

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UAG, México
Facultad de Biología e Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana
Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de México

Actividad antibacteriana de *Diphysa minutifolia* Rose

Prof. Senovio Avellaneda Saucedo,¹ Dra. Nidia M. Rojas Hernández,² Dr. Armando Cuéllar Cuéllar³ y MSc. Rosa María Fonseca Juárez⁴

Resumen

Se realizó análisis fitoquímico y de la actividad antibacteriana del extracto alcohólico de la corteza de *Diphysa minutifolia* Rose (Leguminaceae), colectada de la Región Tierra Caliente del Estado de Guerrero, México. El estudio químico cualitativo del extracto sugirió la presencia de compuestos reductores, flavonoides, fenoles y taninos. Para determinar su posible efecto antibacteriano, el extracto se enfrentó a 33 cepas bacterianas de la colección ATCC y de otros orígenes por el método de difusión radial en monocapa en medio con agar y con pocillos cilíndricos. La concentración máxima del extracto evaluado fue 100 mg/mL. Se determinó que el extracto alcohólico posee actividad inhibitoria frente al 84,3 % de las cepas bacterianas probadas incluyendo Gram positivas y Gram negativas y que su efecto es bacteriostático y bactericida. Para valores de concentración mínima inhibitoria de 100 mg/mL, este extracto presentó baja actividad sobre el 37,0 % de las cepas probadas, con valores entre 25 y 50 mg/mL mostró mediana actividad sobre el 29,6 % de las cepas y para valores de concentración mínima inhibitoria inferiores a 12,5 mg/mL, tuvo elevada actividad sobre el 33,3 % de las cepas. El extracto presentó efecto bactericida sobre el 66,6 % de las cepas bacterianas inhibidas (54,4 % del total de cepas ensayadas). Se requieren estudios posteriores para dilucidar la naturaleza de los principios activos de la corteza del tronco de esta planta, responsables de las propiedades antibacterianas del extracto evaluado.

Palabras clave: *Diphysa minutifolia* Rose, extracto alcohólico, actividad bacteriostática, bactericida.

A través de la historia, la medicina tradicional y su práctica han permitido conocer el uso de plantas para el tratamiento de diversas enfermedades. En México existe una antigua tradición en el uso de plantas medicinales.¹ Actualmente 1 024 plantas se emplean con fines curativos pero la mayoría no poseen suficientes estudios que avalen las propiedades que se les atribuyen en medicina folklórica. Esto explica que en ocasiones los resultados obtenidos de su uso no sean satisfactorios.²

En la actualidad, numerosas investigaciones están encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales, mientras otras están destinadas a verificar las

propiedades que se les atribuyen. Muchos de estos trabajos han permitido validar el uso de especies vegetales empleadas en medicina tradicional.³

Diphysa minutifolia Rose (Leguminaceae) se conoce como Shure en Tierra Caliente, región del Estado de Guerrero, México, donde con la corteza del tronco se prepara una infusión para el tratamiento empírico de las diarreas. No existen trabajos que avalen la actividad curativa de esta planta.

D. minutifolia es un arbolillo de 4 a 5 m de altura de corteza áspera color café oscuro que crece en las sabanas estériles.³ Florece durante el mes de junio con flores pequeñas de color amarillo y fruto globoso, rugoso con semillas color café.

Con el propósito de conocer si la propiedad antidiarreica que se le atribuye al Shure, se debe a la presencia de actividad antibacteriana, en el presente trabajo se evalúa el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de su corteza.

Métodos

Material vegetal. Luego de realizar una pesquisa entre la población de la Región Tierra Caliente que emplea usualmente remedios tradicionales, de un total de 150 plantas medicinales referidas, se seleccionaron 30 encuestas cuyos datos indicaban una posible actividad antimicrobiana.

De ellas, el 10 % señalaron a la planta conocida comúnmente como Shure, cuya clasificación taxonómica correspondió a *Diphysa minutifolia* Rose (Leguminaceae), luego de realizar la caracterización botánica de la muestra depositada a nombre de *Senovio Avellaneda* con el número 7 en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el Laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias, también de la UNAM.⁴

En todas las encuestas sobre el uso y características de esta especie, coincidió su empleo como infusión preparada con la corteza del arbusto y tomada durante 3 días para el tratamiento de las diarreas. Su uso fue informado por personas conocedoras de plantas medicinales de los municipios de Cutzamala de Pinzón, Pungarabato y Tlalchapa, de Tierra Caliente, Guerrero, México.

