

Actividad antimicrobiana de extractos oleosos de *Flaveria trinervia* (Spreng.) C. Mohr.

N.E. Maldonado-Sierra*¹, L. González-Cruz², E.A. Vargas-León³, H. Cortes-López⁴ y A. Bernardino-Nicanor*²

1 Estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias en Ingeniería Bioquímica del Tecnológico Nacional de México-Celaya, Antonio García Cubas Pte #600 esq. Av. Tecnológico. Celaya, Gto. México, C.P. 38010. **2** Tecnológico Nacional de México-Celaya, Departamento de Ingeniería Bioquímica. Antonio García Cubas Pte #600 esq. Av. Tecnológico. Celaya, Gto. México, C.P. 38010. **3** Universidad Tecnológica de Tecámac, División Químico Biológicas. Carretera Federal México-Pachuca km 37.5, Predio Sierra Hermosa, Tecámac Edo. Méx. **4** Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, México, C.P. 56230. *aurea.bernardino@itcelaya.edu.mx

RESUMEN

En la actualidad las infecciones en vías respiratorias se consideran como un grave problema de salud pública, siendo las bacterias los principales agentes causales. Las plantas medicinales, como la retama negra, podrían coadyuvar al tratamiento de dichas infecciones, por lo que su estudio ha tomado fuerza. En el presente trabajo fueron obtenidos extractos oleosos de hoja, flor, tallo y planta entera (P.E.) de retama negra, empleando disolventes de diferentes polaridades. Los extractos fueron evaluados frente a *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. El análisis microbiológico se realizó mediante las técnicas de difusión en agar y CMI. Los extractos de hoja, flor, tallo y P.E., mostraron actividad inhibitoria de *S. aureus*, los del tallo dieron resultados positivos para *A. baumannii*; y el extracto de P.E. mostró actividad para *P. aeruginosa*. El disolvente de extracción que dio mejores resultados fue acetona, mientras que hexano y cloroformo, en menor proporción. La CMI osciló entre 4 y 10 mg/mL. Concluyendo que los extractos oleosos de diferentes partes de la planta, y los disolventes empleados, presentan diferencias en cuanto a inhibición bacteriana, estableciendo a su vez, que la retama negra tiene potencial para el tratamiento de infecciones en vías respiratorias ocasionadas por bacterias.

Palabras clave: Retama negra, difusión por disco, Concentración Mínima Inhibitoria, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Actually, respiratory tract infections are considered a serious public health problem, with bacteria being the main causal agent. Medicinal plants, such as black broom, could help treat these infections, which is why their study has gained strength. In the present work, oily extracts of leaf, flower, stem, and whole plant (W.H.) of black broom were obtained, using solvents of different polarities. The extracts were evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiological analysis was performed using agar diffusion and MIC techniques. The leaf, flower, stem, and W.H. extracts showed inhibitory activity against *S. aureus*, the stem extracts gave positive results for *A. baumannii*, and the extract of W.H. showed activity for *P. aeruginosa*. The extraction solvent that gave the best results was acetone, while hexane and chloroform, to a lesser extent. The MIC ranged between 4 and 10 mg/mL. Concluding that the oily extracts from different parts of the plant, and the solvents used, present differences in terms of bacterial inhibition, establishing, in turn, that the black broom has potential for the treatment of respiratory tract infections caused by bacteria.

Keywords: Black broom, disc diffusion, Microbial Inhibitory Concentration, antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones de las vías respiratorias forman parte de las principales causas de muerte en el mundo, con más de 4 millones de muertes al año (WHO, 2017). En los países de América, representan un grave problema de salud, encontrándose así entre las principales causas de muerte y discapacidad en la región, con 534 242 defunciones en el año 2019. Particularmente en México, se tiene una incidencia promedio de 30.8 defunciones por cada 1000 000 habitantes (OPS, 2021). Una de estas enfermedades es la neumonía la cual es un tipo de infección respiratoria aguda que afecta a los pulmones, es ocasionada por diversos agentes infecciosos como virus, bacterias y hongos (WHO, 2021). La causa más común de la enfermedad es la asociada a infección bacteriana; los agentes causales pueden ser: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, bacterias anaerobias y microorganismos atípicos (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila [Chlamydia] pneumoniae*, *Legionella pneumophila*) (Armas & Gajewski, 2020).

