

# Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico y acuoso de *Brosimum rubescens* (palisangre) mediante el método de difusión en agar

## In vitro determination of antibacterial activity of ethanolic and aqueous extract *Brosimum rubescens* (palisangre) by agar diffusion method

Róger del Águila<sup>1</sup>, Patricia Macedo<sup>1</sup>, Wilfredo Gutiérrez<sup>1</sup>, Jessy Vásquez<sup>2</sup> y Alenguer Alva<sup>3</sup>

Recibido: octubre 2012

Aceptado: diciembre 2012

### RESUMEN

Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de la corteza del tronco de *Brosimum rubescens* (palisangre) mediante los métodos de difusión en discos en agar y de dilución en caldo por macrodilución para las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Se evidenció la actividad antibacteriana del extracto acuoso para *E. coli*. El extracto etanólico por su parte evidenció actividad antibacteriana para *S. aureus*. El extracto etanólico, además, presentó una mejor respuesta en la inhibición del crecimiento bacteriano, debido probablemente a la combinación de los compuestos fitoquímicos que posee.

**Palabras claves:** *Brosimum rubescens*, actividad antimicrobiana, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

### ABSTRACT

Antibacterial activity was evaluated *in vitro* of *Brosimum rubescens* (palisangre) bark using the disk diffusion method on agar dilution and broth macro-dilution for *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, the extract aqueous showed antibacterial activity for *E. coli*. By the hand, the ethanolic extract exhibited antibacterial activity for *S. aureus*, the ethanolic extract presented a better response in the inhibition of bacterial growth; it is probably a combination of phytochemical compound present in the extract.

**Key words:** *Brosimum rubescens*, antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

### INTRODUCCIÓN

La selva tropical amazónica es una de las áreas de biodiversidad más abundante en el mundo, alberga numerosas especies vegetales que han venido siendo utilizadas con diferentes fines por las comunidades humanas que la habitan, en especial, aquellas que poseen propiedades medicinales (Brack,

1993).

El sistema sanitario de diversos países del mundo contempla el uso de plantas medicinales o de sus principios activos en la terapéutica de diversas enfermedades. En efecto, las plantas medicinales son capaces de sintetizar una gran variedad de sustancias bioactivas denominadas metabolitos secun-

<sup>1</sup> Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Nina Rumi, San Juan Bautista, Maynas, Loreto, Perú.

<sup>2</sup> Facultad de Industrias Alimentarias. UNAP. Iquitos, Perú.

<sup>3</sup> Facultad de Industrias Alimentarias. UNAP. Freyre 610, Iquitos, Perú. alenalar@hotmail.com

darios; estas sustancias, encontradas en cantidades pequeñas, presentan una diversidad química y brindan a las plantas protección contra insectos y microorganismos fitopatógenos; muchos de estos metabolitos ejercen actividades biológicas y farmacológicas que son importantes para el hombre (Alves, 2005).

El hombre amazónico a través de toda su historia, ha logrado manipular entre 2000 y 3000 plantas medicinales, sin embargo, se han efectuado pocos estudios químicos y farmacológicos sobre las propiedades medicinales y tóxicas de estas plantas; de hecho, solo se han identificado 1516 especies distribuidas en 145 familias y 594 géneros; únicamente se reportan investigaciones sobre el 50% de estas plantas, siendo que la mayoría ha sido examinada debido a su utilidad maderable, su empleo para fabricación de papel o por sus aplicaciones en la alimentación humana o en la industria (Brack, 1993).

La especie *Brosimum rubescens* Taubert, es utilizada en la medicina tradicional como antiartrítico, antirreumático, fortificante y para combatir los descensos, la hemorragia y la sífilis; además de los usos tradicionales anteriores, los nativos amazónicos brasileños la utilizaban como anticonceptivo, antihemorrágico, tónico y para tratar la fiebre posiblemente causada por malaria (Brack, 2000). Estudios del palisangre demostraron que desde el punto de vista médico es eficaz para la contención de las hemorragias (Loizeau y Spichiger, 1990). Las furanocumarinas aisladas de la especie *Brosimum rubescens* son utilizadas desde épocas remotas para el tratamiento de enfermedades de la piel, tales como psoriasis, vitíligo, leucodermia, micosis, dermatitis y eczemas (Diawara y Trumble, 1997).

