

ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HOJAS DE *Plumbago auriculata* LAM

PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF A METHANOLIC EXTRACT OF *Plumbago auriculata* LAM LEAVES

Gabriel Ibarra Rivera, Melesio Gutiérrez Lomelí*, Miguel Ángel Robles García

Centro Universitario de la Ciénega, Universidad de Guadalajara. Av. Universidad # 1115, Col. Linda Vista. C.P. 47820 Ocotlán, Jalisco, México Tel. 01 (392) 9259400 Ext. 8341 Fax. 01 (392) 9259400 Ext. 8355

RESUMEN

Plumbago auriculata es una planta de ornato aunque en algunas partes de Sudáfrica es conocida por su uso medicinal, sin embargo, no hay estudios que sustenten sus aplicaciones. El objetivo de este trabajo fue determinar la composición fitoquímica, la capacidad antioxidante y evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de plumbago. Las determinaciones fitoquímicas (fenoles, flavonoides, taninos, esteroides, saponinas y curmarinas) se llevaron a cabo por pruebas colorimétricas, cromatográficas y fluorescencia. La cuantificación de la capacidad antioxidante se realizó por los métodos de DPPH y ABTS. Adicionalmente, se cuantificaron los fenoles (Folin-Ciocalteu) y flavonoides totales (prueba FeCl_3). Finalmente, la evaluación de la actividad antibacteriana se realizó por medio de la técnica de microdilución con la obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI). El extracto metanólico de hojas presentó la mayoría de los metabolitos en estudio con excepción de saponinas y cumarinas. En la capacidad antioxidante los valores obtenidos indican hasta un 81.20% y un 92.20% de inhibición para los radicales ABTS y DPPH, respectivamente. El contenido de fenoles totales fue de 13.54 mg EAG/gms y de flavonoides 11.35 mg EQ/gms. No fue posible determinar la inhibición en el crecimiento de las bacterias.

Palabras claves: *Plumbago auriculata*, fitoquímicos, capacidad antioxidante.

ABSTRACT

Plumbago auriculata is an ornamental plant, although it is known for its medicinal use in some parts of South Africa, however, no studies that support its applications are available. The aim of this study was to determine the phytochemical composition, antioxidant capacity and evaluate the antibacterial activity of a methanolic extract of plumbago leaves. Phytochemical determinations (phenols, flavonoids, tannins, steroids, saponins and curmarinas) were performed by colorimetric tests, chromatographic and fluorescence. Quantification of antioxidant capacity was performed by the DPPH and ABTS methods. Additionally, phenols (Folin-Ciocalteu) and total flavonoids (FeCl_3 test) were quantified. Finally, evaluation of the antibacterial activity was conducted by the microdilution method, obtaining the minimum inhibitory concentration (MIC). Plumbago leaves methanol

extract presented most of these metabolites except saponins and coumarins. In the antioxidant capacity, values obtained indicate up to 81.20% and 92.20% inhibition by the ABTS and DPPH methods, respectively. Total phenol content was 13.54 mg EAG/g ms and 11.35 mg flavonoids EQ/g ms. It was not possible to determine the inhibition in the growth of the bacteria.

Keywords: *Plumbago auriculata*, phytochemicals, antioxidant capacity.

INTRODUCCIÓN

El aprovechamiento de las plantas para aliviar toda clase de dolencias y prevenir enfermedades es una práctica muy antigua entre los seres humanos. En el México antiguo, los grupos humanos desarrollaron grandes conocimientos sobre los poderes curativos de las yerbas (CONEVYT, 2015). Al parecer, muchas de las culturas antiguas del mundo encontraron en las plantas grandes recursos para cuidar la salud. Gran parte de la población en el planeta dependen de la medicina tradicional en especial los países en desarrollo donde las plantas son la principal fuente de medicina. Muchas plantas son de gran importancia comercial para la industria farmacéutica debido a que éstas aportan la materia prima de la cual se extraen sustancias para la elaboración de fármacos. A nivel mundial se reconoce la importancia de plantas medicinales con fines curativos. Actualmente, el estudio de plantas se ha incrementado con el fin de encontrar compuestos bioactivos que ayuden a la formación de fármacos nuevos y mejorados.

El género *Plumbago* ha tenido uso en la medicina popular para diversos tratamientos. *Plumbago auriculata* se ha utilizado tradicionalmente para tratar una amplia gama de enfermedades incluyendo heridas, huesos rotos y el uso de la raíz en polvo para dolores de cabeza. Si bien es endémica de Sudáfrica, en México está bien adaptada y es conocida por ser una planta de hogar y ornamental de la cual se extraen diversos pigmentos de uso industrial. La decocción de las partes se toma para tratar la fiebre. La infusión de raíz de *P. auriculata* se toma como un emético (Asha-Saji, 2015). La raíz asada se frota en la escarificación sobre fracturas para promover la curación, y se frota sobre el cuerpo para curar puntadas. Los efectos terapéuticos de *Plumbago* pueden estar relacionados con la presencia de naftoquinonas (Moncada-Ascencio *et al.*, 2011).

*Autor para correspondencia: Melesio Gutiérrez Lomelí
Correo electrónico: melegl@hotmail.com

Recibido: 31 de Agosto de 2016

Aceptado: 02 de Agosto de 2017

El siguiente trabajo tiene como propósito conocer los compuestos bioactivos y propiedades antibacterianas a partir del extracto metanólico de hojas de *Plumbago auriculata*, con el fin de propiciar nuevos usos en el ámbito farmacéutico e incentivar el estudio posterior de cada uno de los compuestos contenidos en las hojas de la planta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Determinación de los compuestos fitoquímicos

Extracción

Se recolectaron plantas en el municipio de Briseñas de Matamoros, Michoacán, de las cuales se obtuvieron hojas que posteriormente se secaron a temperatura ambiente pero protegidas de la luz. Se pulverizaron y se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. A 3 g de la muestra pulverizada se le adicionaron 30 mL de metanol y se homogenizó. Ésta mezcla pasó a la sonicación y posteriormente a centrifugación. Se filtró el sobrenadante y se colocó en un embudo de separación para obtener la fase metanólica captada en un matraz tapado y aislado de la luz. Al sedimento se le agregaron nuevamente 30 mL de metanol el cual pasó una vez más por el mismo proceso mencionado anteriormente. Se determinó el rendimiento de extracto evaporando el solvente en un rotavapor y se reportó como gramos de extracto por gramo de muestra seca (g E/g ms). Por último, se resuspendió en 10 mL de metanol para ser pasado a un tubo microbiológico donde finalmente fue aislado de la luz y guardado en refrigeración para los posteriores estudios (Del-Toro-Sánchez *et al.*, 2015).

