

## Actividad antimicrobiana y antioxidante de extractos etanólicos de hoja de *Arbutus xalapensis* Kunt, *Mimosa malacophylla* Gray y *Teucrium cubense* Jacquin

Pérez Narváez Oscar Alberto, Leos Rivas Catalina, Rivas Morales Catalina, Villarreal Treviño Licet, Barrón González María Porfiria, Sánchez García Eduardo\*

Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Química Analítica. Av. Los Rectores s/n, San Nicolás de los Garza, Nuevo León. C.P. 66455. México.

\* Autor para correspondencia: esgarcia26@yahoo.com

### Recibido:

15/julio/2019

### Aceptado:

07/noviembre/2019

### Palabras clave:

Extractos, antimicrobiano, antioxidante

### Keywords:

Extracts, antimicrobial, antioxidant.

### RESUMEN

Se ha reportado un incremento en la emergencia de microorganismos resistentes a antibióticos, por lo que se busca desarrollar terapias para tratar dichas enfermedades. A este respecto se destaca el uso de productos naturales con propiedades antimicrobianas y antioxidantes. En la presente investigación se obtuvieron extractos etanólicos de hoja de *Arbutus xalapensis*, *Mimosa malacophylla* y *Teucrium cubense* las cuales fueron colectadas en la Localidad de Potrero Redondo, Santiago, Nuevo León, México para la determinación de dichas actividades. Estos extractos fueron probados contra cepas de importancia médica siendo la hoja de *A. xalapensis* quien manifestó la mayor actividad antimicrobiana (CMB =  $2.9 \pm 0.5$  mg mL<sup>-1</sup>) en contra de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 que fue la cepa más sensible en el estudio. Además, este extracto obtuvo la mayor actividad antioxidante mediante los métodos de DPPH ( $1,206.6 \pm 68.6$   $\mu$ moles ET g<sup>-1</sup>) y ABTS\* ( $1,750.7 \pm 110.1$   $\mu$ moles ET g<sup>-1</sup>).

### ABSTRACT

There has been a dramatic increase in the emergence of antibiotic resistant bacterial strains, because indiscriminate use of antibiotics. Therefore, it is vital to develop new therapies to treat these resistant pathogens. In recent years, interest in natural products has increased due to their biological activities, including, antimicrobial and antioxidant properties. In the present investigation, ethanolic leaf extracts of *Arbutus xalapensis*, *Mimosa malacophylla* and *Teucrium cubense* were obtained from plants collected in Potrero Redondo locality, Santiago Nuevo León, Mexico for determining the biological activities mentioned above. Extracts were tested against strains of medical importance being the *A. xalapensis* stem which had the best antimicrobial activity (CMB =  $2.9 \pm 0.5$  mg mL<sup>-1</sup>) against *Staphylococcus aureus*. Furthermore, this extract obtained the highest antioxidant activity by DPPH assay ( $1,206.6 \pm 68.6$   $\mu$ mol ET g<sup>-1</sup>) and ABTS\* ( $1,750.7 \pm 110.1$   $\mu$ mol ET g<sup>-1</sup>).

## Introducción

En recientes décadas se ha incrementado el interés hacia los productos naturales y sus posibles usos en la industria farmacéutica (Contreras, 2015) debido a la resistencia que diversos microorganismos han presentado hacia los antibióticos, lo cual hace difícil combatir las enfermedades que causan (Weckesser et al., 2007) aparte del costo y de los efectos secundarios generados por los tratamientos convencionales (Radhapiyari, 2017).

Por otro lado, los antioxidantes que se encuentran en las plantas tienen la propiedad de participar en el control del estrés oxidativo que afecta a sistemas biológicos que han sido sometidos a una prolongada exposición a agentes oxidantes como: la radiación, la alimentación, diversos contaminantes, drogas, toxinas, productos del metabolismo, y procesos isquémicos entre otros. Estudios e investigadores están de acuerdo en que los efectos anticancerosos de las plantas se debe parcialmente a su capacidad de contrarrestar, reducir y también reparar el daño causado por el estrés oxidativo y la inflamación (Kohen y Nyska 2002; Contreras 2015).

Los efectos benéficos mencionados anteriormente pueden atribuirse a la presencia de compuestos químicos biológicamente activos llamados fitoquímicos. Muchos de los metabolitos secundarios obtenidos para su estudio no presentan efectos secundarios sobre el organismo y en la mayoría de los casos no son tóxicos. Es por esto y por la gran diversidad de plantas con las que cuenta México, que los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y antioxidante son un campo relevante de investigación (García et al., 2010).

En el presente estudio se determinaron las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los extractos etanólicos de hoja de las plantas: *Arbutus xalapensis*, cuyo uso tradicional de sus ramas ha sido empleada para tratar problemas de circulación, cardiovasculares, fiebre y enfermedades gastrointestinales (Dimayuga et al., 1998; Sharma et al., 2017); *Mimosa malacophylla*, utilizada como diurética y para cálculos renales (Alvarado et al., 2010); y *Teucrium cubense*, utilizada extensivamente en la medicina tradicional mexicana para tratar diabetes tipo 2 (Román et al. 1991), afecciones de garganta, edemas e hinchazón de piernas (Godínez y Valpato, 2008), cólicos, amibiasis y otros trastornos estomacales (Alvarado et al., 2010).