Se evaluó la cantidad aproximada de

componentes estructurales y macromoleculares presentes en el aserrín de la madera del *Brosimum rubescens* (palisangre) como celulosa (56,6%), hemicelulosa (25,2%), lignina (33,0%) y metabolitos secundarios (22,23%). Estudios químicos de sus metabolitos secundarios indicaron que los extractos del aserrín de palisangre contienen gran cantidad de xantiletina y otras cumarinas en cantidades relativamente pequeñas tales como la luvangetina (Pozzetti, 1969; Anderson, 1980; Vieira, 1997); brosiparina, 7-demetilsuberosina y brosiprenina (Hayasida, 2008), en un estudio fitoquímico parcial de los extractos etanólicos de madera, hojas y corteza de la especie *Brosimum rubescens* (Moraceae), de las cuales se aislaron tres cumarinas: xantiletina, suberosina y 7-demetil-suberosina, además dos triterpenos, acetato de lupeol y lupeol (Alba y Cuca, 2007); la xantiletina presente en el género *Brosimum* es una piranocumarina que presenta actividad antiplaquetaria (Teng et al., 1992), y anticancerígena (Gljnatilau y Kingston, 1994), presenta potencial herbicida (Anaya et al., 2005) e inhibe el crecimiento de hongos simbióticos (Godoy et al., 2005).

Nuestro grupo de trabajo logró determinar la presencia de una mezcla de quinonas naftaquinonas y antraquinonas  $\alpha$ - y  $\beta$ -hidroxiladas, y una mezcla de flavonoides del tipo flavona. También se logró aislar la xantiletina (Arzubialdes y Alba, 2013). Del extracto etanólico de la madera se evaluó la actividad antifúngica en cepas de *Trichosporum rubrum* ATCC 28188 y *Trichosporum mentagrophytes* ATCC 24953 (Fachín-Espinar et al., 2012).

## MATERIAL Y MÉTODO

### Materia vegetal

La especie vegetal en estudio fue recolectada dentro de las áreas de la Reserva Nacional

Allpahuayo-Mishana. Fue seleccionada de acuerdo a sus características morfológicas: tamaño de la especie, grosor y espesor de tronco.

La especie en estudio fue llevada al Herbarium Amazonense (AMAZ) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) para su identificación taxonómica. Se le asignó un código y un certificado de reconocimiento.

### Preparación de los extractos

Los extractos se obtuvieron por maceración: para el extracto acuoso se colocaron 1000 g de muestra vegetal en 2500 ml de agua destilada por un periodo de 3 días, y 1200 g de muestra en 3000 ml de etanol al 96% por un periodo de 7 días. Después de la maceración, las muestras vegetales fueron filtradas en papel filtro estándar adicionando etanol al 96% para una rápida remoción del macerado; el solvente fue evaporado a presión reducida.

### Ensayos antimicrobianos

#### Bacterias

*Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 ATCC 25923 y *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani y Chalmers 1919 ATCC 25922, fueron utilizadas en el presente estudio.

#### Bioensayos

La actividad antibacteriana del extracto acuoso y etanólico de *Brosimum rubescens* (pali-sangre) fue determinada utilizando el método de difusión en agar y el método de dilución en caldo. Para el método de difusión en agar, se seleccionaron de 4 a 5 colonias bien aisladas y se transfirieron a un tubo con 5 ml de caldo Müeller-Hinton e incubada a 37 °C para su reactivación de las cepas. Consiguiente a la incubación inicial, las bacterias fueron suspendidas con agua destilada para

alcanzar una concentración equilibrada hasta 0,5 de la escala estándar de Mc Farland. Cada muestra fue transferida sobre la superficie del agar Müeller-Hinton empleando un hisopo.