La corteza de la planta se colectó entre las 9:00 y 10:00 horas de la mañana en el municipio Cutzamala de Pinzón durante el mes de junio de 2004. Las muestras se secaron a la sombra y se redujeron a polvo con un molino.

Preparación de los extractos

Se pesaron 100 g de la droga seca y molida (corteza), los cuales se extrajeron en forma continua con un equipo Soxhlet durante 12 h con 75 mL de etanol. El extracto se concentró a sequedad (residuo de extracción 24 % en peso con respecto a la planta de partida). Al extracto etanólico se le realizó un

estudio fitoquímico general para tener un conocimiento preliminar de los posibles compuestos presentes.⁵

Evaluación de la actividad antibacteriana

Se emplearon 33 cepas bacterianas cuya relación se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. *Relación de cepas bacterianas empleadas*

Cepa	Origen	Cepa	Origen
<i>Salmonella typhi</i>	7251*	<i>Bacillus subtilis</i>	6633*
<i>Salmonella tiphymurim</i>	14028*	<i>Bacillus subtilis</i>	ambiental
<i>Salmonella enteritidis</i>	13076*	<i>Bacillus thuringiensis</i>	LABIOFAM
<i>Serratia marcescens</i>	14056*	<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048*
<i>Serratia marcescens</i>	8100*	<i>Enterobacter cloacae</i>	23355*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883*	<i>Shigella flexneri</i>	12022*
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1460*	<i>Proteus vulgaris</i>	13315*
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615*	<i>Proteus mirabilis</i>	7002*
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212*	<i>Proteus mirabilis</i>	12453
<i>Escherichia coli</i>	35150*	<i>Providencia sp.</i>	c-3450
<i>Escherichia coli</i>	25922*	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	PM 18
<i>Escherichia coli</i>	8739*	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	PAL-5 Vegetal
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923*	<i>Enterococcus faecium</i>	6056*

<i>Staphylococcus aureus</i>	6538*	<i>Micrococcus luteus</i>	ambiental
<i>Staphylococcus aureus</i>	33862*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027*
<i>Citrobacter freundii</i>	8090*	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853*
<i>Citrobacter freundii</i>	10625*		

*: ATCC

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se detectó por el método de difusión radial en monocapa en medio con agar (Rojas NM, Avellaneda S, Romeu B. Evaluación de la actividad antimicrobiana en productos naturales. Fuente potencial de compuestos bioactivos. Segundo Congreso de Geografía Tropical. La Habana, Cuba; 2004) y con las cepas sensibles se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) por el método de dilución en caldo, con pases a medio agar nutriente a las 24 h de incubación.⁶ La concentración final de inóculo bacteriano fue de 7×10^5 ufc/mL.⁶

Para la determinación de la CMI, el extracto alcohólico se añadió en pocillos cilíndricos de 3 mm de diámetro, practicados en medio con agar y se utilizó etanol como control. Se realizaron 3 réplicas para cada una de las cepas empleadas.

La incubación se efectuó a 35° C durante 24 h. Se consideró presencia de actividad antibacteriana a la detección de halos de inhibición del crecimiento en torno al pocillo con extracto alcohólico. A todas las cepas que resultaron inhibidas se les determinó la CMB. Se consideró actividad bactericida a la ausencia de crecimiento bacteriano en la resiembra de medio agar nutriente después de 24 h de incubación.⁷

Resultados

El análisis químico cualitativo del extracto etanólico de *D. minutifolia*, sugirió la presencia de compuestos reductores, flavonoides, fenoles y taninos.

En la tabla 2 se aprecia la inhibición de 27 de las cepas bacterianas enfrentadas al extracto de *D. minutifolia*. Esto representa el 84,3 % del total de cultivos analizados.

Tabla 2. Efecto del extracto etanólico de *D. minutifolia* (100 mg/mL) frente a las cepas bacterianas

Cepas	Origen	Efec	Cepas	Origen	Efec.