## Metodología

### Material vegetal

Las plantas *A. xalapensis* (Ax), *M. malacophylla* (Mm) y *T. cubense* (Tc) fueron colectadas en la Localidad de Potrero Redondo, Santiago, N. L., México [25.388239,-100.143886]. Parte de los especímenes colectados fueron colocados en prensas botánicas para ser depositados en el herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, para su posterior identificación. Otra parte de las plantas se dejaron secar a temperatura ambiente y a la sombra, posteriormente fueron separadas las hojas de cada una de las plantas para después ser trituradas y pulverizadas en una licuadora; por último, fueron almacenadas en sobres de papel manila, a temperatura ambiente en un lugar fresco y seco, hasta su utilización.

### Extracción por maceración etanólica

Para la obtención de los extractos, se pesaron 100 g de la hoja seca y triturada en un matraz Erlenmeyer, utilizando una balanza (NIMBUS® NBL-214e), a los cuales se le agregaron 500 mL de etanol. La extracción del material vegetal se llevó a cabo por maceración en agitación constante a temperatura ambiente por un periodo de 24 h. Posteriormente, el extracto obtenido se filtró con la ayuda de papel filtro (WHATMAN No.1). Después se procedió a evaporar el solvente a presión reducida utilizando un rotavapor (YAMATO BM 100). Finalmente, el extracto seco se almacenó en frascos de vidrio resguardados de la luz hasta su utilización y el solvente recuperado fue utilizado para realizar una nueva extracción de donde fue utilizado, esto se realizó dos veces más.

### Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas que se utilizaron en este estudio fueron aislados clínicos del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León: *Pseudomonas aeruginosa* 12940 y *Stenotrophomonas maltophilia* 17-0174, y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Estas se mantuvieron en tubos con Agar Mueller-Hinton (MH; DIFCO) a 4°C. Para la activación de cada una de las cepas se tomó una asada del medio de reserva y se sembró en 5 mL de caldo MH. Los tubos activados fueron incubados en una incubadora (FELISA® FE-291) durante 18 h a 37 °C para *S. aureus* 29213 y *P. aeruginosa* 12940, y *S. maltophilia* por 48 h a 35 °C en una incubadora (FELISA® FE-291).

## Actividad antimicrobiana

### Método de difusión en pozo

El método de difusión en pozo en agar (Das et al., 2010), consistió en sembrar por extensión con un asa de Driglasky, las cepas obtenidas de lesiones dermatológicas previamente activadas en caldo MH, sobre placas de Petri con agar MH. Posteriormente se realizaron pozos en el agar, mediante tubo estéril invertido ( $\emptyset = 8$  mm de diámetro) y en cada pozo se agregaron 100  $\mu$ L de los extractos a evaluar; como blanco se utilizó etanol absoluto que fue el solvente en el cual fueron resuspendidos los extractos. Este ensayo se realizó por triplicado en tres ocasiones.

### Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida

Se utilizó el método de dilución en microplaca de 96 pozos, donde fueron añadidas las diferentes concentraciones de los extractos, así como los volúmenes correspondientes de caldo MH inoculado al 1 % para cada bacteria. Como controles se utilizaron: caldo MH, caldo MH con el microorganismo y caldo MH con el microorganismo y la cantidad de etanol absoluto correspondiente a cada una de las concentraciones evaluadas. La microplaca fue incubada a 37 °C por 24 h para *P. aeruginosa* 12940 y *S. aureus* 29213, y por 48 h a 35 °C para *S. maltophilia* 17-0174. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fue interpretada como la concentración en la cual se inhibe el crecimiento visible de la bacteria.

Para determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) se tomaron 20  $\mu$ L de cada pozo donde no se observó crecimiento aparente, los cuales fueron sembrados mediante la técnica de goteo de Miles y Mishra, en placas Petri con agar MH, debidamente rotuladas con la concentración correspondiente. Las placas fueron incubadas de acuerdo con los requerimientos descritos anteriormente para cada bacteria. La CMB fue definida como la concentración de los extractos que eliminó al 99.9 % de los microorganismos evaluados.

## Actividad antioxidante

### Técnica de DPPH

Para la medición antioxidante se utilizó el método de 1,1-difenil 2-picrilhidrazil (DPPH) con ligeras modificaciones. Se prepararon soluciones de trabajo de DPPH (0.13 mM) y Trolox (1 mM). Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de penumbra con muestras frescas. Las curvas de calibración se generaron con las

soluciones previamente preparadas, de 0 a 250  $\mu$ L de la solución diluida de Trolox con metanol absoluto a un volumen final de 1 mL, en tubos Eppendorf, posteriormente se agregó la solución DPPH ajustado a  $1 \pm 0.1$  de absorbancia a 515 nm. Para las muestras biológicas, se colocaron diferentes concentraciones de los extractos en tubos Eppendorf completando con metanol absoluto, así como la adición de la solución de DPPH. Posteriormente los tubos se taparon y mezclaron por rotación para luego ser incubados durante 20 min en oscuridad total a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, todos los tubos fueron leídos a 515 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic GENESIS 20) calibrado a cero de absorbancia con metanol absoluto. Tanto las curvas de calibración como el análisis de las muestras se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos fueron graficados para obtener la ecuación de la recta " $y = mx + b$ " con la que se calculó la cantidad (nmol) de equivalentes de Trolox de la alícuota de la muestra problema. Se reportó la capacidad antioxidante equivalente a Trolox (TEAC) como  $\mu$ moles equivalentes de Trolox de la muestra por gramo de peso seco ( $\mu$ moles ET  $g^{-1}$ ) (Blois, 1958; Brand et al., 1995; Frankel y Meyer, 2000; Fukumoto y Mazza, 2000).