Para las muestras en estudio se procedió a preparar 500 mg de cada extracto vegetal diluidos en 1 ml de disolución metanol: agua (1:1) para ser homogenizados en vórtex hasta su disolución completa. Con esta solución se embebieron cuatro discos de papel de 5 mm con 40  $\mu\text{L}$ , 30  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$ ; se concentraron hasta obtener 20 mg, 15 mg, 10 mg y 5 mg respectivamente, de extracto seco de la muestra vegetal. Con esta concentración, los discos de papel se aplicaron sobre la superficie del agar.

Disco de gentamicina 10  $\mu\text{g}$  fue aplicado como control positivo y el disco impregnado con 30  $\mu\text{L}$  de metanol: agua (1:1) fue aplicado como control negativo. Las placas fueron incubadas a 37 °C. Después de 24 horas las zonas de inhibición aparecieron alrededor de los discos que fueron medidos y registrados en milímetros. Se realizaron como mínimo tres repeticiones para cada uno de los ensayos.

Para el método de dilución en caldo, se prepararon 640 mg de cada extracto en 1 ml de metanol: agua (1:1) para obtener una concentración de 640 mg/ml de solución madre. De la solución, se extrajo 0,2 ml y fue añadido al tubo 1 con 1,8 ml de caldo Mueller-Hinton. Del tubo 1 se extrajo 1 ml para ser añadido al tubo 2 y así sucesivamente hasta llegar al tubo 8 y de este último se extrajo 1 ml que fue desechado. Después de este proceso, se añadió a todos los tubos 1 ml de la suspensión bacteriana, siendo 2 ml el volumen final mínimo para cada tubo. Las concentraciones fueron comprendidas entre los rangos de 32 mg/ml a 0,25 mg/ml. Para el control positivo empleado en la prueba se utilizó

gentamicina (160 mg/2 ml), del cual se usó 0,64 ml y se enrasó hasta 5 ml en un tubo estéril para la obtención de una solución madre de 10 240  $\mu\text{g/ml}$ . Después de este proceso también se añadió a todos los tubos 1 ml de la suspensión bacteriana, siendo 2 ml el volumen final mínimo, para cada tubo. Las concentraciones fueron comprendidas entre

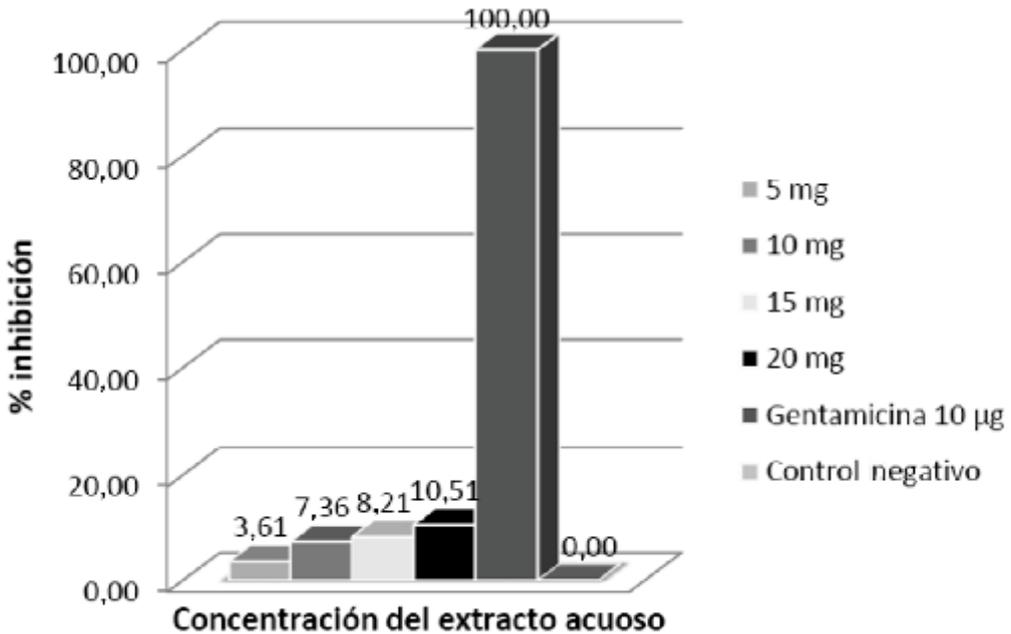
los rangos de 512  $\mu\text{g/ml}$  a 2  $\mu\text{g/ml}$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