<i>S. typhi</i>	7251	S	<i>B. subtilis</i>	6633	S
<i>S. tiphymurium</i>	14028	S	<i>B. subtilis</i>	ambiental	S
<i>S. enteritidis</i>	13076	S	<i>B. thuringiensis</i>	LABIOFAM	S
<i>S. marcescens</i>	14056	S	<i>E. aerogenes</i>	13048	R
<i>S. marcescens</i>	8100	R	<i>E. cloacae</i>	23355	R
<i>K. pneumoniae</i>	13883	S	<i>S. flexneri</i>	12022	S
<i>A. faecalis</i>	14060	S	<i>P. vulgaris</i>	13315	S
<i>S. pyogenes</i>	19615	S	<i>P. mirabilis</i>	7002	S
<i>E. faecalis</i>	29212	S	<i>P. mirabilis</i>	12453	S
<i>E. coli</i>	35150	S	<i>Providencia sp.</i>	c-3450	S
<i>E. coli</i>	25922	R	<i>G. diazotrophicus</i>	PM-18	R
<i>E. coli</i>	8739	S	<i>G. diazotrophicus</i>	PAL-5	S
<i>S. aureus</i>	25923	S	<i>E. faecium</i>	6056	S
<i>S. aureus</i>	6538	S	<i>M. luteus</i>	ambiental	R
<i>S. aureus</i>	33862	S	<i>P. aeruginosa</i>	9027	S
<i>C. freundii</i>	8090	S	<i>P. aeruginosa</i>	27853	S
<i>C. freundii</i>	10625	S			

R: resistente, S: sensible

Es preciso señalar la heterogeneidad de la acción antibacteriana en distintas cepas de una misma especie, como ocurrió en los 2 cultivos de *S. marcescens*, de los cuales la cepa 14056 fue inhibida, pero la 8100 fue resistente. Un efecto similar ocurrió en las 2 cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

Del total de cepas Gram positivas empleadas, el 90 % fue inhibida, mientras que en las cepas Gram negativas la inhibición se detectó sólo en el 69,5 %. A pesar de que el número de cepas Gram positivas no fue igual que el de Gram negativas, la actividad antibacteriana fue más evidente sobre las primeras.

Como se observa en la tabla 3, la mayor CMI del extracto fue 0,37 mg/mL, que correspondió a la especie esporógena *Bacillus subtilis* de origen ambiental, mientras otras cepas de esta especie y otras especies esporógenas del mismo género tuvieron valores diferentes de CMI.

Si se clasifican las cepas de acuerdo a su sensibilidad y se consideran como muy sensibles las cepas con valores de CMI inferiores a 12,5 mg/ mL, hubo 7 cepas para un 25,9 % que se pueden evaluar como muy sensibles. Con sensibilidad mediana (CMI entre 50 y 25 mg/ mL) se clasificaron 10 cepas para un 37,0 % y con baja sensibilidad, (CMI igual a 100 mg/mL), 10 cepas, lo cual correspondió al 37,0 %. Esto da una idea de la actividad antibacteriana presente en el extracto de esta planta.

Tabla 3. Valores de CMI (mg/mL) del extracto etanólico de *D. minutifolia*

Cepas	Origen	CMI	Cepas	Origen	CMI
<i>S. typhi</i>	7251	50	<i>C. freundii</i>	8090	100
<i>S. typhimurium</i>	14028	100	<i>C. freundii</i>	10625	100
<i>S. enteritidis</i>	13076	100	<i>B. subtilis</i>	6633	50
<i>S. marcescens</i>	14056	50	<i>B. subtilis</i>	ambiental	0,37
<i>K. pneumoniae</i>	13883	50	<i>B. thuringiensis</i>	LABIOFAM	6,25
<i>Providencia sp</i>	C-3450	100	<i>P. mirabilis</i>	12453	100
<i>A. faecalis</i>	29212	50	<i>P. mirabilis</i>	7002	100
<i>E. faecalis</i>	1460	6,25	<i>P. vulgaris</i>	13315	50

<i>E. faecium</i>	6056	12,5	<i>P. aeruginosa</i>	9027	50
<i>E. coli</i>	35150	3,2	<i>P. aeruginosa</i>	27853	100
<i>E. coli</i>	8739	12, 5	<i>S. flexneri</i>	12022	12,5
<i>S. aureus</i>	25923	100	<i>S. pyogenes</i>	19615	25
<i>S. aureus</i>	6538	3,2	<i>G. diazotrophicus</i>	PAL-5	100
<i>S. aureus</i>	33862	6,25			

En la tabla 4 se observa que 18 de las 33 cepas analizadas presentaron efecto letal frente al extracto etanólico de la corteza de esta planta, lo cual correspondió al 54,4 % y sólo 9 de las 27 cepas inhibidas no sufrieron efecto letal.