### Método de ABTS

Adicionalmente, la determinación de la actividad antioxidante se realizó con el método 2,2-Azino-bi-3-etilbenzotiazolino-6-ácido sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>), descrito por Re et al., 1999, con ligeras modificaciones. La solución de ABTS<sup>•+</sup> fue preparada en partes iguales (1:1) de dos soluciones previamente elaboradas en agua destilada: ABTS (7 mM) y solución de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ) a 2.45 mM. La mezcla se dejó reposar por 16 h en oscuridad a temperatura ambiente. Además, se preparó una solución diluida de Trolox (1 mM). El procedimiento se llevó a cabo en condiciones de penumbra, todo el mismo día y en muestras frescas. Se preparó la solución del radical catiónico con metanol absoluto (1:50 v/v) y se ajustó a una absorbancia de  $1 \pm 0.1$  a 734 nm. Se generaron curvas de calibración colocando la solución de trabajo previamente preparadas, de 0 a 350  $\mu$ L de la solución diluida de Trolox con metanol absoluto a un volumen final de 1.5 mL en tubos Eppendorf, posteriormente se agregó la solución ABTS<sup>•+</sup> a cada tubo los cuales fueron tapados y mezclados por rotación. Para las muestras biológicas se agregó el reactivo previamente preparado, los cuales se mezclaron con las diferentes concentraciones de los extractos activos obtenidos. Tanto las curvas de calibración como el análisis de las muestras se realizaron por triplicado. Los tubos fueron incubados durante 30 min, protegidos y en oscuridad. Transcurrido este tiempo fueron leídos a

734 nm en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic GENESIS 20) habiendo calibrado a cero de absorbancia con metanol absoluto. Tanto las curvas de calibración como el análisis de las muestras se realizaron por triplicado. Los datos obtenidos fueron graficados y procesados de la forma previamente descrita, reportando el resultado final del análisis como  $\mu\text{moles ET g}^{-1}$  (Re et al., 1999; Tawaha et al., 2007).

## Resultados y discusión

### Actividad antimicrobiana

#### Difusión en pozo

En la prueba de difusión del pozo en agar los resultados muestran que los extractos probados presentaron actividad contra las bacterias seleccionadas de importancia médica, obteniendo halos de inhibición de entre 10.8 mm y 16.4 mm, dependiendo del extracto y de la cepa.

El extracto que presentó mayor zona de inhibición (IZ) contra *S. aureus* 29213 y *P. aeruginosa* 12940 fue el de hoja de *A. xalapensis* (Ax-h) con  $IZ = 16.4 \pm 0.5$  mm y  $16.3 \pm 0.5$  mm respectivamente, y para *S. maltophilia* 17-0174 fue el de hoja de *T. cubense* (Tc-h) con  $IZ = 13.1 \pm 1.0$  mm (Tabla 1).

**Tabla 1.** Actividad antimicrobiana representada en halos de inhibición (mm) generados por los extractos obtenidos contra las bacteria de estudio.

Extracto	<i>S. aureus</i> 29213	<i>P. aeruginosa</i> 12940	<i>S. maltophilia</i> 17-0174
Ax-h	$16.4 \pm 0.5$	$16.3 \pm 0.5$	$12.4 \pm 0.5$
Mm-h	$12.6 \pm 0.5$	$10.8 \pm 1.0^*$	$12.3 \pm 0.6$
Tc-h	$13.3 \pm 0.6$	$11.7 \pm 1.4$	$13.1 \pm 1.0$

\* Promedio  $\pm$  DS.

En un estudio, Orak et al., 2011 mediante la técnica de difusión en pozo, observaron que el extracto acuoso de *Arbutus unedo* generó halos de inhibición similares a los reportados para *A. xalapensis* en un rango entre 10.5 mm a 21.1 mm, siendo poco mayor (1.28 veces) éste último resultado al observado en el presente estudio contra estos estafilococos pero no observaron actividad contra Gram negativas como *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*; sin embargo, Jurica et al., 2017 reportaron que el extracto acuoso y metanólico de la hoja *A. unedo* mostraron halos de inhibición contra *P. aeruginosa* de 10 mm y de entre 12.4 mm y 14 mm respectivamente, siendo poco menores a los observados en este estudio contra *P. aeruginosa* 12940. En lo que respecta a la planta *T. cubense*, nuestros resultados son comparables con los que obtuvieron Vlase et al., 2014 con el extracto etanólico