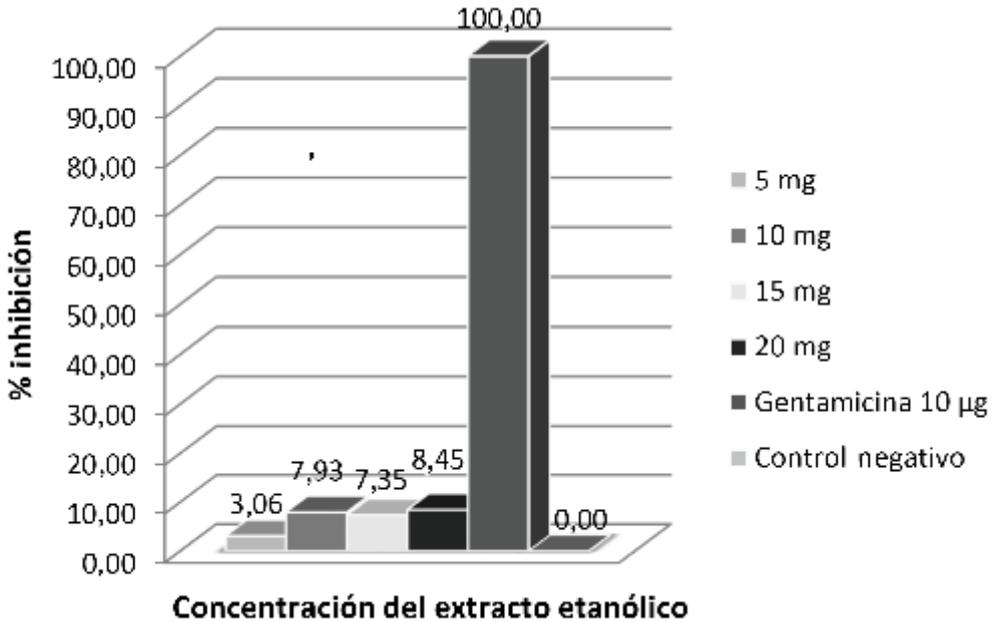
En las tablas y figuras siguientes, se muestran los resultados de los ensayos antibacterianos realizados con cada uno de los extractos de madera de *Brosimum rubescens* (palisangre).

**Tabla 1.** Porcentaje de inhibición de los extractos acuoso y etanólico de madera de *Brosimum rubescens* frente al control positivo en cepa *Escherichia coli*.

Cepa <i>Escherichia coli</i>	Concentración del extracto	Extracto			
		Acuoso		Etanólico	
		% inhibición		% inhibición	
		Media	%	Media	%
	5 mg	5,55 $\pm$ 0,74	3,61	5,47 $\pm$ 0,64	3,06
	10 mg	6,12 $\pm$ 0,90	7,36	6,62 $\pm$ 0,65	7,93
	15 mg	6,25 $\pm$ 0,50	8,21	6,13 $\pm$ 0,22	7,35
	20 mg	6,60 $\pm$ 0,47	10,51	6,30 $\pm$ 0,79	8,45
	Gentamicina 10 $\mu\text{g}$	20,22 $\pm$ 1,10	100,00	20,38 $\pm$ 1,13	100,00
	Control negativo	5,00 $\pm$ 0,00	0,00	5,00 $\pm$ 0,00	0,00



**Figura 1.** Porcentaje de inhibición del extracto acuoso de *Brosimum rubescens* frente al control positivo en cepa *Escherichia coli*.



**Figura 2.** Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de *Brosimum rubescens* frente al control positivo en cepa *Escherichia coli*.

En la tabla 1 y figuras 1 y 2, se puede apreciar que el mayor porcentaje de inhibición tanto del extracto acuoso como etanólico en cepa *Escherichia coli* se

manifestó en la concentración de 20 mg; asimismo, notamos que el menor porcentaje de inhibición fue la concentración de 5 mg.