Pruebas rápidas para la identificación de fitoquímicos

Determinación de fenoles

Se realizaron dos pruebas de identificación cualitativa para fenoles: una colorimétrica y la otra por cromatografía en capa fina (TLC por sus siglas en inglés). El extracto utilizado fue el metanólico y para comparación positiva se utilizó el estándar ácido gálico.

Prueba colorimétrica para fenoles

A partir de los extractos de hoja con la ayuda de una pipeta Pasteur se colocaron de 3 a 4 gotas en el fondo de 5 tubos Eppendorf (2 mL) rotuladas del 0 a 4. Después se agregaron 2 gotas de agua destilada y se añadieron gotas de cloruro férrico (FeCl_3) al 10% (al tubo 0 no se le adicionó FeCl_3 , al tubo 1 se le agregó una gota, al tubo 2 solo dos gotas, y así sucesivamente). Se homogenizó y se observó la coloración para la interpretación de los resultados. La muestra control negativa fue el tubo 0 y se utilizó ácido gálico en concentración 1 mg/mL como muestra control positiva (García *et al.*, 2003; García *et al.*, 2009).

Identificación de taninos

Esta prueba se realizó con muestra seca triturada de la planta en estudio. Se colocaron aproximadamente 3.5 g de muestra seca en un matraz. Se le añadieron 100 mL de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) a una concentración de 0.004 M, en ausencia de luz y sometidos a 100 rpm por 15

min (Shaker. Maxq2000, Barnstead/Lab-Line, SHKA2000). Transcurrido el tiempo señalado se adicionaron 10 mL de FeCl_3 (Sánchez *et al.*, 2010). Se considera un resultado positivo si se obtiene verde oscuro (taninos condensados) o azul (taninos hidrolizables).

Prueba de espuma para identificación de saponinas

Se utilizó el método de espuma. Se diluyó el extracto 9:1 (9 mL de H_2O destilada más 1 mL de extracto metanólico). Se homogenizó lo suficiente sin formar espuma y se filtró la disolución (papel filtro). De esta mezcla se tomó 1 mL y se pasó a un tubo de ensaye de vidrio con tapa (13 x 100 mm), se adicionaron 9 mL de H_2O destilada. A continuación, se agitó vigorosamente durante 30 s, con la mano. Se dejó reposar 15 min. Transcurrido el tiempo establecido se midió la altura de la espuma formada en cada muestra (García *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2010).

- La interpretación de los resultados fue la siguiente:
- Altura de espuma 5 mm: (-) se considera negativa, no contiene saponinas
- Espuma 5–10 mm: (+) presenta un contenido bajo
- Alrededor 10–15 mm: (++) es contenido moderado
- Encontrando una altura de 15 mm: (+++) se le atribuye un alto contenido de saponinas.

Identificación de esteroides

Se realizó una extracción con 30 mL de éter de petróleo y 50 mL de metanol. Posteriormente, se agitó durante 2 h a 200 rpm (Shaker. Maxq2000, Barnstead/Lab-Line, SHKA2000). Pasado este tiempo se filtró y se pasó un embudo de separación y se obtuvo el extracto etéreo que fue el que se utilizó en esta técnica. Se tomó 1 mL de este extracto y se colocó en un crisol. Después se dejó reposar hasta que el solvente se volatilizó. A continuación, se adicionaron de 4 a 5 gotas de cloroformo al crisol, se mezclaron bien y se repartieron mediante goteo (de 2 a 3 gotas de la mezcla) a 4 tubos de vidrio con tapa. Ya teniendo la muestra en los tubos, se agregaron 2 gotas de anhídrido acético a solo 3 de los tubos. Con todos los tubos tapados para evitar la evaporación de los solventes y bajo campana, se destaparon rápida y cuidadosamente los 3 tubos que contenían el anhídrido acético para agregar una gota de ácido sulfúrico con pipeta Pasteur (García *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2010). Se considera un resultado positivo si se observa una coloración azul-verde (esteroides), rojo, rosa o violeta (triterpenos), o bien amarillo pálido (esteroides o triterpenos saturados).

Identificación de cumarinas

A partir del extracto metanólico, se realizó una dilución siguiendo la proporción 9:1 (como se realizó en la determinación de saponinas). Se colocaron 2 mL de dicha dilución en un tubo de vidrio con tapa. Se colocó en ese mismo tubo una tira de papel filtro previamente empapado de una solución alcalina de NaOH (0.06 g/mL) de tal manera que no tocara el extracto (espacio de cabeza). Posteriormente, se tapó y se llevó a calentar en un mechero Bunsen hasta desprendi-

mientos de vapores. Se tuvo el cuidado necesario para que el papel filtro no se quemara, ni se empapara de la solución alcalina al agitarse, evitando que sufriera proyección, ya que las cumarinas presentes en los extractos se acumulan en el papel filtro. Después se llevó el papel filtro bajo lámpara UV observando la posible presencia de cumarinas: si el papel filtro exhibe puntos fluorescentes, la muestra se considera positiva (García *et al.*, 2003; García *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2010).