Tabla 4. Valores de CMB (mg/mL) del extracto etanólico total de *D. minutifolia* frente a las cepas que presentaron efecto biocida

Cepas		CMB	Cepas		CMB
<i>S. typhi</i>	7251	12,5	<i>S. aureus</i>	6538	100
<i>S. typhimurium</i>	14028	100	<i>S. aureus</i>	33862	100
<i>S. enteritidis</i>	13076	100	<i>S. flexneri</i>	12022	100
<i>K. pneumoniae</i>	13883	100	<i>C. freundii</i>	8090	100
<i>E. faecalis</i>	29212	12,5	<i>C. freundii</i>	10625	100
<i>E. faecium</i>	6056	100	<i>B. subtilis</i>	6633	25
<i>E. coli</i>	35150	3,2	<i>B. subtilis</i>	Amb.	100

<i>E. coli</i>	8739	12,5	<i>P. mirabilis</i>	7002	100
<i>S. aureus</i>	25923	100	<i>P. vulgaris</i>	13315	50

Cabe señalar que para 10 cepas del total probadas, el efecto inhibitorio se mostró sólo a la máxima concentración evaluada (100 mg/mL), lo que correspondió al 37,0 %, mientras que en 8 cepas la CMI estuvo entre 50-25 mg/mL y correspondió a 29,6 %.

Hubo 9 cepas del total de cultivos estudiados (33,3 %) con CMI bajas, lo que indicó que para estas cepas, el extracto fue muy activo.

Respecto a los valores de CMB, para el 66,6 % de las cepas el extracto se puede clasificar como poco activo (100 mg/mL), frente al 11,1 % de las cepas que presentaron actividad intermedia y el 22,2 % de las cepas tuvieron efectos letales con CMB de valores bajos (menores a 25 mg/mL), lo que indica una alta actividad del extracto frente a ellas.

El extracto evaluado, mostró un efecto bactericida *in vitro* frente al 70,0 % de las cepas Gram positivas y al 47,8 % de las Gram negativas empleadas en este trabajo (entre las 33 cepas empleadas hay 10 que son Gram positivas y 23 Gram negativas, por tanto estos porcentajes se refieren a las cepas de cada tipo empleadas en el trabajo).

Discusión

Es notable el hecho de que *D. minutifolia* Rose, conocida como Shure, no aparece informada como medicinal en los textos de medicina tradicional mexicana,^{1,2} a pesar de emplearse frecuentemente su decocción por la población para el tratamiento de las diarreas en los municipios de Cutzamala de Pinzón, Pungarabato y Tlalchapa, los 3 de Tierra Caliente, estado de Guerrero. Esto puede explicar la ausencia de trabajos anteriores en los que se aborde el estudio fitoquímico de esta planta, ni sobre los componentes de esta especie vegetal en la literatura científica, por lo cual no hay forma de comparar los resultados obtenidos en este trabajo con los de otros autores.

El análisis del extracto de la corteza de *D. minutifolia* demostró que en él se encuentran compuestos bioactivos capaces de ejercer actividad bacteriostática frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Este es el primer estudio de la actividad antibacteriana de esta especie.

El extracto etanólico de *Diphysa robinoides* (otra especie de este género) a concentración de 50 mg/mL⁷ mostró actividad antifúngica frente a hongos patógenos humanos como *Epidermophyton floccosum* y *Tricophyton rubrum*.

También en un análisis de 84 plantas americanas para evaluar su actividad antibacteriana frente a enterobacterias, se señaló a *Diphysa robinoides* entre las de mayor actividad.⁸

Castro y otros en 1986 demostraron actividad antibacteriana en extractos de madera de *D. robinoides*.⁹ El aislamiento e identificación del trans-3,3',4'-5,5' pentahidroxiestilbeno en estos extractos y el conocimiento de las propiedades antimicrobianas de los estilbenos, indujeron a estos autores a pensar que la actividad presente en los extractos de esa especie, se debe a ese compuesto. La carencia de estudios anteriores sobre la composición química de *D. minutifolia* no permitió conocer si la actividad antibacteriana encontrada en el presente trabajo se debe a uno o más principios activos en la corteza de esta especie vegetal.

