.5	0.00	135.9±57.8	122.9 ±13.9	51.05±17.8
<i>Shigella flexneri</i>	0.00	0.00	144.1 ±45.0	0.00	88.35 ±35.0	124.5±41.7	0.00
<i>Micrococcus luteus</i>	44.8 ±8.33	0.00	98.17±48.9	0.00	19.24±27.2	0.00	51.01±17.8
<i>Micrococcus spp.</i>	58.5±28.32	38.5±0.0	38.5±0.0	51.0±17.8	38.48±0.00	38.5±0.0	38.5±0.0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	72.6±31.65	0.00	122.9±13.9	0.00	86.78±11.7	51.05±17.8	58.5±28.3
<i>Serratia marcescens</i>	0.00	66.8±40.0	79.3±22.2	66.8±39.9	88.35±35.0	88.35±35.0	44.4±8.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	64.4±19.99	44.4±8.3	91.5±58.3	44.4±8.3	56.94±9.5	98.8±48.9	56.94±9.4

Tabla II. Análisis fitoquímico de los extractos de *Flourensia cernua* Hex (hexano), Ét (éter), Cl (cloroformo), DC (diclorometano), Ac (acetona), EtOH (etanol), MetOH (metanol).

Componentes fitoquímicos en extractos de <i>Flourensia cernua</i>							
Ensayo	Extracto						
	Hex	Ét	Cl	DC	Ac	EtOH	MetOH
Insaturaciones	+	-	+	-	+	+	+
Oxidrilos fenólicos	+	-	+	-	+	+	+
Carbohidratos	+	-	+	+	+	+	+
Cumarinas	+	-	+	+	+	+	+
Esteroles y terpenos	+	-	+	+	+	+	+

Tabla III. Concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Ariocarpus fissuratus*.

Cepas	Concentracion Minima Inhibitoria mg/ml						
	Hex	Ét	Cl	DC	Ac	EtOH	MetOH
<i>Escherichia coli</i>	300	0	18.75	18.75	37.5	300	18.75
<i>Shigella sonnei</i>	18.75	-	18.75	37.5	37.5	18.75	37.5
<i>Streptococcus pyogenes</i>	150	300	37.5	75	37.5	150	37.5
<i>Pseudomona aureginosa</i>	-	-	18.75	150	37.5	18.75	37.5
<i>Shigella flexneri</i>	37.5	-	75	37.5	37.5	150	37.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18.75	-	18.75	37.5	37.5	18.75	37.5
<i>Serratia marcescens</i>	75	-	18.75	37.5	37.5	75	18.75

<i>Staphylococcus aureus</i>	37.5	300	18.75	18.75	18.75	18.75	18.75
------------------------------	------	-----	-------	-------	-------	-------	-------

En la tabla III se muestra la concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Ariocarpus fissuratus* Hex (hexano), Ét (éter), Cl (cloroformo), DC (diclorometano), Ac (acetona), EtOH (etanol), MetOH (metanol) de *Ariocarpus fissuratus* contra las cepas: *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomona aureginosa*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumonia*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a las pruebas realizadas, se puede concluir que la mayor actividad inhibitoria de *Flourensia cernua* sobre las cepas bacterianas ocurrió con los extractos de cloroformo, metanol y etanol que a su vez fueron los mismos que tuvieron mayor número de metabolitos secundarios. En el presente trabajo se encontraron importantes resultados de Concentración mínima inhibitoria de los extractos de *Ariocarpus fissuratus* que muestran el potencial de plantas desérticas como los cactus en la inhibición del crecimiento bacteriano. Con base a los resultados obtenidos se puede decir que los solventes de metanol, etanol y acetona son capaces de arrastrar todos los metabolitos secundarios y es por esto que presentan una buena actividad inhibitoria, mientras que los extractos con cloroformo a pesar de no salir positivos para todos los metabolitos fueron los que obtuvieron mejores resultados tanto en *Flourensia cernua* como *Ariocarpus fissuratus*; Es importante realizar más estudios en esta línea de investigación, para poder aplicarse en un futuro a la problemática de resistencia bacteriana que existe hoy en día.

BIBLIOGRAFÍA

- Castillo-Reyes F., Gallegos-Morales G., Flores-Olivas A., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C, 2015. Efectividad in vitro de Bacillus y polifenoles de plantas nativas de México sobre Rhizoctonia-Solani. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6(3): 549-562.
- Camacho, G. 2013. Programas de uso prudente de antibióticos en los hospitales: una estrategia efectiva para disminuir la resistencia a los antimicrobianos. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 26(104), 282.
- Granados, D., Lopez, G., & Gama, J. 1998. Adaptaciones y estrategias de las plantas de zonas aridas: Universidad Autonoma Chapingo, Chapingo (Mexico).
- Gupta, D., Dubey, J., & Kumar, M. 2016. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of some medicinal plants against selected common human pathogenic microorganisms. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(1), 15-20.
- Gutiérrez-Reyes E, De La Fuente-Salcido. N., Linaje-Treviño M, Hernández-Terán F, Valencia-Castro C, 2016. Actividad antibacteriana y perfil fitoquímico de *Ariocarpus fissuratus* (Engelmann) Shumann. Universidad de Guanajuato & Universidad Autonoma de Nuevo León 1-6.
- Jasso de Rodríguez D, S.-M. E., Rodríguez-García R, Hernández-Castillo F, Díaz-Jiménez M, Sáenz-Galindo A, González-Morales S, Flores-López M, Villarreal-Quintanilla J, Peña-Ramoa F, Carrillo-Lomelí D, 2017. Antifungal activity in vitro of ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Flourensia* spp. against postharvest fungi. *Industrial Crops & Products* 1-10.
- Khan, R., Zakir, M., Afaq, S., Latif, A., & Khan, A. 2010. Activity of solvent extracts of *Prosopis spicigera*, *Zingiber officinale* and *Trachyspermum ammi* against multidrog resistant bacterial and fungal strains *Journal of Infection in Developing Countries*. 4, 292-300.