**Tabla 2.** Porcentaje de inhibición de los extractos acuoso y etanólico de madera de *Brosimum rubescens* frente al control positivo en cepa *Staphylococcus aureus*.

Cepa <i>Staphylococcus aureus</i>	Concentración del extracto	Extracto			
		Acuoso		Etanólico	
		% inhibición		% inhibición	
		Media	%	Media	%
	5 mg	5,33 ± 0,41	2,13	5,92 ± 0,66	5,75
	10 mg	5,90 ± 0,48	5,81	7,67 ± 0,88	16,69
	15 mg	6,08 ± 0,85	6,97	7,52 ± 1,21	15,75
	20 mg	5,83 ± 0,52	5,35	7,17 ± 0,82	13,56
	Gentamicina 10 µg	20,50 ± 0,89	100,00	21,00 ± 1,41	100,00
	Control negativo	5,00 ± 0,00	0,00	5,00 ± 0,00	0,00

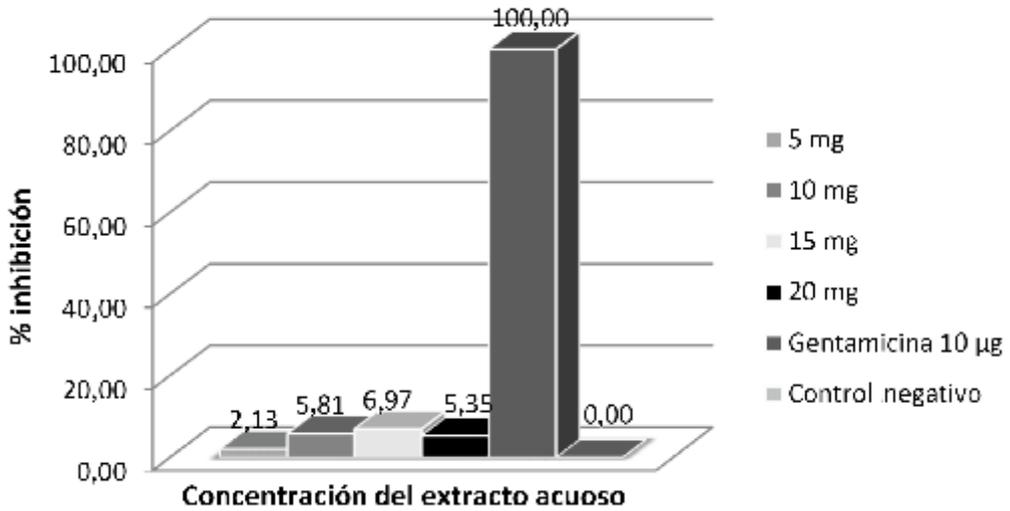


Figura 3. Porcentaje de inhibición del extracto acuoso de *Brosimum rubescens* frente al control positivo en cepa *Staphylococcus aureus*.