Identificación de fenoles mediante cromatografía en capa fina (TLC)

Se colocó el extracto metanólico en placas de TLC (16 x 4 cm) para su identificación. Con la ayuda de un capilar, se colocaron de 3 a 4 gotas de extracto correspondiente a una placa de TLC el cual se dejó secar. Posteriormente, se introdujo la placa en una cámara para cromatografía con la fase móvil en proporción 40:60:1 (éter de petróleo: acetato de etilo: ácido fórmico) la cual fue dejada 30 min para una saturación de gases. Se sacaron las placas cuando el solvente eluyó al extremo final de dicha placa. Se dejó secar durante 5 min, en seguida se llevó bajo luz UV a las longitudes de onda de 254 nm y 365 nm para observar el número de compuestos fluorescentes. Se utilizó ácido gálico como control positivo. Finalmente, se obtuvo el Factor de retención ($R_f = \text{distancia solvente}/\text{distancia muestra}$) de cada compuesto encontrado (García *et al.*, 2009; CUBOCUC, 2011).

Identificación de flavonoides mediante cromatografía en capa fina (TLC)

El extracto utilizado fue metanólico y se realizó por TLC. Las placas de TLC, tuvieron las mismas características y el mismo procedimiento que para fenoles. La fase móvil fue acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético glacial: agua (100:11:11:27). Bajo luz UV a una longitud de onda de 254 nm se observan manchas colores azul, verde y amarillas, y a 365 nm se observan las manchas de color azul oscuro. Se utilizó quercetina como control positivo. Por último, se obtuvo el factor de retención de cada compuesto encontrado (García *et al.*, 2009; CUBOCUC, 2011).

Cuantificación de la capacidad antioxidante de los extractos de hojas de *Plumbago auriculata*

Por medio de las técnicas espectrofotométricas se estudió la capacidad de inhibición utilizando radicales sintéticos por los métodos DPPH (Molyneux, 2004) y ABTS (Re *et al.*, 1999). Los fenoles totales se determinaron por el método de Folin-Ciocalteu (Prior *et al.*, 2005; Mullen *et al.*, 2007) y se basó en una curva de ácido gálico. Los flavonoides totales se determinaron por el método colorimétrico basado en Maksimovic *et al.* (2005) con algunas modificaciones y se utilizó una curva de quercetina.

Método de DPPH

Se pesaron 1.5 mg de radical DPPH[•] y se disolvieron en 50 mL de metanol de los cuales se ajustaron a una absorban-

cia de 0.7 ± 0.01 en una longitud de onda de 515 nm. De esta mezcla se tomaron 200 μL de radical con 20 μL de muestra, se dejó reposar 30 min en oscuridad y se midió a una longitud de onda de 515 nm. Se utilizó metanol como muestra control. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición (Molyneux, 2004). % de inhibición = $\frac{\text{absorbancia control} - \text{absorbancia muestra}}{\text{absorbancia control}} \times 100$.

Método de ABTS

La preparación del radical se realizó según la metodología de Re *et al.* (1999). Se tomaron 270 μL de la solución del radical catiónico preparado y se adicionaron 20 μL de muestra leyendo a una absorbancia de 734 nm después de 30 min de reposo. Se utilizó metanol como muestra control. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición como se indicó para DDPH.

Determinación de fenoles totales

Se realizó por la técnica de Folin-Ciocalteu con ligeras modificaciones (Mullen *et al.*, 2007). Se tomaron 10 μL de extracto y se agregaron 25 μL de Folin, se dejó reposar 5 min en refrigeración. Trascurrido el tiempo se agregaron 25 μL de Na_2CO_3 al 20% y 140 μL de agua desionizada. Se dejó reposar 30 min y se determinó la absorbancia a 760 nm. Se realizó una curva con ácido gálico. Los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG/g ms).

Determinación de flavonoides totales

Los flavonoides totales se realizaron por el método colorimétrico basado en la técnica desarrollada por Maksimovic *et al.* (2005). Se tomaron alícuotas de 80 μL de extracto y se adicionaron 80 μL del reactivo de flavonoides tricloruro de aluminio al 20%. Con una agitación previa y una 1 hora de reposo, se midió la absorbancia a 415 nm. Se realizó una curva con el estándar quercetina. Los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de quercetina por gramo de muestra seca (mg EQ/g ms).

Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de *Plumbago auriculata* sobre cepas bacterianas patógenas.

Para realizar este objetivo, se utilizaron varias cepas patógenas (*Escherichia coli*, *Salmonella tify*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens* y *Streptococcus pyogenes*). Se realizó de acuerdo a la técnica de microdilución con la obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Peterson y Schanholtzer, 1992). El extracto se diluyó a diferentes concentraciones (1.33 mg/mL, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para cada cepa se partió de un cultivo con 18 h de crecimiento, ajustándolo a 0.5 en la escala de McFarland. Se agregó la bacteria a cada una de las concentraciones del extracto en un volumen total de 300 μL por "extracto/bacteria" y se realizó por duplicado. Además se tuvieron dos controles de crecimiento positivos (200 μL de medio + 100 μL

de microorganismo y 100 μ L de medio + 100 μ L de microorganismo + 100 μ L de metanol). Se utilizaron tres controles negativos: (300 μ L de medio), (200 μ L de medio + 100 μ L de metanol) y (200 μ L de medio + 100 μ L de extracto).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Determinación de los compuestos fitoquímicos del extracto de las hojas de *Plumbago auriculata*

Antes de realizar la determinación fitoquímica, se procedió a obtener el rendimiento de la extracción de hoja seca de *Plumbago auriculata* por el método de percolación, utilizando metanol como solvente. El rendimiento fue del 13.89% como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Rendimiento de extracto de hoja seca de *Plumbago auriculata*.

Table 1. Dry leaf extract yield of *Plumbago auriculata*.

Muestra	Peso inicial	Peso extracto	Rendimiento	
	(g)*	(g)*	gE/gms*	%*
<i>Plumbago auriculata</i>	3.00	0.45	0.1389	13.89

gE/gms:gramos de Extracto / gramos de muestra seca.

