

**CONTENIDO DE FENOLES Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN EXTRACTO DE *GUAZUMA ULMIFOLIA***

**(CONTENT OF PHENOLS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AN EXTRACT OF *GUAZUMA ULMIFOLIA*)**

***Nirza Noguera-Machado*<sup>1,2\*</sup>, *Libia Torres*<sup>4</sup>, *Javier Trejo*<sup>4</sup>, *Pierina Valera*<sup>4</sup>, *Rosmina Visconti*<sup>4</sup>, *Naiglet Zambrano*<sup>4</sup>, *Franklin Pacheco-Coello*<sup>1,2</sup>, *José Duque*<sup>2</sup>, *Luis Ojeda-Ojeda*<sup>1,3</sup>**

1. Universidad de Carabobo Instituto de Investigaciones Biomédicas “Dr. Francisco Triana” (BIOMED-UC).
2. Universidad de Carabobo. Departamento de Ciencias Básicas de la Escuela de Bioanálisis. Estado Aragua, Venezuela.
3. Universidad de Carabobo. Departamento de Bioquímica y Fisiología de la Escuela de Medicina. Estado Aragua, Venezuela.
4. Universidad de Carabobo. Escuela de Medicina. Estado Aragua, Venezuela.

\* *nirza.noguera@gmail.com*, *nnoguera1@uc.edu.ve*

*Recibido: 08-06-2020/ Aceptado: 12-10-2020*

**RESUMEN**

Muchas especies de plantas son utilizadas empíricamente, por las poblaciones rurales para tratar distintas dolencias. Tal es el caso del guácimo o guácima (*Guazuma ulmifolia*), planta de interés forrajero, cuyas hojas, frutos y corteza, son empleados para elaborar remedios caseros para tratar fiebres, disentería, diarreas, inflamaciones, entre otros padecimientos. Existen evidencias científicas que avalan algunas de estas propiedades; sin embargo, en el país no hay estudios referentes al tema. Por este motivo, se planteó como objetivo determinar la cantidad de compuestos bioactivos (fenoles totales y flavonoides), presentes en el extracto del fruto de *G. ulmifolia* y determinar su efecto antimicrobiano sobre el crecimiento de una cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y una *Klepsiella nuemoniae* ATCC 700603). Los frutos fueron recolectados en la ciudad de Maracay (Venezuela), secados, almacenados y sometidos a un proceso de extracción con etanol al 90%. Las determinaciones cuantitativas de fenoles totales y flavonoides se realizaron de acuerdo con los métodos estándares. El efecto sobre el crecimiento bacteriano fue evaluado por turbidimetría y por la metodología de Kirby-Bauer. Se obtuvo que el contenido de fenoles totales y flavonoides fue de 15,34±1,9 mg GAE/g y 7,34 ±1,68 mg CE/g, respectivamente. La presencia del extracto en el medio de cultivo inhibió eficazmente el crecimiento de *S. aureus* durante 6 horas, pero no tuvo efecto

considerable sobre la cepa *K. nuemoniae*. Estos resultados sugieren que es necesario profundizar la investigación en torno a esta especie para demostrar sus potencialidades.

**Palabras claves:** *Guazuma ulmifolia*, *Staphylococcus aureus*, *Klepsiella nuemoniae*, *Productos naturales*.

### ABSTRACT

Rural populations to treat various ailments use many plant species empirically. Such is the case of the guácimo or guácima (*Guazuma ulmifolia*), plant of forage interest, whose leaves, fruits and bark, are used to make home remedies to treat fevers, dysentery, diarrhea, inflammations, among other diseases. There is scientific evidence that supports some of these properties; however, there are no studies in the country on the subject. For this reason, the objective was to determine the amount of bioactive compounds (total phenols and flavonoids) present in the extract of the fruit of *G. ulmifolia* and to test its effect on the growth of three *Staphylococcus aureus* strain (ATCC 25923) and strain *Klepsiella nuemoniae* (ATCC 700603). The fruits were collected in the city of Maracay, Venezuela. Dried, stored and subjected to an extraction process with 90% ethanol. The quantitative determinations of total phenols and flavonoids were made according to standard methods. The effect on bacterial growth was evaluated by turbidimetry and Kirby-Bauer methodology. The content of total phenols and flavonoids was found to be  $15.34 \pm 1.9$  mg GAE/g and  $7.34 \pm 1.68$  mg EC/g, respectively. The presence of the extract in the culture medium effectively inhibited the growth of *S. aureus* for 6 hours, but had no effect on the *K. nuemoniae*. These results suggest that further investigation into this species is necessary to demonstrate its potential.