Las enfermedades respiratorias causadas por bacterias, tradicionalmente han sido tratadas con antibióticos, sin embargo, el uso inadecuado de éstos representa un riesgo para la salud, ya que contribuye al aumento de la resistencia bacteriana, incrementando así la mortalidad por enfermedades infecciosas, considerándose un grave problema de salud pública (Dresler *et al.*, 2008). De ahí que, el uso de plantas medicinales ha cobrado relevancia en el ámbito social y farmacéutico, pues se han identificado compuestos bioactivos con propiedades terapéuticas (Askel, 2010). Una de las plantas que puede contener dichos compuestos es la *Flaveria trinervia* (Spreng.) C. Mohr o *Flaveria australasica* (Umadevi *et al.*, 2005) conocida como retama negra o retama en la región del bajío. En la medicina tradicional ha sido empleada para el tratamiento de enfermedades renales, diarrea, disentería (Osuna *et al.*, 2008; Tapia *et al.*, 2003) y gastritis (Canales *et al.*, 2006). El extracto de la hoja ha demostrado tener propiedades hepatoprotectoras y antioxidantes, atribuido a la alta concentración de flavonoides que lo componen. Así mismo, se ha comprobado mediante aplicación tópica (lavados) su eficiencia como cicatrizante de heridas en la piel, al reducir la peroxidación lipídica (Canales *et al.*, 2006; Umadevi *et al.*, 2006). Los extractos tanto metanólicos como acuosos de la retama han sido considerados como agente analgésico, y con acción supresora del sistema nervioso central (modelo de ratón) (Joy *et al.*, 2012), además de antihelmínticos y bactericidas (Joy & Krishna, 2011). Por ello, se considera que las diferentes partes de la retama podrían inhibir el crecimiento de bacterias causantes de neumonía, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del método de extracción sobre la actividad antibacteriana del extracto oleoso de las diferentes partes de *Flaveria trinervia* (Spreng.) C. Mohr.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta

Flaveria trinervia (Spreng.) C. Mohr fue colectada en la región de Celaya, Gto., México (20° 31' 24" latitud norte y 100° 48' 55" longitud oeste). La colecta se hizo manual durante la etapa de floración, en el periodo 2021.

Acondicionamiento de la muestra

Las muestras colectadas fueron transportadas en contenedores cerrados al laboratorio del Tecnológico Nacional de México-Celaya, donde se separaron y seleccionaron, eliminando las estructuras libres de daño mecánico o biológico. Se dividieron en lotes de planta entera, flor, tallo y hoja, posteriormente

los lotes se sometieron a un proceso de deshidratación en un secador de convección forzada (Binder, Modelo FD115-UL, Bohemia, NY, USA), a una temperatura de 40°C, durante 6 h. Las muestras deshidratadas se molieron, se tamizaron a través de la malla 40 (tamaño de partícula 425 µm) y se almacenaron en frascos de vidrio con tapa hermética.

Obtención de extractos oleosos

Cada sección de la planta (hoja, flor y tallo) y la P. E. fueron sometidas (por separado), a la extracción con los disolventes hexano, acetona, cloroformo y metanol (por triplicado), en un equipo de extracción soxhlet (20 reflujos). Posteriormente se retiraron los sólidos de la planta mediante filtración al vacío. Los extractos fueron recuperados en viales ámbar y se inyectó gas nitrógeno hasta la evaporación del disolvente y finalmente fueron almacenados en refrigeración (4°C).