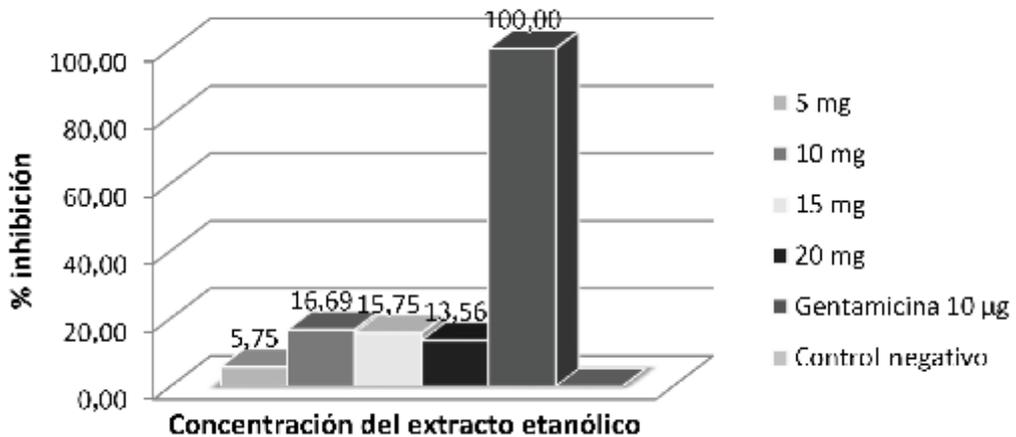
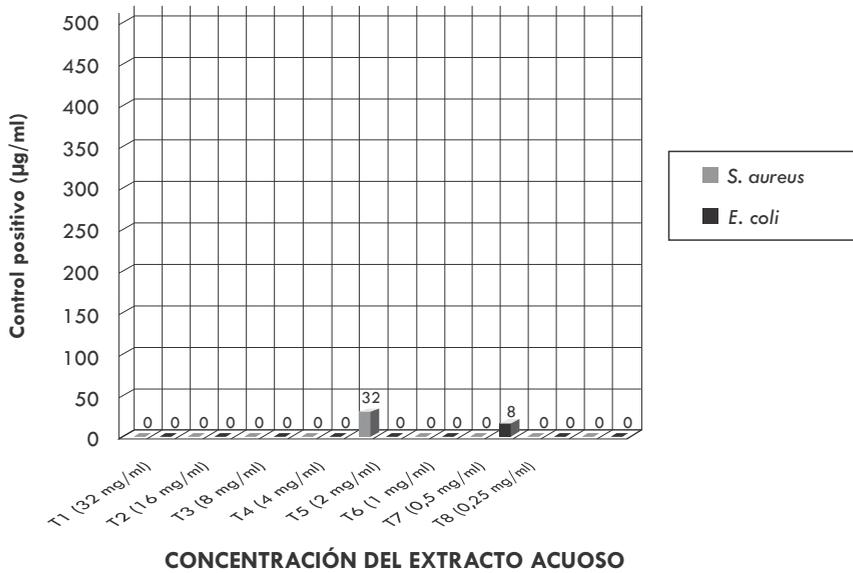


Figura 4. Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de *Brosimum rubescens* frente al control positivo en cepa *Staphylococcus aureus*.

En la tabla 2 y figuras 3 y 4, se puede apreciar que el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento de cepa *Staphylococcus aureus*, se manifestó en la concentración de 10 mg en el extracto

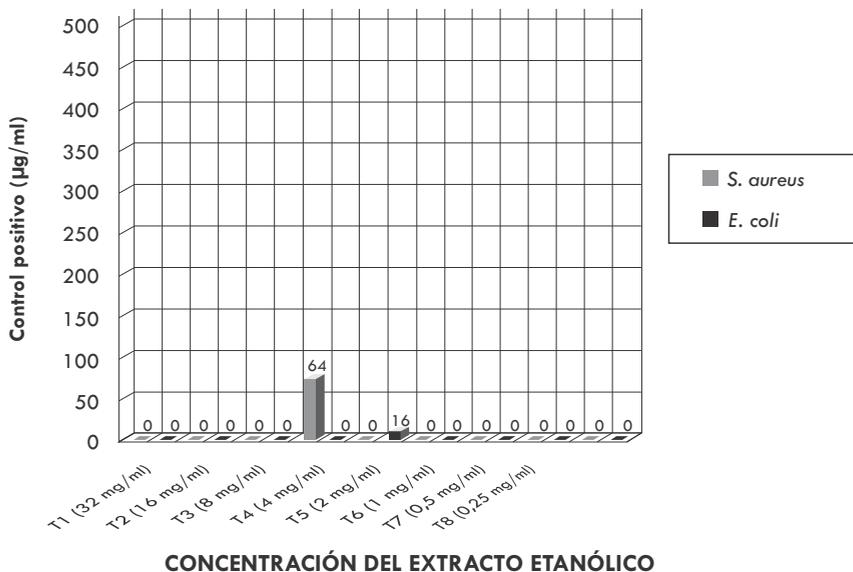
etanólico, y en la concentración de 15 mg para el extracto acuoso; asimismo, notamos que el menor porcentaje de inhibición en ambos extractos se presentó en la concentración de 5 mg.



**Figura 5.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto acuoso de *Brosimum rubescens* (palisangre) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en comparación al control positivo.