de *Teucrium chamaedrys* (20 mm) y con los reportados por Chedia et al., 2013 con el extracto metanólico de *Teucrium polium* contra *P. aeruginosa* (15-16 mm) y *S. aureus* (10-13 mm) mediante el método de difusión en papel filtro. Así mismo, son comparables con los reportados por Sarac y Ugur 2007 donde probaron varios extractos etanólicos del género *Teucrium* tales como *T. chamaedrys*, *T. polium*, *T. divaricatum* spp. *villosum* mediante la técnica de difusión en papel filtro contra *S. maltophilia* ya que ninguno tuvo actividad contra esta Gram negativa, aunque mediante la misma técnica, Zampini et al., 2005 utilizando el extracto etanólico de *Zuccagnia punctata* de la familia Fabaceae, a la que pertenece *M. malacophylla*, si observaron actividad antimicrobiana contra *S. maltophilia* obteniendo halos de inhibición entre 15 mm a 25 mm. En el caso de la planta *M. malacophylla* no se han reportado estudios previos pese a que es utilizada la parte aérea (hojas) como medicinal (Alvarado et al., 2010). La actividad antimicrobiana del género *Mimosa* ha sido reportada por Tamilarasi y Ananthi en 2012, donde evaluaron la actividad de *Mimosa pudica* mediante el método de difusión en pozo reportando halos de inhibición en un intervalo entre 13 mm y 17 mm utilizando el extracto etanólico de su hoja contra *P. aeruginosa*; estos resultados son mayores a los reportados contra *P. aeruginosa* 12940 utilizando el extracto de hoja de *M. malacophylla* en este estudio.

#### Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida

Los resultados obtenidos del ensayo de CMI/CMB indican que el extracto Ax-h fue el que presentó la mayor actividad antimicrobiana con  $CMI = 2.6 \pm 0.5$  mg mL<sup>-1</sup> y  $CMB = 2.6 \pm 0.3$  mg mL<sup>-1</sup> contra *S. aureus*, seguido del extracto Tc-h (Tabla 2 y 3).

**Tabla 2.** CMI (mg mL<sup>-1</sup>) de los extractos de hoja de *A. xalapensis*, *M. malacophylla* y *T. cubense* contra bacterias de relevancia clínica.

Extracto*	<i>S. aureus</i> 29213	<i>P. aeruginosa</i> 12940	<i>S. maltophilia</i> 17-0174
Ax-H <sup>abc</sup>	$2.6 \pm 0.5$	$>16 \pm 0.0$	$>16 \pm 0.0$
Mm-h <sup>d</sup>	$>30 \pm 0.0$	$>30 \pm 0.0$	$>30 \pm 0.0$
Tc-h <sup>bc</sup>	$7.3 \pm 0.3$	$>16 \pm 0.0$	$>16 \pm 0.0$

\*Promedio  $\pm$  DS. ANOVA con Prueba de Tukey. Diferencia significativa  $p \leq 0.05$ . Promedio del inóculo inicial y final fue de  $5.4 \times 10^8$  y  $9.7 \times 10^{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> respectivamente.

En nuestro estudio, la cepa más sensible a los extractos fue *S. aureus* 29213 obteniendo intervalos de CMI de 2.6 mg mL<sup>-1</sup> a  $>30$  mg mL<sup>-1</sup> y de CMB de 2.9 mg mL<sup>-1</sup> a  $>30$  mg mL<sup>-1</sup> de acuerdo con el extracto probado. Cabe mencionar que no se determinó la CMI/CMB de las cepas

*P. aeruginosa* 12940 y *S. maltophilia* 17-0174 debido a que la concentración requerida para inhibir a dichos microorganismos superó los 16 mg mL<sup>-1</sup> y 30 mg mL<sup>-1</sup> de acuerdo con la cepa probada.

Resultados similares de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *A. unedo* fueron reportados por Bouyahya et al., 2016, quienes obtuvieron CMI/CMB de 1 mg mL<sup>-1</sup> y 4 mg mL<sup>-1</sup> contra *S. aureus* y 8 mg mL<sup>-1</sup> y >8 mg mL<sup>-1</sup> contra *P. aeruginosa*; por su parte, Chedia et al., 2013, utilizando el extracto metanólico de *T. polium* obtuvieron CMI/CMB de 25 mg/mL y 50 mg/mL contra *S. aureus*, siendo mayores a las reportadas en nuestro trabajo; sin embargo, similares contra *P. aeruginosa* con valores de 12.5 mg/mL y 25 mg/mL respectivamente.

**Tabla 3.** CMB (mg mL<sup>-1</sup>) de los extractos contra bacterias de importancia médica.

Extracto*	<i>S. aureus</i> 29213	<i>P. aeruginosa</i> 12940	<i>S. maltophilia</i> 17-0174
Ax-h <sup>abc</sup>	2.9 ± 0.5	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0
Mm-h <sup>d</sup>	>30 ± 0.0	>30 ± 0.0	>30 ± 0.0
Tc-h <sup>bc</sup>	7.4 ± 0.4	>16 ± 0.0	>16 ± 0.0

\*Promedio ± DS. ANOVA con Prueba de Tukey. Diferencia significativa p≤0.05. Promedio del inóculo inicial y final fue de 5.4 x 10<sup>8</sup> y 9.7 x 10<sup>10</sup> UFC mL<sup>-1</sup> respectivamente.