En comparación con el rendimiento obtenido con otras plantas utilizando el mismo sistema de extracción se observa diversas variaciones en los rendimientos que van desde 17.2% (Vega-Menchaca *et al.*, 2013), hasta 3.1% (Carrasco-Estrada, 2015). Estas diferencias podrían deberse a las condiciones a las que la planta se expone o bien a la genética de la misma. Por lo tanto, la planta en estudio (*Plumbago auriculata*) se considera que tiene un rendimiento intermedio.

Una vez determinado el rendimiento del extracto de hojas secas de *P. auriculata*, se determinaron los compuestos fitoquímicos del extracto a través de pruebas cualitativas del tipo colorimétricas, cromatográficas en capa fina (TLC), fluorescente y de espuma. El resumen de los resultados se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Pruebas cualitativas para la determinación fitoquímica de extractos de hoja seca de *Plumbago auriculata*.

Table 2. Qualitative tests for the phytochemical determination of *Plumbago auriculata* dry leaf extracts.

Fitoquímicos	Método	Resultado	Observaciones
Fenoles	Colorimétrico	Positivo	Fenoles tipo catecol
	TLC (Fluorescente)	Positivo	No determinado
Flavonoides	TLC (Fluorescente)	Positivo	No determinado
Saponinas	Espuma	Negativo	No presenta
Cumarinas	Fluorescente	Negativo	No presenta
Esteroides	Colorimétrico	Positivo	Esteroides
Taninos	Colorimétrico	Positivo	Hidrolizables

En los resultados obtenidos en las pruebas cualitativas se puede observar que existe la presencia de metabolitos secundarios en el extracto metanólico de hojas de *P. auriculata*, con excepción de cumarinas y saponinas. Las pruebas de cada técnica se discuten a continuación.

Fenoles y flavonoides

Los fenoles se determinaron por dos técnicas, una colorimétrica y la otra por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando fluorescencia. Los flavonoides se realizaron solo en TLC. En la parte colorimétrica para fenoles se observó que la muestra tiene fenoles del tipo catecol, esto por la coloración verde oscuro que se presentó al realizar la prueba con el reactivo $FeCl_3$ (Figura 1). Los fenoles de tipo catecol (orto dihidroxibenceno) se obtuvieron de la planta.

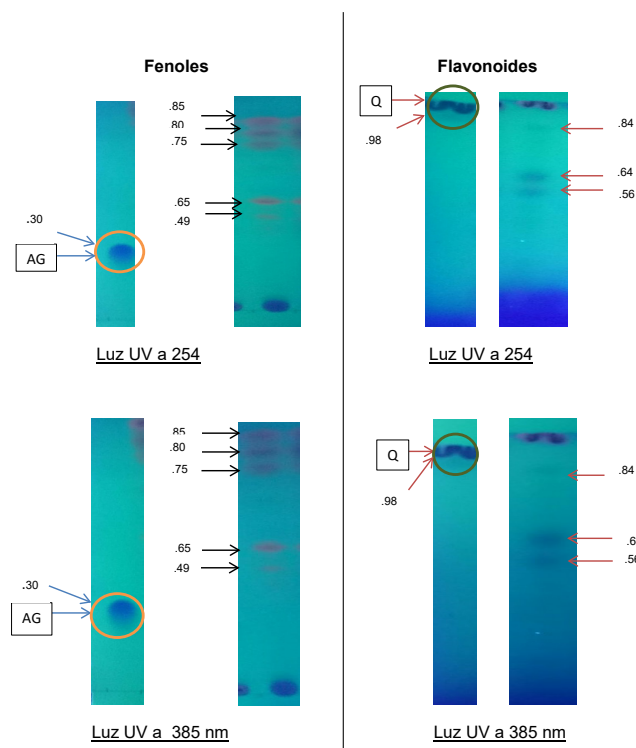


Figura 1. Factor de retención (Rf) en las TLC de los compuestos obtenidos en fenoles y flavonoides por fluorescencia a 254 y 385 nm. Control para Fenoles: Ácido Gálico (AG); Control para Flavonoides: Quercetina (Q).

Figure 1. Retention Factor (Rf) at TLC of phenols and flavonoids by fluorescence at 254 nm and 385. Phenols control: gallic acid (GA); Flavonoids control: Quercetin (Q).

Los resultados obtenidos en la TLC para fenoles y flavonoides por fluorescencia (254 y 385 nm), se observan en la figura 1. En donde se puede apreciar los 5 compuestos fenólicos mismos que coincidieron en ambas longitudes de onda.

Ningún control utilizado tanto en fenoles (ácido gálico) como para flavonoides (Quercetina) se pudo observar en el extracto. Por lo tanto, estos compuestos no están presentes en la composición del extracto de hojas de *P. auriculata*.

En cuanto a los flavonoides solo se observaron 3 compuestos dos de los cuales tiene un factor de retención muy parecido a dos compuestos presentes en fenoles. Esto podría indicar que muy posiblemente que estos compuestos fenólicos sean flavonoides. Sin embargo, para poder comprobarlo se requiere de una técnica más especializada (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de Rf (factor de retención) observados en fenoles y flavonoides de los extractos obtenidos en cromatografía de capa fina a 254 y 385 nm de extracto de hoja.

Table 3. Observed phenols and flavonoid Rf values (retention factor) from the extracts obtained by thin layer chromatography at 254 nm and 385 nm leaf extract.

		254 nm		385 nm	
		AG	E	AG	E
F E N O L E S	-	-	-	-	-
	-	0.85	-	0.85	-
	-	0.80	-	0.80	-
	-	0.75	-	0.75	-
	-	0.65	-	0.65	-
	-	0.49	-	0.49	-
	0.30	-	0.30	-	-
		Q	E	Q	E
F L A V O N O I D E S	0.98	-	-	0.98	-
	-	0.84	-	-	0.84
	-	-	-	-	-
	-	0.64	-	-	0.64
	-	0.56	-	-	0.56
	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-

AG:Ácido gálico Q:Quercetina E:Extracto

Saponinas

La determinación de saponinas se realizó por el método de formación de espuma. En los resultados obtenidos se observó que no hay presencia de saponinas, puesto que la espuma presentó una altura de 1 mm (Tabla 2). El no contener saponinas el extracto resulta ventajoso ya que por lo general se le considera un compuesto peligroso en determinadas dosis debido a su alta toxicidad (Hostettmann y Marston, 1995).