Actividad antimicrobiana

Las bacterias empleadas fueron *Staphylococcus aureus* (50F), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978), *Acinetobacter baumannii* (A164), *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) y *Pseudomonas aeruginosa* (INP-42). Las cepas fueron aisladas de casos clínicos y donadas por Dr. Rodolfo García Contreras, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Las cepas fueron mantenidas viables en Agar Métodos Estándar (Bioxon, Becton Dickinson, México), en refrigeración (4°C) hasta su uso. Se empleó la técnica de difusión en agar usando discos de papel, conforme a lo descrito por Gutiérrez *et al.* (2016) y Morales *et al.* (2013) con modificaciones. Una vez que las cepas fueron activadas, en cada placa se colocó el inóculo de cada cultivo bacteriano (aproximada de 1×10^6 UFC/mL) y se extendieron uniformemente en la superficie del agar. Enseguida fueron colocados los discos sobre el agar. Finalmente, los extractos fueron colocados en cada disco (1 mg/disco). Una vez que los extractos se fijaron en los discos, se incubaron las placas durante 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Transcurrido este tiempo, se observó si hubo formación de halos de inhibición bacteriana.

Posteriormente, se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos que formaron halos de inhibición. Las cepas fueron activadas en tubos con caldo LB, a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 h. Posteriormente los cultivos fueron ajustados hasta obtener una suspensión final de 1×10^5 UFC/mL de cada cepa bacteriana. Por triplicado se prepararon tubos con las diferentes bacterias y se agregaron los extractos oleosos para evaluar concentraciones de 2, 4, 6, 8 y 10 mg/mL. Como control positivo se empleó caldo LB y como control negativo el inóculo de cada bacteria. Las muestras fueron incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h. La CMI, se definió como la concentración más baja, de los extractos que inhibieron el crecimiento de microorganismos (ausencia de turbidez).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos oleosos de hoja, flor, tallo y P. E. de retama negra fueron obtenidos, con hexano, cloroformo, acetona y metanol. La mayor actividad antimicrobiana de todos los extractos fue ante la bacteria Gram positiva *S. aureus*, tanto para la cepa ATCC 43300 como para el asilado clínico 50F. Para la flor, tallo y P. E., los extractos acetónicos produjeron inhibición ante algunas cepas, mientras que el extracto obtenido con cloroformo de la hoja inhibió a *S. aureus* (Tabla 1). En este caso, la polaridad de los disolventes de extracción podría estar involucrada en el resultado obtenido, debido a que el crecimiento de *S. aureus* se vio inhibido por los disolventes de polaridad intermedia, mientras que los extractos metanólicos y hexánicos (mayor y menor polaridad, respectivamente) no

presentaron actividad antibacteriana. Dicha actividad se atribuye a la presencia de compuestos afines a disolventes de polaridad intermedia, tales como terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos) y aceites esenciales. Otras investigaciones han reportado la inhibición del crecimiento de *S. aureus*, por la presencia de compuestos terpénicos, alcaloides, entre otros (Cuca *et al.*, 2011). Por otra parte Cuervo *et al.* (2019) reportaron que el extracto acetónico de *Drimys granadensis*, inhibió a *S. aureus*, atribuyendo dicha actividad a la presencia de compuestos polares.

Con respecto a la CMI para *S. aureus* (Tabla 2), se puede ver que para los extractos de flor-acetona, hoja-cloroformo y P.E.-acetona fue de 8 mg/mL, mientras que el extracto del tallo-acetona, presentó CMI con 10 mg/mL (Tabla 2). Por otro lado, los extractos que tuvieron actividad frente a *A. baumannii* 164, fueron los de tallo empleando hexano y acetona como disolventes de extracción (Tabla 1). Dicho efecto pudiera atribuirse a la presencia de compuestos terpénicos presentes en tallo (Manzano *et al.*, 2013). En cuanto a la CMI, el extracto hexánico presentó actividad con 4 mg/mL, mientras que el extracto con acetona, a los 8 mg/mL (Tabla 2).

Finalmente, para la bacteria Gram negativa *P. aeruginosa*, el único extracto que presentó inhibición fue el de P. E. empleando acetona como disolvente de extracción (Tabla 1), la CMI efectiva fue a partir de los 4 mg/mL (Tabla 2). Hoskeri & Krishna (2011), obtuvieron actividad antibacteriana de esta cepa empleando extractos acuosos y metanólicos de retama negra, reportando a los extractos acuosos con una mayor eficiencia.

Tabla 1. Actividad antibacteriana de extractos de retama negra.