Con respecto a los resultados obtenidos en esta investigación, la poca actividad de los extractos contra *P. aeruginosa* 12940 y *S. maltophilia* 17-0174 seguramente es debida al tipo de envoltura celular que poseen dichos microorganismos. Estas bacterias pertenecen al grupo de Gram negativas y tienen como límite una membrana externa que les confiere resistencia a la mayoría de los compuestos antimicrobianos tanto de origen químico/sintético como de origen natural; ésta estructura rodea la pared celular y restringe la difusión de compuestos hidrófobos a través del lipopolisacárido, es decir, la hace impermeable a los solutos lipófilos. También poseen unas proteínas llamadas porinas que producen poros o canales inespecíficos a través de la membrana externa por lo que constituyen una barrera selectiva ya que permiten el paso a solutos hidrofílicos <600 daltons (Nikaido y Vaara 1985). Además, presentan otra estructura denominada espacio periplásmico la cual contiene enzimas que son capaces de descomponer moléculas extrañas introducidas desde el exterior por lo que las hace más insensibles al efecto antimicrobiano (Duffy y Power 2001; Laciari et al., 2009; Bouyahya et al., 2016).

Por otra parte, concordando con Akrouit et al., 2010 y Chedia et al., 2013 existen bacterias que muestran zonas de inhibición importantes por el método de difusión pero no siempre son las que presentan CMI y CMB más bajos,

como se observó en el caso de *P. aeruginosa* y *S. maltophilia*, en el presente estudio; esto puede ser debido a la solubilidad del extracto, el intervalo de difusión en agar, la evaporación, la dosis, entre otros.

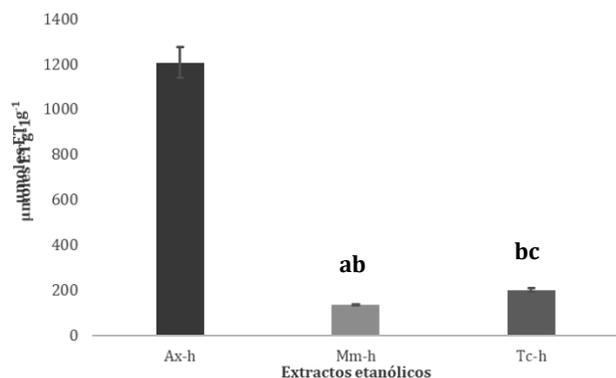
Es importante mencionar por lo anterior que el efecto antimicrobiano reportado en esta investigación puede deberse a la presencia de diferentes tipos de compuestos fenólicos. Se sabe que una amplia variedad de fenoles y flavonoides poseen propiedades antimicrobianas y, en muchos casos, esta actividad se debe a la presencia de constituyentes activos (Bouyahya et al., 2016) como los polifenoles. Las actividades biológicas de estos componentes están relacionadas con las estructuras de las moléculas; por sus grupos hidroxilo o por los anillos fenólicos que contienen, los compuestos fenólicos tienen la capacidad de unirse con las proteínas y la membrana bacteriana para formar complejos (Zongo et al., 2011).

### Capacidad antioxidante

En los últimos años se ha adoptado una amplia variedad de ensayos espectrofotométricos para medir la capacidad antioxidante de los alimentos, muestras biológicas y extractos vegetales. Usualmente, los ensayos antioxidantes *in vitro* utilizan un captador de radicales libres y son relativamente sencillos de realizar. Entre los ensayos de captación de radicales libres, el método DPPH es el más rápido, es simple (no incluye muchos pasos) y de menor costo en comparación con otros modelos. Por otro lado, el ensayo de decoloración ABTS<sup>•+</sup> se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Alam et al., 2013). Por lo anterior, estos dos métodos son los más utilizados (Tovar 2013).

### Captación del radical DPPH

Mediante el método DPPH, los resultados obtenidos de la curva de calibración promedio ( $y = -0.0305x + 1.27$ ,  $R^2 = 0.9978$ ), mostraron que el extracto Ax-h presentó mayor capacidad de captar al radical DPPH con valor de 1,206.6 ± 68.6 µmoles ET g<sup>-1</sup>). Por otra parte, la actividad antioxidante de los demás extractos resultó ser mucho menor presentando valores de 136.0 ± 3.0 µmoles ET g<sup>-1</sup> y 201.2 ± 8.0 µmoles ET g<sup>-1</sup> dependiendo el extracto analizado (Figura 1).



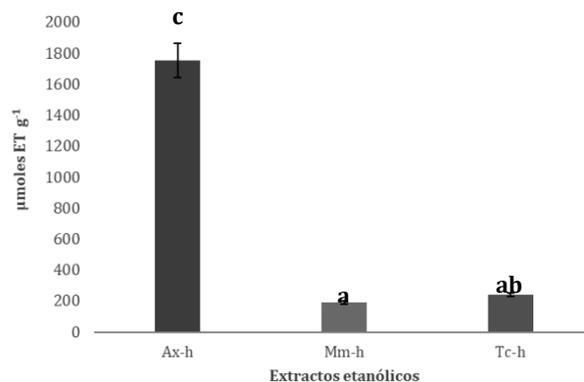
**Figura 1.** Capacidad antioxidante de los extractos frente al radical DPPH. Promedio ± DS (n = 6). ANOVA con Tukey. Significancia  $p \leq 0.05$ .