En la figura 5 se aprecia la concentración mínima inhibitoria (CMI) entre las cepas de bacterias en estudio. La mayor efectividad de CMI se manifestó en el tubo 5 frente a *Staphylococcus aureus*, con una concentración de 2 mg/ml comparada frente a su

control positivo (32 µg/ml); asimismo, notamos que la CMI para *Escherichia coli* se manifestó en el tubo 7, que contenía la concentración de 0,5 mg/ml comparada frente a su control positivo (8 µg/ml).



**Figura 6.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Brosimum rubescens* (palisangre) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en comparación al control positivo.

En la figura 6 se aprecia la concentración mínima inhibitoria (CMI) entre las cepas de bacterias en estudio. La mayor efectividad de CMI se manifestó en el tubo 4 frente a *Staphylococcus aureus*, con una concentración de 4mg/ml comparada frente a su control positivo (64  $\mu\text{g/ml}$ ); asimismo, notamos que la CMI para *Escherichia coli* se manifestó en el tubo 6, que contenía la concentración de 1 mg/ml comparada frente a su control positivo (16  $\mu\text{g/ml}$ ).

El método de difusión en agar es una técnica de bioensayo utilizada para la determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana. Normalmente, esa técnica verifica cuáles extractos vegetales presentan potencial actividad antimicrobiana y cuáles organismos son susceptibles.

El análisis antibacteriano de *Brosimum rubescens* (palisangre) realizado en este estudio, presentó consistencia en sus propiedades antibacterianas, pues de acuerdo con los resultados obtenidos en los experimentos, se comprobó la actividad antibacteriana de la planta, de acuerdo a los estudios realizados a la misma.

El presente trabajo de investigación, en los ensayos realizados para la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos acuoso y etanólico de madera de *Brosimum rubescens*, mediante el método de difusión en agar, mostró que presenta actividad antibacteriana, en 10,51% de inhibición, para el extracto acuoso frente a *Escherichia coli* y 16,69% de inhibición, para el extracto etanólico frente a *Staphylococcus aureus*. Este resultado es semejante al determinar la actividad antibacteriana con la *Dorsteria contrajeva* (mano de león), una especie perteneciente a la familia Moraceae, donde se encontró en el extracto hidroalcohólico a la concentración del extracto de 8 mg/ml, una inhibición del

crecimiento bacteriano del 35% frente a *Escherichia coli* (Alanis, 2006).

En la determinación de la concentración mínima inhibitoria, en relación con los resultados obtenidos por el método de dilución en caldo (macrodilución), los extractos de madera de *Brosimum rubescens* mostraron una inhibición del crecimiento bacteriano de 2 mg/ml para el extracto acuoso frente a la cepa de *Escherichia coli* y de 4 mg/ml para el extracto etanólico frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*. Estos resultados fueron comparados con trabajos realizados por Bussmann et al. (2011), donde se menciona que los extractos presentan una CMI >5 mg/ml son sustancias candidatas a producir una fuerte actividad antimicrobiana para la especie *Brosimum rubescens* (palisangre) que fueron de 4 mg/ml para extracto etanólico y 2 mg/ml para el extracto acuoso, siendo similares a los resultados encontrados en nuestro estudio de experimentación.

La no inhibición de crecimiento con el control, muestra que el etanol no ejerció influencia sobre los resultados de la actividad de los extractos. Siendo así, el resultado indica que los mismos microorganismos en los ensayos de difusión fueron afectados por el extracto bruto.

## CONCLUSIONES

Considerando los resultados experimentales obtenidos en este trabajo, se puede concluir que en la evaluación de la actividad antibacteriana utilizando el método de difusión en agar, el extracto de la corteza del tronco de *Brosimum rubescens* (palisangre) presentó actividad antibacteriana *in vitro* de inhibición del crecimiento de bacterias: en un 10,51% en el extracto acuoso para la cepa de *Escherichia coli* y 16,69% en el extracto etanólico para la cepa de *Staphylococcus aureus*. Existen diferencias significativas en

el promedio del crecimiento de las bacterias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en relación con el extracto etanólico y esto en comparación con el control positivo en cada microorganismo evaluado.