Planta	Parte de la planta	Tipo de extracto	<i>P.aeruginosa</i> 14	<i>P.aeruginosa</i> 42	<i>A.baumannii</i> ATCC	<i>A.baumannii</i> 164	<i>S.aureus</i> ATCC	<i>S.aureus</i> 50F
<i>Flaveria trinervia</i> (Spreng.) C. Mohr	Flor	He	-	-	-	-	-	-
		Cl	-	-	-	-	-	-
		Ac	-	-	-	-	+	+
		Me	-	-	-	-	-	-
	Hoja	He	-	-	-	-	-	-
		Cl	-	-	-	-	+	+
		Ac	-	-	-	-	-	-
		Me	-	-	-	-	-	-
	Tallo	He	-	-	-	+	-	-
		Cl	-	-	-	-	-	-
		Ac	-	-	-	+	+	+
		Me	-	-	-	-	-	-
	Planta entera	He	-	-	-	-	-	-
		Cl	-	-	-	-	-	-
		Ac	+	-	-	+	+	+
		Me	-	-	-	-	-	-

*He=Hexano, Cl=Cloroformo, Ac=Acetona, Me=Metanol. (+) representa inhibición bacteriana, y (-) crecimiento bacteriano.

Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria de extractos oleosos de retama negra (mg*mL⁻¹)

Planta	Parte de la planta	Tipo de extracto	<i>P.aeruginosa</i> 14	<i>P.aeruginosa</i> 42	<i>A.baumannii</i> ATCC	<i>A.baumannii</i> 164	<i>S.aureus</i> ATCC	<i>S.aureus</i> 50F
<i>Flaveria trinervia</i> (Spreng.) C. Mohr	Flor	Ac	-	-	-	-	8	8
	Hoja	Cl	-	-	-	-	8	8
	Tallo	He	-	-	-	4	-	-
		Ac	-	-	-	8	10	8
Planta entera	Ac	4	-	-	-	8	8	

CONCLUSIÓN

Los extractos oleosos de la retama negra presentaron diferente actividad antibacteriana en función al disolvente de extracción utilizado, así como de la bacteria sobre la cual fue validada su actividad. Los extractos de flor, tallo y planta entera, empleando acetona como disolvente de extracción, inhibieron el crecimiento de *S. aureus*. Para la bacteria *A. baumannii* el extracto hexánico y acetónico del tallo, y el extracto acetónico de P.A presentaron actividad antibacteriana. Únicamente el extracto de P.A., con acetona, presentó actividad contra *P. aeruginosa*. Las CMI oscilaron entre los 4 mg/mL y 10 mg/mL. El extracto del tallo y de P. E. tuvieron mayor espectro de actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas utilizadas en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aksel, B. (2010). Bioactive compounds in plants –benefits and risks for man and animals. *The Norwegian Academy of Science and Letters*. Oslo. ISBN 978-82-7099-583-7
- Armas, M.R. & Gajewski, P. (2020). *Medicina interna basada en la evidencia 2019/20*. (3ª ed.). Versión electrónica disponible en: <https://empendium.com/manualmibe/chapter/B34.II.3..html>
- Canales, M.M., Hernández, D.T., Caballero, N.J., Romo de Vivar, R.A., Durán, D.A. & Lira, S.R. (2006). Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coaxatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana* 75, 21-43. ISSN: 0187-7151
- Cuca, S.L.E., Coy, B, C.A.; Coy, B. E.D. & Lozano, M. J.M. (2011). Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. *Revista Cubana de Farmacia* 45(2), 275-282.
- Cuervo, S.D., Vanegas, C.J., Corzo, B.D. & Correa, M.F. (2019). Evaluación de la capacidad bactericida de extractos vegetales de distinta polaridad de *Drimys granadensis*. *Revista peruana de biología* 26 (1), 135-142. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i1.15917>
- Dreser, A., Wirtz, J.V., Corbett, K.K. & Echániz, G.(2008) Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud pública de México* 50 (4), 480-487.
- Galván, J.M., Rajas, O., & Aspa, J. (2015). Revisión sobre las infecciones no bacterianas del aparato respiratorio: neumonías víricas. *Archivos de bronconeumología*, 51(11), 590-597.
- Gutiérrez, A. E.J., Rangel, V. E., Gómez, A.C.A., Falfán, C. R.N., Rodríguez, M. M.L., Godínez, O. A., Cortés, L.H. & Castro, R. J. (2016). Antibacterial effect of roselle extracts (*Hibiscus sabdariffa*), sodium hypochlorite and acetic acid against multidrug-resistant *Salmonella* strains isolated from tomatoes. *Lett. Appl. Microbiol.* 62, 177-184