### Secuestro del radical ABTS<sup>•+</sup>

Con respecto al bioensayo de actividad antioxidante con el reactivo ABTS<sup>•+</sup>, los resultados obtenidos de acuerdo a la curva de calibración promedio ( $y = -0.02x + 0.964$ ,  $R^2 = 0.999$ ) confirman la capacidad antioxidante del extracto Ax-h de captar el radical ABTS<sup>•+</sup> con valor de  $1,750.7 \pm 110.1$  μmoles ET g<sup>-1</sup>, así mismo la actividad de los demás extractos fue similar a la reportada con el radical DPPH con valores  $191.8 \pm 10.2$  μmoles ET g<sup>-1</sup> y  $239.7 \pm 9.9$  μmoles ET g<sup>-1</sup> del extracto Mm-h y Tc-h respectivamente (Figura 2).

El radical DPPH es conocido como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, no se dimeriza como en el caso de la mayoría de los radicales libres (Mishra et al., 2012); además, es un radical del nitrógeno de larga vida, lo cual no guarda similitud con los radicales peroxilo altamente reactivos y transitorios involucrados en la peroxidación lipídica (Tovar 2013). La prueba con DPPH mide la capacidad de una sustancia para donar radicales de hidrógeno a este radical, por lo tanto, cuanto mayor sea el número de hidroxilos presentes en la muestra, mayor será su actividad antioxidante (Duarte et al., 2006; Pieroni et al., 2011); también el mecanismo de reacción del DPPH con los antioxidantes está directamente relacionado con la conformación estructural de los mismos; es decir un antioxidante pequeño con mayor acceso al radical mostrará mejora actividad antioxidante, teniendo presente que el DPPH está impedido estéricamente (Beserra et al., 2011). Por lo anterior, es probable que algunos componentes presentes en el extracto no hayan captado al radical DPPH pero si al radical ABTS<sup>•+</sup>, ya que este último es captado por los electrones transferidos de los diferentes compuestos antioxidantes presentes en los extractos (Wootton et al., 2011) lo que hace que se pueda medir una mayor

capacidad antioxidante como lo observado en los resultados obtenidos (Figura 1 y 2).



**Figura 2.** Capacidad antioxidante de los extractos frente al radical ABTS<sup>•+</sup>. Promedio ± DS (n = 6). ANOVA con Tukey. Significancia  $p \leq 0.05$ .

El extracto de hoja de *A. xalapensis* presentó mayor capacidad para captar tanto el radical DPPH como el radical ABTS<sup>•+</sup>, siendo el de menor capacidad antioxidante el extracto de hoja de *M. malacophylla* en este estudio (Figura 1 y 2). Cabe mencionar que fue mayor la captación del radical ABTS<sup>•+</sup> con respecto al del radical DPPH en todos los extractos, lo cual concuerda con los resultados reportados por Floegel et al., 2011, donde compararon los métodos ABTS<sup>•+</sup> y DPPH probando 50 frutas, vegetales y bebidas ricas en antioxidantes de la dieta de los Estados Unidos de Norteamérica, reportando que en el extracto metanólico de la espinaca encontraron hasta 2.06 veces más capacidad antioxidante con el reactivo ABTS<sup>•+</sup> con respecto al DPPH, esto también concuerda con el trabajo hecho por Tovar 2013 donde determinó la actividad antioxidante mediante los reactivos DPPH y ABTS<sup>•+</sup> de 30 plantas recolectadas en la Ecorregión Cafetera de Colombia, en este estudio se reportó que para el extracto metanólico de *Alchornea grandis* se encontró hasta 19.57 veces más la captación del radical ABTS<sup>•+</sup> con respecto al DPPH.

Con respecto a esto, en el presente trabajo se determinó que la captación del radical ABTS<sup>•+</sup> fue de 1.45 veces mayor a la del DPPH, para el extracto de hoja de *A. xalapensis*, lo cual se puede explicar debido a que este método se basa en la transferencia de electrones; por lo que los diferentes compuestos antioxidantes presentes en los extractos, donan uno o dos electrones para reducir el radical catión, dando una medida precisa de la capacidad antioxidante total en el punto final de reacción (Wootton et al., 2011; Tovar 2013) y además a que puede medir la actividad de compuestos antioxidantes tanto de naturaleza lipofílica como hidrofílica (Madrigal et al., 2013) o a que la actividad antioxidante fenólica como el

ácido cumárico y el ácido isoferúlico, posiblemente presentes en el extracto, se encuentran inactivos hacia el DPPH y se pueden encontrar de manera significativa activos hacia ABTS<sup>•+</sup> e incluso más activos que ciertos homólogos difenólicos (Nenadis et al., 2004).

Nuestros resultados también son comparables con los de Borchardt et al., 2008 donde evaluaron, mediante el método de DPPH, la capacidad antioxidante de semillas (trituras y algunas diluidas en polvo de celulosa) de 150 especies de plantas diferentes de la cuenca del río Mississippi pertenecientes a 45 familias entre las que incluyen Lamiaceae y Fabaceae reportando resultados desde 85.91  $\mu\text{moles ET g}^{-1}$  hasta 257.89  $\mu\text{moles ET g}^{-1}$  para la primera y desde 32.80  $\mu\text{moles ET g}^{-1}$  hasta 584.48  $\mu\text{moles ET g}^{-1}$  para la segunda familia. Legssyer et al., 2004 mencionaron que la actividad antioxidante es debida a la presencia de compuestos polifenólicos como los taninos condensados y galatos de catequina, los cuales ya han sido reportados en el género *Arbutus*. En este estudio se confirma que dicho género tiene muy buena capacidad antioxidante debido a los altos niveles de captación del radical ABTS<sup>•+</sup> presentados por *A. xalapensis*, fueron casi 3 veces mayores que los reportados por Legssyer et al., 2004 en la planta *A. andrachne*. También obtuvieron resultados del extracto acuoso y metanólico del género *Teucrium*, reportando la capacidad antioxidante de *T. polium* frente al radical ABTS<sup>•+</sup>, con valores de 42.3  $\pm$  1.5  $\mu\text{moles ET g}^{-1}$  y 84.4  $\pm$  2.8  $\mu\text{moles ET g}^{-1}$  respectivamente; mientras que en este trabajo se reporta que el extracto etanólico de hoja, del mismo género, pero de la especie *T. cubense*, presenta valores 5 a 10 veces mayores.