**Key words:** *Guazuma ulmifolia*, *Staphylococcus aureus*, *Klepsiella nuemoniae*, *natural products*

### INTRODUCCIÓN

*Guazuma ulmifolia*, conocido comúnmente como guácimo, guácima, guásimo, guásima, caulote, matumba o majahua, entre otros; es un árbol perteneciente a la familia *Malvaceae* subfamilia *Sterculioideae*, nativo de las zonas tropicales y subtropicales de América (Lopes *et al.*, 2019). Se caracteriza por ser de porte entre pequeño a mediano, entre 5 a 10 m de alto, con un tronco entre 30 a 50 cm de diámetro, ramificado, de copa redonda y extendida con hojas simples, alternas de peciolo cortos, ovaladas y aserradas. Sus flores

pequeñas y amarillas, se agrupan inflorescencias axilares en la base de las hojas. Sus frutos son cápsulas subglobosa o elipsoidea, negro-purpúrea al madurar y con la superficie muricada, con numerosas semillas pequeñas y duras (Giraldo, 2013; Lopes *et al.*, 2019).

Este árbol crece bien en zonas cálidas con temperaturas promedios de 24°C, altitudes que oscilan desde 0 hasta 1200 msnm, precipitaciones entre de 700 a 1500 mm al año y con suelos de texturas entre livianas y pesadas, con buen drenaje, no pedregosos y pH superior a 5.5. Debido a su gran adaptación a condiciones edafoclimáticas adversas, este árbol es un recurso muy utilizado en el campo a nivel de los sistemas de producción silvopastoriles como forraje (Giraldo, 2013).

En los sistemas de producción agropecuarios, los árboles y arbustos forrajeros son multipropósitos. Es por ello, que en Venezuela así como en otros países del continente, tales como México, Colombia y Brasil, es común que el guácimo esté presente en las fincas y se aproveche, no sólo para brindar sombra al ganado, sino también para emplear la madera de sus tallos en la elaboración de cercas, construcciones rurales, cajas de embalaje y carbón; y sus hojas y frutos para la alimentación animal (Pizzani *et al.*, 2006; Villa-Herrera *et al.*, 2009).

Esta planta también tiene gran importancia etnomedicinal, ya que empíricamente sus hojas y raíces han sido empleadas en remedios caseros para tratar fiebres, disentería, diarreas, inflamaciones, tratamiento de próstata, estimulante uterino, alopecia y otras enfermedades (Patil y Biradar, 2013). Investigaciones científicas han demostrado efectos farmacológicos tales como hipoglicemiante, antiinflamatorio, anticolinesterásico, antiobesidad, antiséptico, cicatrizante y actividad antiparasítica y antimicrobiana (Lopes *et al.*, 2019).

Por su parte estudios “*in vitro*” han evidenciado que muchas de estas propiedades farmacológicas de *G. ulmifolia*, pueden atribuirse a la presencia de compuestos bioactivos. Específicamente, el efecto antimicrobiano de extractos elaborados a partir de las hojas y corteza de este árbol, han sido relacionados con la presencia de compuestos fenólicos tales como flavonoides y taninos, capaces de inhibir el crecimiento microbiano (Violante *et al.*, 2012; Boligon *et al.*, 2013, Cates *et al.*, 2013, Patil y Biradar, 2013).

En este sentido la acción antibacteriana de los extractos naturales es una fuente importante para el descubrimiento de nuevas moléculas activas, las cuales son de relevancia y una posible solución ante la problemática de la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales.

En referencia a lo anterior se denomina resistencia bacteriana, a todos los mecanismos que pueden ejercer las bacterias para asegurar su subsistencia y protección ante la presencia de los antibióticos. En general, las bacterias pueden tener dos tipos de resistencia: a) natural o intrínseca a algunos antibióticos, la misma está presente antes de exponerse al agente terapéutico; b) adquirida, ya que genera los mecanismos después de la exposición sucesiva al antibiótico. Es un problema de salud pública, que incrementa indicadores de riesgo tales como la mortalidad y morbilidad, además de incidir significativamente en el aumento de los costos hospitalarios y de tratamiento (Echeverría e Iglesias, 2003).

Es por ello, que en el presente estudio se planteó como objetivo, elaborar y caracterizar un extracto del fruto de *G. ulmifolia* y probar su efecto antimicrobiano sobre cepas certificadas de *S. aureus* y *K. neumoniae*. Con el propósito de evaluar su potencial como fuente alternativa para la elaboración de productos antimicrobianos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Material vegetal***

Los frutos de guácimo fueron colectados de los árboles presentes en las áreas verdes de la Universidad de Carabobo-Sede Aragua (Maracay-Venezuela).