Cumarinas

La determinación de cumarinas del extracto, se realizó por fluorescencia con la impregnación en papel filtro del vapor expedito del extracto en presencia de temperatura. El resultado obtenido fue negativo para cumarinas al no detectarse puntos fluorescentes bajo luz UV a 365 nm (Tabla 2).

Taninos

La determinación de taninos se realizó por la prueba colorimétrica con FeCl_3 y $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. La muestra de hoja seca triturada dio positivo al presentar una coloración azul intenso, indicando la presencia de taninos del tipo hidrolizable, llamados también gálicos o pirogálicos (Tabla 2).

Esteroides

La determinación de esteroides fue positiva ya que se obtuvo una coloración azul verde (Tabla 2). Se utilizó el esteroide algestrona y estradiol para el control positivo. Esta prueba se realizó por la técnica colorimétrica a la cual a partir de muestras de hoja seca triturada se le añadió diversos solventes (éter de petróleo, cloroformo, anhídrido acético y ácido sulfúrico), los cuales dieron la coloración mencionada.

Cuantificación de fenoles y flavonoides de los extractos de hojas *Plumbago auriculata* y su capacidad de inhibición contra los radicales libres

La cuantificación de fenoles se realizó por medio de la técnica de Folin Ciocalteu. Los resultados se expresaron

como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra seca (mg EAG/g ms). Todas las mediciones se hicieron por triplicado y de los resultados obtenidos el promedio fue de 13.54 mg EAG/g ms.

La determinación de los flavonoides totales se realizó por medio del método basado en Maksimovic *et al.* (2005). Los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de Quercetina por gramo de muestra seca (mg EAG/g ms). Todas las mediciones se hicieron por triplicado y de los resultados obtenidos el promedio fue de 11.35 mg EQ/g ms.

En cuanto a la determinación de la capacidad antioxidante, se llevó a cabo por los métodos DPPH (Figura 2) y ABTS (Figura 3). Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición (% de inhibición) a diferentes concentraciones de extracto.

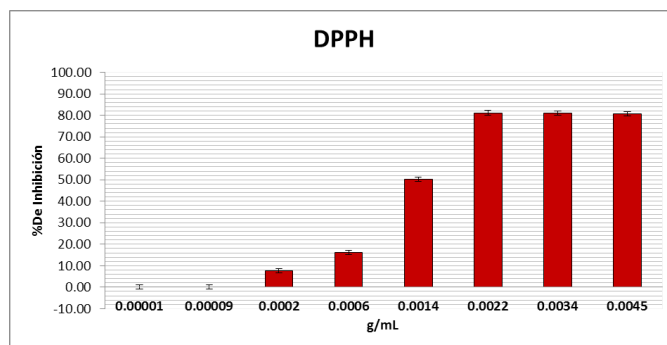


Figura 2. Porcentaje de inhibición de DPPH obtenidas de las hojas secas de *Plumbago auriculata*.

Figure 2. DPPH percentage of inhibition obtained from dried *Plumbago auriculata* leaves.

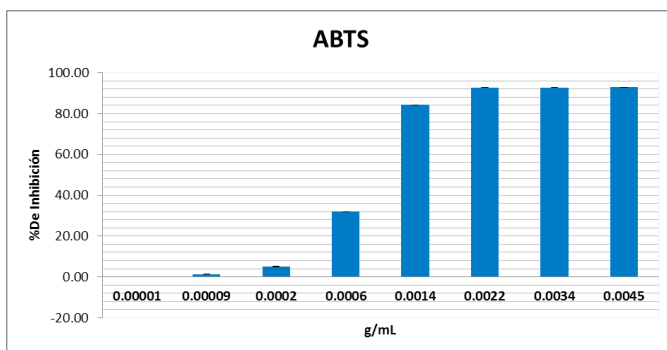


Figura 3. Porcentaje de inhibición de ABTS obtenida de las hojas secas de *Plumbago auriculata*.

Figure 3. ABTS percentage of inhibition obtained from dried *Plumbago auriculata* leaves.

En DPPH se observó un mayor porcentaje de inhibición en la concentración 0.0022 g/mL ya que obtuvo el 81.20% de inhibición, de igual manera las dos concentraciones anteriores mantuvieron un promedio del 80.93%. La concentración 0.0014 g/mL presentó el 50% de inhibición (Figura 4).

En ABTS el porcentaje más alto de inhibición fue del 92.89% que presentó la concentración 0.0045 g/mL y la inhibición del 50% se localizó entre las concentraciones 0.0006 y 0.0014 g/mL. (Figura 5). El radical ABTS requirió menor con-

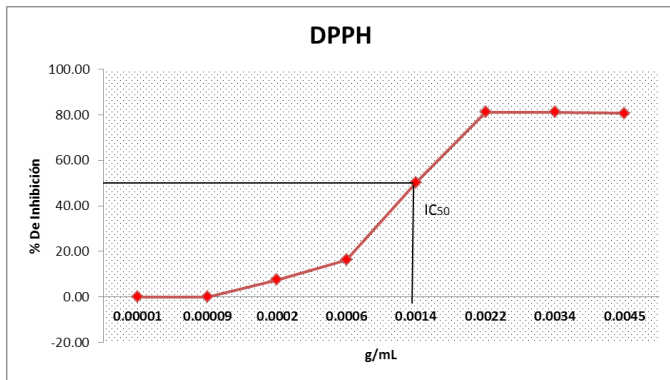


Figura 4. Determinación de la concentración que inhibe el 50% (IC50) del radical DPPH.