## Conclusiones

Con base a los resultados obtenidos en los extractos etanólicos de las plantas en estudio en la presente investigación se concluye que:

El extracto de hoja de *A. xalapensis* fue el que presentó mayor inhibición contra *S. aureus* 29213 y *P. aeruginosa* 12940 con un diámetro de inhibición de 16.4  $\pm$  0.5 mm y 16.3  $\pm$  0.5 mm respectivamente y para *S. maltophilia* 17-0174 fue el extracto de hoja de *T. cubense* con 13.1  $\pm$  1.0 mm.

El extracto de hoja de *A. xalapensis* mostró la mayor actividad antimicrobiana contra la cepa de *S. aureus* 29213 con CMI y CMB de 2.6  $\pm$  0.5 mg/mL y 2.9  $\pm$  0.3 mg/mL respectivamente.

El extracto de hoja de *A. xalapensis* fue el de mayor capacidad antioxidante frente al radical DPPH y ABTS<sup>•+</sup>

con valor de 1,206.6  $\pm$  68.6  $\mu\text{moles ET g}^{-1}$  y 1,750.7  $\pm$  110.1  $\mu\text{moles ET g}^{-1}$  respectivamente.

Los extractos etanólicos de hoja de las plantas *A. xalapensis* y *T. cubense* mostraron resultados prometedores antimicrobianos y antioxidantes como posibles tratamientos y/o coadyuvantes para el control de enfermedades infecciosas causadas por estos microorganismos.

Por lo anterior, se recomienda continuar con el estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas de *A. xalapensis* y *T. cubense* para otras bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como para otros microorganismos tales como levaduras, hongos y parásitos de importancia médica.

Se sugieren realizar análisis químicos cuantitativos de los extractos con mayor capacidad antioxidante para determinar el contenido de fenoles totales, flavonoides, taninos y cumarinas principalmente.

Es importante que se pueda llevar a cabo la separación y fraccionamiento de las plantas de estudio para un posible aislamiento e identificación de los compuestos bioactivos.

Los extractos de hoja de *A. xalapensis* y de *T. cubense* por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes son sugeridos para posteriores estudios en líneas celulares, modelos animales, y con fines farmacológicos.

## Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Nuevo León en particular a la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme continuar con mis estudios para prepararme de la mejor manera gracias al trabajo y esfuerzo de sus doctores, profesores y académicos, así como de sus instalaciones y laboratorios.

Al Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado con la beca No. 745689 para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Eduardo Sánchez García por la oportunidad de trabajar y desarrollarme en el laboratorio, por la guía, los consejos, apoyo, tiempo, y por el equipo y material conseguido por su dedicación y esfuerzo. A la Dra. Catalina Leos Rivas y a la Dra. Catalina Rivas Morales por su confianza al permitirme trabajar con toda libertad y respeto en mis actividades en el laboratorio de Química Analítica; por su gran apoyo y consejos. A la Dra. Licet Villarreal Treviño y Dra. María Porfiria Barrón González por su apoyo, consejos, correcciones, ayuda y disponibilidad.



Al M.C. Sergio García González por su enseñanza, apoyo, consejos, experiencia y confianza.