- Hoskeri, H.J. & Krishna, V. (2011). Anthelmintic and Bactericidal Activity of Extracts from *Flaveria trinervia* Spring C. Mohr. *European J Med Plants* 1(4), 153-161.
- Joy, H. H., Krishna, V., Vinay Kumar, B., Shridar, A. H., Ramesh Babu, K., & Sudarshana, M. S. (2012). In Vivo prophylactic effects of oleanolic acid isolated from chloroform extract of *Flaveria trinervia* against ethanol induced liver toxicity in rats. *Archives of Pharmacal Research*, 35(10), 1803–1810. doi:10.1007/s12272-012-1013-y
- Joy, H. & Krishna, V. (2011). Anthelmintic and Bactericidal Activity of Extracts from *Flaveria trinervia* Spring C. Mohr. *European Journal of Medicinal Plants* 1(4): 153-161.
- Manzano, S.P., Miranda, M.M., Rodney M.de O.P., Orellana, L.T., Abreu P.P. & Peralta G.E. (2013). Estudio químico de los compuestos lipídicos de las hojas, tallos y flores de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (Asteraceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 18(4), 575-585.
- Morales, C. M., Hernández, M.J., Leyva, R.G., Salinas, M.Y., Soto, R.L. & Castro, R.J. (2013). Influence of variety and extraction solvent on antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) calyxes. *Journal of Medicinal Plants Research*. 7(31), 2319-2322.
- OPS. (2021). La carga de enfermedades respiratorias crónicas en la Región de las Américas, 2000-2019. *Organización Panamericana de la Salud*. (Fecha de consulta: Mayo 2022). Disponible en: <https://www.paho.org/es/enfermedades-no-transmisibles-salud-mental/portal-datos-enfermedades-no-transmisibles-salud-4>
- Osuna, L., Tapia-Pérez, M.E., Jiménez-Ferrer, J.E., Carrillo-Quiróz, B.A. & Silva-Sánchez, J. (2008). Screening of *Alternanthera repens*., *Boerhavia coccinea*., *Flaveria trinervia*., *Tournefortia densiflora*., and *Vitex mollis*. Extracts to Evaluate their Antibacterial Activity and Effect on Smooth Muscle. I. *Pharmaceutical Biology*, 43(9), 749-753. DOI: 10.1080/13880200500406412
- Ramos, M.A., Pintos, P., & Muñoz, R.E. (2018). Protocolo diagnóstico y tratamiento empírico de la neumonía en el paciente inmunocomprometido. *Medicine – Programa de formación médica continuada acreditado* 12(55), 3281-3284. doi:10.1016/j.med.2018.04.016
- Tapia, P.M.E., Tapia, C.A., Cedillo, R.R., Osuna, L. y Meckes, M. (2003). Screening of Mexican Medicinal Plants for Antiprotozoal Activity – Part II. *Pharmaceutical Biology* 41(3), 180-183.
- Umadevi, S., Mohanta, G. P., Kalaichelvan, V. K. & Manavalan R. (2006). Studies on wound healing effect of *flaveria trinervia* leaf in mice. *Indian J Pharm Sci*, 68 (1), 106-108. doi: 10.4103/0250-474X.22979.
- Umadevi, S., Mohanta, G.P., Balakrishna, K., y Manavalan, R. (2005). Phytochemical Investigation of the Leaves of *Flaveria trinervia*. *Natural Product Sciences* 11(1), 13-15.
- WHO. (2017). Foro de las Sociedades Respiratorias Internacionales. El impacto global de la Enfermedad Respiratoria (2ª Ed.). *Asociación Latinoamericana de Tórax*. México.
- WHO. (2021). Neumonía. (Fecha de consulta: Mayo 2022). Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>