Figure 4. Inhibitory concentration at 50% (IC50) of the DPPH radical.

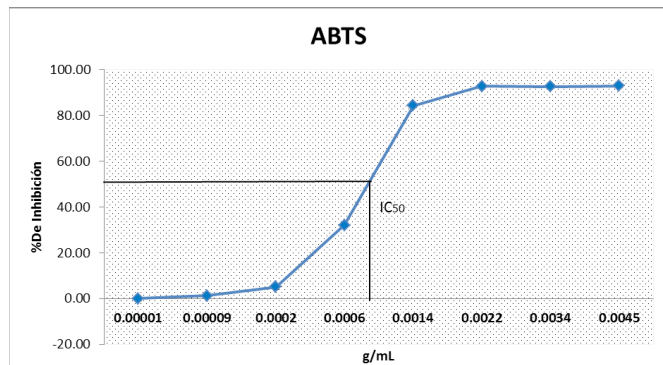


Figura 5. Determinación de la concentración que inhibe el 50% (IC50) del radical ABTS.

Figure 5. Inhibitory concentration at 50% (IC50) of the ABTS radical.

centración del extracto para alcanzar el 50% de inhibición en comparación con el radical DPPH.

La diferencia en los porcentajes de inhibición de los dos radicales puede deberse a la afinidad de los compuestos presentes. Lo que supone que los compuestos del extracto metanólico de hojas de *P. auriculata* tienen una mayor afinidad al radical ABTS debido a que presentó un porcentaje más alto de inhibición la mayoría de las diluciones (Villano *et al.*, 2007).

Evaluación de capacidad antibacteriana del extracto de hojas de *Plumbago auriculata*

Para la evaluación de la capacidad antibacteriana del extracto de hoja de *P. auriculata* se realizó por medio de la técnica de microdilución en placa de pocillos y obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcenses* y *Streptococcus pyogenes*.

Se utilizaron los mismos controles negativos en todas las bacterias y los controles positivos variaron en el contenido de microorganismo correspondiendo a cada una de las bacterias utilizadas, la composición de los controles se muestra en la siguiente tabla (4).

Tabla 4. Contenido de controles positivos y negativos.

Table 4. Content of positive and negative controls.

Número	Controles
1	300 µL de medio (-)
2	200 µL de medio + 100 µL de microorganismo (+)
3	100 µL de medio + 100 µL de metanol + 100 µL de microorganismo (+)
4	200 µL de medio + 100 µL de metanol (-)
5	200 µL de medio + 100 µL extracto (-)

Los resultados obtenidos después de las 24 h de incubación se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento (%) a diferentes concentraciones del extracto como se muestra en las figuras siguientes (6 a 15).

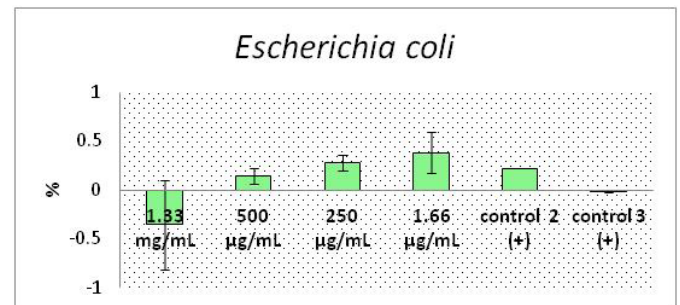


Figura 6. Determinación de la CMI en *Escherichia coli*.

Figure 6. MIC determination in *Escherichia coli*.

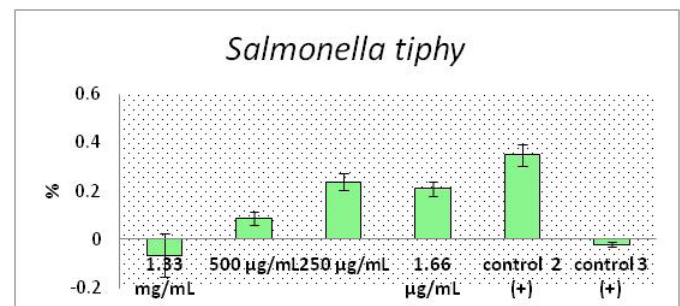


Figura 7. Determinación de la CMI en *Salmonella tiphy*.

Figure 7. MIC determination in *Salmonella typhi*.

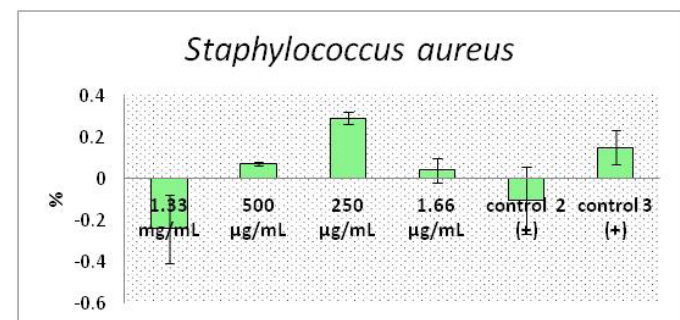


Figura 8. Determinación de la CMI en *S. aureus*.

Figure 8. MIC determination in *S. aureus*.

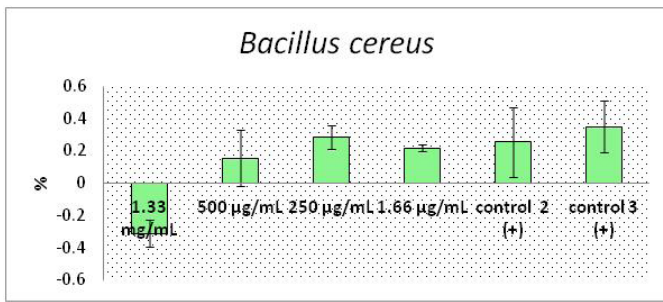


Figura 9. Determinación de la CMI en *Bacillus cereus*.
Figure 9. MIC determination in *Bacillus cereus*.