## Referencias

- Akrouf A., El J., Amouri S., Neffati M. (2010). Screening of antiradical and antibacterial activities of essential oils of *Artemisia campestris* L., *Artemisia herba alba* Asso. *Recent Research in Science and Technology* 2, 29-39.
- Alam N., Bristi N., Rafiquzzaman. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- Alvarado M., Rocha A., Moreno S. (2010). De la Lechuguilla a las Biopelículas Vegetales. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, p. 20-583.
- Beserra Almeida M., Machacado de Sousa P., Campos Arriaga Â., do Prado G., de Carvalho C., Arraes G., Gomes de Lemos T. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, 44(7), 2155-2159.
- Blois M. (1958). Antioxidant determination by the use of stable radical. *Nature*, 4617, 1199-1200.
- Borchardt J., Wyse D., Sheaffer C., Kauppi K., Fulcher R., Ehlke N., Biesboer D., Bey R. (2008). Antioxidant and antimicrobial activity of seed from plants of the Mississippi river basin. *Journal of Medicinal Plants Research* 2, 81-93.
- Bouyahya A., Moussaoui N., Abrini J., Bakri Y., Dakka N. (2016). Determination of phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf extracts. *British Biotechnology Journal*, 14(3), 1-10.
- Brand-Williams W., Cuvelier M., Berset C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 25-30.
- Chedia A., Ghazghazi H., Brahim H., Abderrazak M. (2013). Secondary Metabolite, antioxidant and Antibacterial Activities of *Teucrium polium* L Methanolic Extract. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, 4(8), 1790-1797.
- Contreras P. (2015). Evaluación de la actividad antioxidante y el efecto citotóxico de los extractos etanólicos, etéreos y fracciones de las inflorescencias y hojas de *Achyrocline bogotensis* (Kunth) DC (Asteraceae). Tesis de Licenciatura en Química. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Facultad de Ciencias y Educación. Colombia. p. 1-50.
- Das K., Tiwari R., Shrivastava D. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(2), 104-111.
- Dimayuga R., Virgen M., Ochoa N. (1998). Antimicrobial screening of medicinal plants from Baja California Sur, México. *Journal of Ethnopharmacology* 36, 1: 33-43.
- Duarte-Almeida J., dos Santos R., Genovese M., Lajolo F. (2006). Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26(2), 446-452.
- Duffy C., Power R. (2001). Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17, 527-529.
- Frankel E., Meyer A. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925-1941.
- Floegel A., Kim D., Chung S., Koo S., Chun, O. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 1043-1048.
- Fukumoto L., Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3597-3604.
- García L., Verde J., Castro R., Chávez A., Oranday A., Núñez A., Rivas C. (2010). Actividad biológica de un extracto de orujo de uva mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41, 28-36.
- Godínez D., Volpato G. (2008). Plantas medicinales que se venden en el mercado El Río, Camagüey, Cuba. *Revista mexicana de Biodiversidad* 79, 217-241
- Jurica K., Gobin I., Kremer D., Čepo D., Grubešić R., Karačonji I., Kosalec I. (2017). Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves. *Journal of Herbal Medicine*, 8, 17-23.
- Kohen R., Nyska A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicologic Pathology*, 30(6), 620-650.
- Laciar A., Vaca M., Carrizo R., Saad J. (2009). Antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia*

- echegarayi* Hieron. (Asteraceae). *Revista Argentina de Microbiología*, 41(4), 226–231.
- Legssyer A., Ziyat A., Mekhfi H., Bnouham M., Herrenknecht C., Roumy V., Fischmeister R. (2004). Tannins and Catechin Gallate Mediate the Vasorelaxant Effect of *Arbutus unedo* on the Rat Isolated Aorta. *Phytotherapy Research*, 894, 889–894.
- Madrigal E., García F., Morales J., Vázquez P., Muñoz S., Zuñiga C., Sumaya M., Madrigal E., Hernández-Ceruelos A. (2013). Antioxidant and anticlastogenic capacity of prickly pear juice. *Nutrients*, 5, 4145–4158.
- Mishra K., Ojha H., Chaudhury N. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036–1043.
- Nenadis N., Wang L., Tsimidou M., Zhang H. (2004). Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS\* Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4669–4674.
- Nikaido H., Vaara, M. (1985). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability. *Microbiological Reviews*, 49(1), 1–32.
- Orak H., Yagar H., Isbilir S., Demirci A., Gümüş T., Ekinci N. (2011). Evaluation of antioxidant and antimicrobial potential of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf. *Food Science and Biotechnology*, 20(5), 1249–1256.
- Pironi L., De Rezende F., Ximenes V., Dokkedal A. (2011). Antioxidant Activity and Total Phenols from the Methanolic Extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. *Molecules* 16, 9439–9450.
- Radhapiyari W. (2017). Traditional Medicinal Plants Used For Various Skin Diseases and Cosmoceuticals in Manipur, North-East India. In *Medicinal Plants and its Therapeutic Uses*. OMICS Group eBooks, p. 1–16.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice C. (1999). Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice C. : Antioxidant activity applying an improved... *Free Radical Biology & Medicine*, 6, 1231–1237.
- Sarac N., Ugur, A. (2007). Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsia Journal of BioSciences*, 4, 28–37.
- Sharma A., del Carmen R., Cardoso A., Villarreal M. (2017). Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 208, 264–329.
- Tamilarasi T., Ananthi, T. (2012). Phytochemical analysis and anti microbial activity of *Mimosa pudica* Linn. *Research Journal of Chemical of Sciences*, 2(2), 72–74.
- Tawaha K., Alali F., Gharaibeh M., Mohammad M., El-Elimat T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry*, 104, 1372–1378.
- Tovar J. (2013). Determinación de la Actividad Antioxidante por DPPH y ABTS de 30 Plantas Recolectadas en la Ecorregión Cafetera. Tesis de Licenciatura en Química Industrial. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología. Colombia, p. 1–133.
- Vlase L., Benedec D., Hanganu D., Damian G., Csillag I., Sevastre B., Tilea, I. (2014). Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules*, 19, 5490–5507
- Weckesser S., Engel K., Simon B., Wittmer A., Pelz K., Schempp C. (2007). Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*, 14(7–8), 508–516.
- Wootton-Beard P., Moran A., Ryan L. (2011). Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods. *Frin*, 44(1), 217–224.
- Zampini I. C., Vattuone M., Isla M. (2005). Antibacterial activity of *Zuccagnia punctata* Cav. ethanolic extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 450–456.
- Zongo C., Savadogo A., Somda M., Koudou J., Traore A. (2011). In vitro evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of extracts from whole plant of *Alternanthera pungens* H. B. & K. and leaves of *Combretum sericeum* G. Don. *International Journal of Phytomedicine*, 3, 182–191.