## AGRADECIMIENTO

A la Oficina General de Investigación de la UNAP, por el financiamiento del proyecto de investigación "Estudio químico y biológico de la especie *Brosimum rubescens* (palisangre)".

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alanis R. 2006. Evaluación de la actividad de algunas plantas medicinales, utilizadas en la medicina tradicional mexicana contra enterobacterias causantes de diarrea y disentería: estudio farmacológico y químico del pericarpio de *Punica granatum* L. (granado). Instituto Politécnico Nacional. México. 2006.
- Alba S, Cuca S. 2007. Identificación de metabolitos secundarios de *Brosimum rubescens* Moraceae. Determinación de actividad antimalárica. Scientia et técnica, abril 2007. año/vol. XIII, número 033, Universidad Tecnológica de Pereira; Pereira-Colombia. Pp. 129-131.
- Alves LF. 2005. O laboratorio da Flora Medicinal: marco no estudo das plantas medicinais brasileiras. Revistas Fitos. V1, n.2, pp. 30-40. São Paulo.
- Anaya AL, Rubalcava MM, Ortega RC, Santana CG, Monterrubio PNS, Bautista BEH, Rachel MR. 2005. Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. Phytochemistry, 2005. 66 (4): 487-494.
- Arzubialdes K, Alva A. 2013. Extracción y determinación de colorantes naturales a partir del *Brosimum rubescens* Taubert (palisangre). Tesis para obtener título profesional. FIA-UNAP.
- Brack A. 2000. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Cusco, Perú.
- Brack A. 1993. Plantas utilizadas en el Perú en relación con la salud humana. En salud y población indígena de la Amazonía. Quito. Cap. II: 61-175.
- Bussmann RW, Malca-García G, Glenn A, Sharon D, Chait G, Díaz D, Pourmand K, Jonat B, Somogy S, Guardado G, Aguirre C, Chan R, Meyer K, Kuhlman A, Townesmit A, Effio-Carbajal J, Frías-Fernández F, Benito M. 2011. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as anti-bacterial remedies. J Ethnopharmacol.
- Diawara M, Trumble T. 1997. Linear Furanocoumarins. In: D'MELLO, J. P. (Ed). Handbook of Plant Fungal Toxicants. New York; CRC Press. cap.12, pp.175-189.
- Fachín-Espinar M, López-del Águila P, Gutiérrez W, Arzubialdes K, Alva A. 2012. Actividad antifúngica del extracto de *Brosimum rubescens* (palisangre). Ciencia Amazónica, 2012, vol. 2, núm. 2, 100-107.
- Gijnatilau AAL, Kingston DGI. 1994. Biological activity of some coumarins from Sri Lankan Rutaceae. Journal of Natural Products, 1994. 57, (4): 518-520.
- Godoy MFP, Victor SR, Bellini AM, Guerreiro G, Rocha WC, Bueno OC,

- Hebling MJA, Bacci Jr M, Silva MFGF, Vieira PC, Fernandes JB, Pagnocca FC. 2005. Inhibition of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants by coumarins. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2005. 16(3B): 669-672.
- Hayasida W. 2008. Proposta de aproveitamento em resíduos de pau-rainha (*Brosimum rubescens*) descartados pelo setor madeireiro. *Acta Amaz.* 2008. Vol. 38, N°4, pp. 749-752.
- Loizeau A, Spichiger R. 1990. Moraceae. Contribución a la Flora de la Amazonía Peruana. Génova, IT. Pp. 17-85. IIAP-PUB.033.
- Pozzetti CL. 1969/Anderson TF. 1980/Vieira IJC. 1997. Contribuição ao Estudo Químico do *Brosimum gaudichaudii* Trécul, *Rev. Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara*, v. 3, n. 2, pp. 215-223, 1997.
- Teng CM, Li HL, Wu TS, Huang SC, Huang TF. 1992. Antiplatelet actions of some coumarin compounds isolated from plant sources. *Thrombosis Research*, 1992. 66 (5): 549-557.