### ***Bacterias***

Se trabajó con la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y una *Klebsiella neumoniae* ATCC 700603, donadas por el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”, Caracas-Venezuela.

### ***Elaboración de Extracto***

Los frutos recolectados fueron sometidos a secado en estufa a 60°C durante 48 horas y sometidos a molienda. Para obtener el extracto hidroalcohólico del fruto de *G. ulmifolia*, se siguió el procedimiento descrito por Noguera-Machado *et al.* (2017).

#### ***Determinación de fenoles totales***

La determinación de fenoles totales presentes en el extracto, se realizó siguiendo la metodología empleada por Noguera-Machado *et al.* (2019). Los datos obtenidos de las cinco muestras fueron promediados y se calculó la desviación estándar. El resultado fue expresado como mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto (mg GAE/g de extracto).

#### ***Determinación de flavonoides totales***

La determinación de los flavonoides totales del extracto se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Pacheco *et al.* (2018). Los resultados fueron expresados como mg de Catequina Equivalente por g de extracto (mg CE/g de extracto).

#### ***Actividad Antibacteriana***

Se evaluó el efecto que tuvo la presencia del extracto del fruto de *G. ulmifolia* en el medio de cultivo, sobre el crecimiento de las cepas de *S. aureus* y *K. neumoniae*. El procedimiento fue similar al establecido por Noguera-Machado *et al.* (2017), siguiendo la cinética del crecimiento bacteriano por turbidimetría, durante un período de 6 horas (360 minutos). Cumplido ese tiempo se tomó el último valor de absorbancia, para calcular el porcentaje de inhibición del extracto sobre el crecimiento microbiano. Los cultivos se realizaron por triplicado y se le calculó la media y desviación estándar al porcentaje de inhibición. Para el cálculo se usó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Abs}_{600\text{nm}} \text{ del extracto}}{\text{Abs}_{600\text{nm}} \text{ del control}} \times 100 \quad (1)$$

Para determinar el efecto bactericida se empleó la metodología de Kirby-Bauer (Ramírez *et al.* 2009) y se enfrentaron las diferentes concentraciones del extracto de *G.*

*ulmifolia* frente a las dos bacterias usando el medio Muller-Hinton y un periodo de incubación de 24 h/37°C. Este ensayo se hizo por duplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de la extracción se obtuvo un aceite color marrón oscuro con una fuerte fragancia frutal semejante a la del fruto, muy agradable al olfato.

### *Contenido de fenoles totales y flavonoides*

Los resultados obtenidos después del análisis fitoquímico se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 1.** Caracterización del extracto etanólico de *Guazuma ulmifolia*.

Muestra	Polifenoles totales mg GAE/g de extracto X±DE	Flavonoides mg de Catequina Eqv /100 g X±DE
Extracto	15,34 ± 1,90	7,64 ± 1,68

X= Media

DE= Desviación estándar

La comparación de estos resultados con trabajos preliminares referentes a la caracterización fitoquímica de esta especie, no fue posible; porque en la literatura la mayoría de los resultados descritos son cualitativos. Tal como es el caso, del estudio realizado por Patil y Biradar (2013), quienes determinaron cualitativamente la presencia de flavonoides totales, así como de otros compuestos como taninos, saponinas, terpenoides y alcaloides, en el fruto de *G. ulmifolia*.

Sólo en la investigación realizada por Pizzani *et al.* (2006), se describen datos cuantitativos relacionados con el contenido de fenoles totales (0,86±0,00) y otros compuestos bioactivos del fruto. Pero las unidades no fueron claramente definidas, por lo que no se pudo establecer comparaciones con los resultados obtenidos en este trabajo; sin embargo, es posible observar las distintas especies de plantas forrajeras analizadas por los autores. La