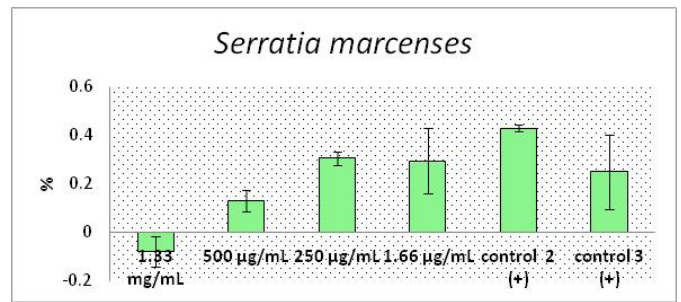


Figura 13. Determinación de la CMI en *Serratia marcescens*.
Figure 13. MIC determination in *Serratia marcescens*.

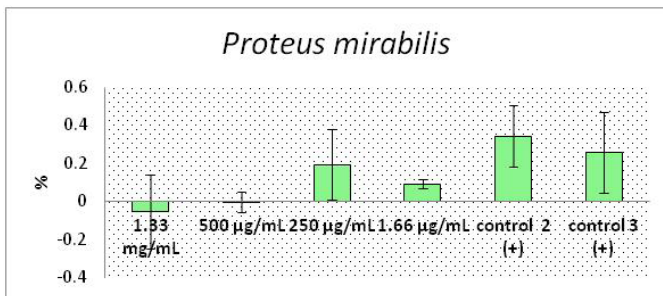


Figura 10. Determinación de la CMI en *Proteus mirabilis*.
Figure 10. MIC determination in *Proteus mirabilis*.

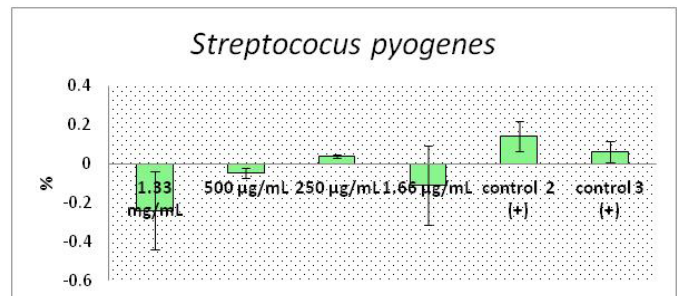


Figura 14. Determinación de la CMI en *Streptococcus pyogenes*.
Figure 14. MIC determination in *Streptococcus pyogenes*.

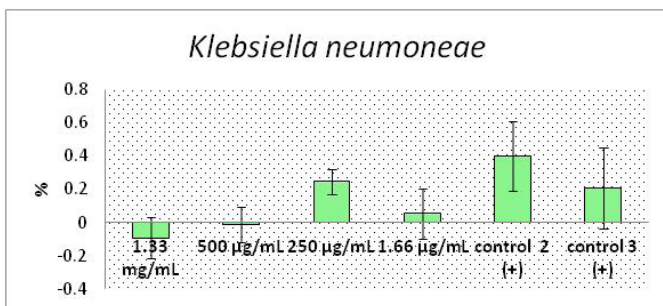


Figura 11. Determinación de la CMI en *Klebsiella pneumoniae*.
Figure 11. MIC determination in *Klebsiella pneumoniae*.

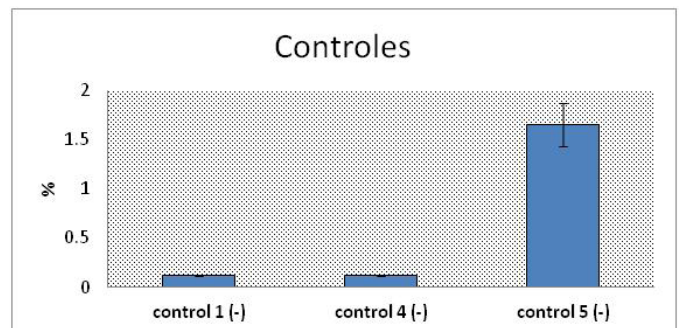


Figura 15. Controles negativos.
Figure 15. Negative controls.

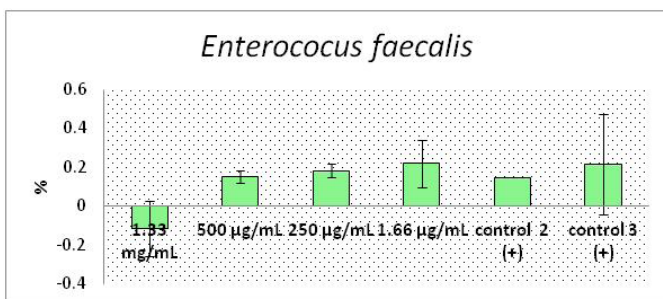


Figura 12. Determinación de la CMI en *Enterococcus faecalis*.
Figure 12. MIC determination in *Enterococcus faecalis*.

En todas las preparaciones a 1.33 mg/mL se observó una disminución en el porcentaje crecimiento. Sin embargo, este resultado pudo deberse muy posiblemente a una degradación del extracto. En la mayor parte de las concentraciones restantes (500 µg/mL, 250 µg/mL y 1.66 µg/mL) presentaron un porcentaje de crecimiento similar a sus controles positivos. El control cinco (negativo) presentó un crecimiento irregular causado posiblemente por contaminación. La prueba de actividad antibacteriana realizada por la técnica de microdilución con el procedimiento correspondiente no determinó si el extracto de hoja de *Plumbago auriculata* tiene actividad antibacteriana frente a las bacterias utilizadas en este trabajo. Para estudios posteriores se recomienda se consideré la degradación de la clorofila.