Los trabajos realizados en otras especies del género *Diphysa* y que demostraron la presencia de actividad antimicrobiana apoyan los resultados de este trabajo correspondientes a la especie *D. minutifolia* Rose, lo cual pudiera deberse a la presencia de determinados compuestos comunes en las especies del género *Diphysa*.

Finalmente se puede concluir que se requieren estudios posteriores para dilucidar la naturaleza de los principios activos de la corteza del tronco de esta planta, responsables de las propiedades antibacterianas del extracto evaluado.

Summary

Antibacterial activity of *Diphysa minutifolia* Rose

Phytochemical and antibacterial action analyses of the alcoholic extract from the wood of *Diphysa minutifolia* Rose (Leguminaceae), collected in Tierra Caliente region, Guerrero state in Mexico, were carried out. The qualitative chemical study of the extract suggested the presence of reducing compounds, flavonoids, phenols and tanins. With the objective of determining the possible antibacterial effect, the extract was used in 33 bacterial strains from ATCC collection and from other origins by radial one-layer diffusion in agar, with round microwells. The maximum extract concentration was 100 mg/mL. It was determined that the evaluated alcoholic extract has inhibitory action against 84.3 % of the tested bacterial strains, including Gram positive and Gram negative, and also bacteriostatic and bactericidal effect. For minimal inhibitory concentration values equal to 100 mg/mL, the extract showed low inhibitory activity upon 37 % of the tested strains; with concentration values from 25 to 50 mg/mL, it showed medium activity on 29.6 % of strains whereas for minimal inhibitory concentration values under 12.5 mg/mL, its action was high on 33.3 % of the strains. The extract exhibited bactericidal effect on 66.6 % of inhibited bacterial strains (54.4 % of total tested strains). Further studies are required to clarify the nature of the active principles of this plant wood, which are responsible for the antibacterial properties of the evaluated extract.

Key words: *Diphysa minutifolia* Rose, alcoholic extract, bacteriostatic activity, bactericidal.

Referencias bibliográficas

1. Martínez M. Las Plantas Medicinales de México. 6ta ed. México, DF: Editorial Botas; 1996. p. 656.
2. Jiménez M, Ruiz R, Navarro A, Hernández JM, Reyes R. Plantas usadas en México para curar la diarrea (estudio químico y bacteriológico). Rev Cubana Quím. 2000;13(2):4-22.
3. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. 1ra ed. Ciudad Guatemala:Editorial Universitaria; 1996. p. 596.
4. Avellaneda Saucedo S, Rojas Hernández NM, Cuéllar Cuéllar A, Diego N, Juárez V. Validación de la actividad antibacteriana de plantas medicinales empleadas en Tierra Caliente (Guerrero) [CD-ROM]. La Habana: Convención Trópico; 2004.
5. Miranda M, Cuéllar A, Manual de Prácticas del Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Instituto de Farmacia y Alimentos. La Habana: Editorial Universidad de La Habana; 2000:53-66.
6. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. Bailey / Scott Diagnostic Microbiology. 9th ed. EE.UU.: Mosby Editors, 1994:190-210.
7. Cáceres A, López B, Juárez X, Del Aguila J, Garcia S. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections: evaluation of antifungal activity of seven American plants. J Ethnopharmacol. 1993;40(3):207-13.
8. Cáceres A, Cano O, Samayoa B, Aguilar L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders I. Screening of 84 plants against enterobacteria. J Ethnopharmacol. 1990;30(1):55-78.
9. Castro A, López JA, Vergara A, Stermitz FR, Gardner DR. Isoflavonas and a stilbeno from wood of the decay-resistant tropical tree *Diphysa robinoides*. J Nat Prod. 1986;49(4):680-3.

Recibido: 29 de diciembre de 2004. Aprobado: 22 de julio de 2005.

QFB *Senovio Avellaneda Saucedo*. Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana. La Habana, Cuba.

Teléfono: 8329241, 2091149. e- mail: nidia.rojas@infomed.sld.cu y sauceavel@yahoo.com.mx

¹ Químico Farmacéutico Biólogo. Profesor.

² Doctora en Ciencias Biológicas. Máster en Ciencias. Investigadora Titular. Profesora Auxiliar.

³ Doctor en Ciencias Químicas. Máster en Ciencias. Profesor Titular.