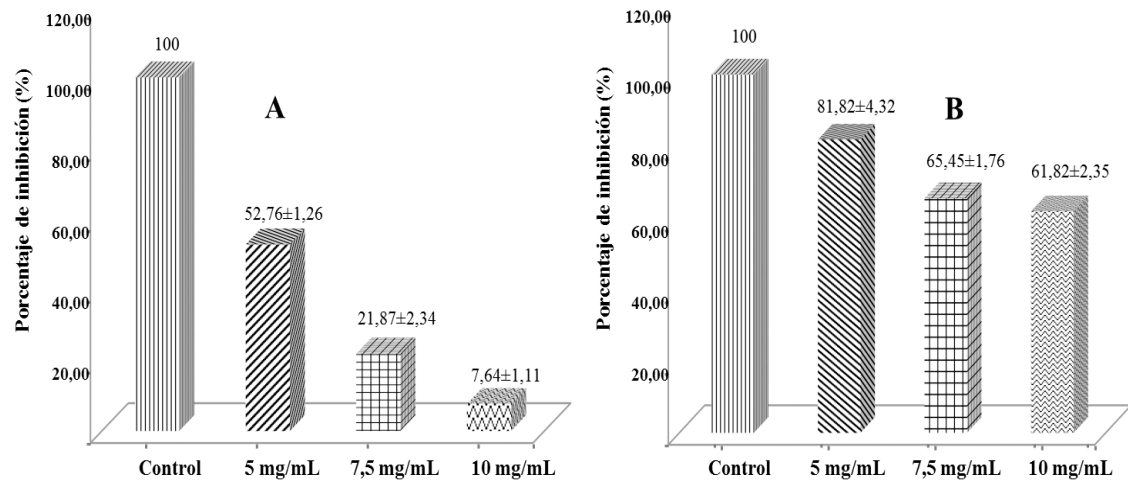
concentración de fenoles totales en los frutos de *G. ulmifolia* fue significativamente más baja que la de *Caesalpinia granadillo* ( $9,81 \pm 0,10$ ) y *Acacia macracantha* ( $6,21 \pm 0,99$ ).

Por otra parte, si se compara el contenido de fenoles totales con el de otros extractos, que han demostrado actividad antibacteriana contra *S. aureus*, como es el caso del elaborado a partir de semillas de *Passiflora edulis* por Noguera-Machado *et al.* (2019), el contenido de fenoles totales es bajo, aproximadamente 4,5 veces menor ( $15,34$  vs  $68,72$  mg GAE/g de extracto).

### ***Actividad Antibacteriana***

Las dos bacterias presentaron un comportamiento diferente frente al extracto de *G. ulmifolia*. Se observa un efecto dosis dependiente para la cepa *S. aureus* ATCC 25923 siendo la máxima concentración quien mostró un mayor efecto inhibitorio ( $7,64 \pm 1,11$ ), mientras que para la cepa de *K. neumoniae* ATCC el efecto no fue muy marcado y solo logró alcanzar un máximo de inhibición de  $61,82 \pm 2,35$  para la máxima concentración ensayada que fue de  $10\text{mg/mL}$ , durante las 6 horas que duró el ensayo. (Figura 1).

Esta diferencia debe estar asociada a mecanismos naturales de defensa de los diferentes tipos de bacterias mientras que el *S. aureus* es un gram positivo, la *K. neumoniae* es gram negativo



**Figura 1.** Porcentaje de inhibición de las bacterias expuestas a la presencia del extracto de *G. ulmifolia* por 6h de cultivo. (A) Cepa de *S. aureus* ATCC 25923; (B) Cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603.

El resultado inhibitorio mostrado por el *S. aureus*, puede estar asociado con los compuestos bioactivos, específicamente los fenólicos presentes en el extracto. Según Castro-Montoya *et al.*, 2015 y Sabogal-Palma *et al.*, 2016, los polifenoles tienen la capacidad de formar complejos con las proteínas extracelulares solubles, provocando la inactivación de enzimas y proteínas de transporte a nivel de las paredes celulares, afectando la permeabilidad y bloqueando el paso de nutrientes a las células.

En lo que respecta al efecto Bactericida, ninguna de las bacterias mostró inhibición en las placas después de 24h de incubación (resultados no mostrados), lo que demuestra que los metabolitos presentes en el extracto el caso de la *S. aureus*, solo retrasan el crecimiento (efecto bacteriostático) por un tiempo determinado, pero luego son superados por la bacteria.

## CONCLUSIONES



El contenido de fenoles totales y flavonoides del extracto del fruto de *G. ulmifolia* fue de  $15,34 \pm 1,9$  mg GAE/g y  $7,34 \pm 1,68$  mg CE/g de extracto.

El extracto mostró un efecto inhibitorio dosis dependiente solo sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 25923 durante 6 horas en medio líquido, pero no tuvo el mismo efecto durante la incubación a 24 horas en placas.

El extracto no mostró un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *K. neumoniae* ATCC 700603 durante 6 horas en medio líquido, ni durante la incubación a 24 horas en placas.