CONCLUSIONES

El extracto metanólico de hoja de *Plumbago auriculata* presentó un grupo de compuestos que son utilizados en distintos sectores industriales y capacidad antioxidante considerable, por lo que al no presentar saponinas estos resultados pueden ser favorables debido a que las saponinas se consideran tóxicas. Sin embargo estos compuestos no se caracterizaron individualmente por lo que se necesitarían investigaciones posteriores para identificarlos y así buscar las propiedades para cada compuesto y poder asignar usos más específicos que puedan ser aprovechados por distintos sectores industriales. En cuanto a la actividad antibacteriana del extracto metanólico de hoja de *P. auriculata* no fue posible determinarla con el procedimiento realizado.

REFERENCIAS

- Asha-Saji, V.T.A. 2015. *Plumbago auriculata* Lam. Int J Pharm Sci Rev. 33(2):281- 284.
- Biswas B, Kimberly R, Frederick MC, Daniels D, Yadav A. 2013. Antimicrobial activities of leaf extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on two gram- negative and gram-positive bacteria. Inter J Microbiol. 2013(1):1-7.
- Carrasco-Estrada J. 2015. Caracterización, determinación de la capacidad de inhibición de radicales libres y dosis letal media de extractos de *Pronus serrulata*. Tesis de licenciatura. Centro Universitario de la Ciénega. Universidad de Guadalajara.
- CONEVYT, Consejo Nacional de Educación para la Vida. 2015. Nuestro planeta la Tierra. Disponible en: http://www.conevyt.org.mx/cursos/cursos/planeta/contenidos/revista/2_8-com.htm. Consultado el: 08/10/15.
- Cruz-Carrillo A, Rodríguez NN, Rodríguez CE. 2010. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. Revista U. D.C.A. 13(2):117-124.
- CUBOCUC (CUBoulder Organic Chemistry Undergraduate Courses). 2011. TLC –Retention Factor (Rf). University of Colorado. Disponible en: <http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/TLC/TLCrf.html>. Consultado 8 de agosto 2015.
- Del-Toro-Sánchez CL, Gutiérrez-Lomelí M, Lugo-Cervantes E, Zurita F, Robles García MA, Ruiz-Cruz S, Aguilar JA, Morales-Del Río JA, Guerrero-Medina PJ. 2015. Storage effect on phenols and on the antioxidant activity of extracts from *Anemopsis californica* and inhibition of elastase enzyme. Journal of Chemistry. Doi: 10.1155/2015/.
- García CMP, Kim NB, Bich NT, Tillan JC, Romero JAD, Dario OL, Fuste VM. 2009. Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnata* L., *Matricaria recutita* L. y *Morinda citrifolia* L. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 14(2):1-5.
- García DE, Ojeda F, Montejo I. 2003. Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). Análisis cualitativo de metabolitos secundarios. Pastos y forrajes. 26: 335.
- Hinojosa-Dávalos J, Gutiérrez-Lomelí M, Siller-López F, Rodríguez-Sahagún A, Morales-Del Río A, Guerrero-Medina PJ, Del Toro-Sánchez CL. 2013. Screening fitoquímico y capacidad antiinflamatoria de hojas de *Tithonia tubaeformis*. Biotecnia. 15(2): 53-60.
- Hostettmann, K. y Marston, A. 1995. Chemistry and pharmacology of natural products: Saponins. Cambridge University Press. p. 2-3.
- Maksimovic Z, Malencic D, Covacevic N. 2005. Polyphenol contents and antioxidant activity of *Mayadis stigma* extracts. Biores. MIT Technology Review. 96: 873-877.
- Molyneux P. 2004. The use of the stable radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science Technology. 26(2): 211-219.
- Moncada-Ascencio N., Farcio-Villareal M., Rojas-Idrogo C., Trevisan-Ferreira D., Horna-Davila O., Pereira J., Delgado-Paredes G. 2011. Actividad biológica de *Plumbago scandens* L. sobre cepas multidrogoresistente de *Mycobacterium tuberculosis*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 10:233-245.
- Mullen W., Marck S.C., Crozier A. 2007. Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. J Agricultural Food Chem. 55(8):3148-3157.
- Nascimento GFG, Locatelli J, Freitas CF, Silva LS. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. Brazilian J Microbiol. 31:247-256.
- Ordunayo RA, Aibinu LE, Tayo A, Toyin A, Tolu O. 2007. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. 4(3):338-344.
- Pengelly, A. (1996). The constituents of Medicinal Plants. 2nd Ed. Cabi Publishing, U.K.
- Pérez-Alonso N, Jiménez E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. Biotecnología Vegetal. 11:195-211.
- Peterson, L., R., Schainholtzer, C., J. 1992. Microplate tests for bactericidal effects of antimicrobial agents. Technical performance and clinical relevance. Clin. Microb. Rev. 5: 420-432.
- Prior RL, Wu X, Schaich K, 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J Agricultural Food Chem. 53: 4290-4302.
- Re R, Pellegrini N, Protoggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. 26: 1231-1237.
- Sánchez YG, Rondón LA, Hermosilla RE, Almeida MS. 2010. Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas, tallos y flores de la *Helychrysum bracteatum*. Revista Química Viva. 1:40-45.
- Vega-Menchaca MC, Verde-star J, Oranday-cárdenas A, Eufemia M, Núñez- González MA, Rivera-guillén MA, Benjamín L, Rivas-morales C. 2013. Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum frutescens* (Berl) I. M. Johnston del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 44(2), 24-30.
- Verhoek-Williams S. 1970. Family 153: Plumbaginaceae. In Flora of Panama— Part 8. Ann Missouri Bot Gard. 57: 55-58.
- Villaño D, Fernandez- Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, Garcia-Parilla MC. 2007. Radical scavenging ability of phenolic compounds towards DPPH free radical. Talanta 71: 230-235.
- Yesil-Celiktas O, Hames-Kocabas EE, Bedir E, Vardar-Sukan F, Ozek T, Baser KHC. 2005. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chemistry. 100(2007):553-559.
- Youngson R. 2003. Antioxidantes y radicales libres. Editorial Edaf, S.A. Madrid, España. p. 171.