Aun cuando el extracto de *G. ulmifolia* mostró un efecto bacteriostático sobre el *S. aureus*, se recomienda hacer más estudios, utilizando otras técnicas de extracción, con otros solventes y otros géneros bacterianos, para conocer todo el potencial de los componentes de la semilla.

En vista de que el extracto posee un olor frutal muy agradable, contiene antioxidantes y un efecto bacteriostático sobre el *S. aureus* pudiera ser considerado como un futuro componente natural en algún producto de uso cosmético.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Boligon, A., Feltrin, A., Athayde, M. 2013. Determination of chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Guzuma ulmifolia* essential oil. American Journal of Essential Oils and Natural Products, 1(1):23-27.
- Castro-Montoya, Jesús M.; Rangel-Peraza, Jesús G.; Piña-Hernández, Claribel J.; Mora-Rochín, Sarahid y Rochín-Medina, Jesús J. 2015. Actividad antioxidante de compuestos fenólicos en semillas de ajonjolí y su efecto sobre el crecimiento bacteriano. Revista Iberoamericana de Ciencias. 2(4):63-70
- Cates, R., Prestwich, B., Innes, A., Rowe, M., Stanley, M., Williams, S., Thompson, A., McDonald, S., Cates, S., Shrestha, G., Soria, J., Espinoza, L., Ardón, C., Galvez, B., Díaz, M., Coronado, F., García, J., Arbizú, D., Martínez, J. 2013. Evaluation of the activity of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and microbes. Journal Medicinal of Plants Research, 7(35): 2616-2627.

- Echeverría, J., Iglesias, D. 2003. Estafilococo meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Rev Med Hered*, 14(4):195-203.
- Giraldo, A. Potencial de la arborea guácimo (*Guazuma ulmifolia*), como componente forrajero en sistemas silvopastoriles. *Agroforestería para la Producción Animal en Latinoamérica*, 201-215.
- Lopes, E., Santos, S., Cezimbra, M., Marques, K., Martins, M., Nobre, G. 2019. Biological activity of *Guazuma ulmifolia* Lamark.- systematic review. *Revista Desafíos*, 6(3):55-65. DOI:<http://dx.doi.org/10.20873/uftv6-6006>.
- Noguera-Machado, N., Ojeda, L., Jiménez, M., Kremisisky, M. 2017. Evaluación del potencial antibacteriano de extractos de semillas de cinco frutas tropicales. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 8(1):033-044.
- Noguera-Machado, N., Ojeda, L., Jiménez, M., Kremisisky, M., Velásquez, I., Pacheco, F. 2019. Evaluación del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Passiflora edulis* y su efecto sobre el crecimiento de *Escherichia coli* (ATCC 25922). *Saber, Universidad de Oriente Venezuela*, 31:248-255.
- Pacheco-Coello F., Ramirez-Azuaje D., Pinto-Catari I, Peraza-Marrero M., Orozco-Vargas C. 2018. *Hibiscus sabdariffa* L. Una comparación de compuestos fenólicos totales y flavonoides en cálices y hoja. *Vitae*, 76:44-55.
- Patil, J., Biradar, S. 2013. Pharmacognostic study of *Guazuma ulmifolia*. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(4):130-131.
- Pizzani, P., Matute, I., Martino, G., Arias, A., Godoy, S., Pereira, L., Palma, J., Rengifo, M. 2006. Composición fitoquímica y nutricional de algunos frutos de árboles de interés forrajero de los llanos centrales de Venezuela. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 47(2):105-113.
- Ramírez, Luz Stella y Castaño, Darwin Marín. 2009. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. XV(42):263-268.
- Sabogal-Palma, Angie C.; Chávez-Marín, Jacqueline; Oliveros-Gómez, Diego F.; Murillo-Perea, Elizabeth y MendezArteaga Jonh. 2016. Funcionalidades biológicas de *Passiflora maliformes* del sur macizo colombiano. *Bioagro*. 28(1):3- 12.
- Villa-Herrera, A., Nava-Tablada, M., López-Ortiz, S., Vargas-López, S., Ortega-Jimenez, E., Gallardo, F. 2009. Utilización del guácimo (*Guazuma ulmifolia* Lam.) como fuente de forraje en la ganadería bovina extensiva del trópico mexicano. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10: 253 – 261.

Violante, I., Hamerski, L., Garcez, W., Batista, A., Chang, M., Pott, V., Garcez, F. 2011. Atividade antimicrobiana de algumas plantas medicinais do cerrado da Região Centro-Oeste do Brasil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4):1302-1308.