

## EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Annona muricata* L. FRENTE A *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Yaima Henry García<sup>1</sup>; David Rajme Manzur<sup>1</sup>; Jorge Luis Mendoza González<sup>1</sup>; Tania Campos Cuello<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Empresa Productora de Vacunas Virales y Bacterianas. Grupo Empresarial LABIOFAM. Ave. Independencia km 16 ½. La Habana, Cuba. E-mail: esp4.desarrolloup7@labiofam.co.cu Recibido 12 abril 2016, aceptado 1 julio 2016.

Artículo Científico

### RESUMEN

El guanábano (*Annona muricata* L.) es una planta cuyo origen es la parte tropical de Sudamérica. Se ha identificado en extractos etanólicos de hojas de *A. muricata* la presencia de flavonoides a los cuales se han atribuido propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antibacterianas. Estudios recientes han reportado la acción antibacteriana de extractos de hojas de *A. muricata* frente a bacterias Gram positivas. Erisipela Porcina es una enfermedad bacteriana aguda que se manifiesta en varias formas y afecta principalmente a los cerdos en crecimiento. Su agente etiológico es la *E. rhusiopathiae*, bacteria Gram positiva. El objetivo de dicho estudio fue evaluar mediante la prueba de sensibilidad *in vitro* por difusión en disco, la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *A. muricata* frente a un bacilo Gram positivo por el método de Bauer-Kirby. Para ello se realizó la

extracción en zaranda del material vegetal previamente seco y molido empleando etanol al 75 % como disolvente, una relación material vegetal-volumen de disolvente 1:20 por un tiempo de 1 h y a 50°C. Dicho extracto se concentró, se liofilizó y se evaluó a dos concentraciones 500 y 250 mg/mL. Se empleó solución salina como control negativo y el combiótico Penicilina-Estreptomicina como control positivo. Se determinó que la bacteria es susceptible a la concentración del extracto de 500 mg/mL según lo establecido por Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014. El extracto etanólico de hojas de *A. muricata* puede ser empleado con fines bactericidas en la industria veterinaria.

**Palabras claves:** *Annona muricata*, flavonoides, susceptibilidad *in vitro*

### SUMMARY

Soursop (*Annona muricata* L.) is a plant whose origin is in the tropical South America. Presence of flavonoids has been identified in ethanolic extracts of leaves of *A. muricata* the presence of flavonoids which have been attributed antioxidants, anticancerigen and antibacterial properties. Recent studies have reported the antibacterial action of leaf extracts of *A. muricata* against Gram positive bacteria. Porcine erysipelas is an acute bacterial disease that manifests itself in various forms and mainly affects growing pigs. Its etiologic agent is *E. rhusiopathiae*, a Gram positive bacteria. The aim of this study is to evaluate by means of *in vitro* susceptibility test of disk diffusion the antibacterial activity of ethanol extract of *A. muricata* against Gram positive bacilli by Kirby-Bauer method. For

this the extraction of leaves previously dried and milled was performed using 75% ethanol as a solvent, a ratio plant material - solvent volume 1:20, for a time of 1 h and 50°C. This extract was concentrated and lyophilized and evaluated at two concentrations 500 and 250 mg/mL. It was used saline solution as a negative control and a combination of Penicillin-Streptomycin as a positive control. It was determined that the bacteria is susceptible to extract concentration of 500 mg/mL as established by Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014. The ethanolic extract of leaves of *A. muricata* can be employed with bactericide purposes in veterinary industry. **Keywords:** *Annona muricata*, flavonoids, *in vitro* susceptibility.

## INTRODUCCIÓN

Los materiales vegetales son recursos invaluable, los cuales proveen un medio inagotable de materia prima a las industrias farmacéutica, cosmética y de alimentos (Massibo, 2008).

Las plantas medicinales representan el 25% del total de las prescripciones médicas en los países industrializados; en los países en desarrollo su uso representa el 80% del arsenal terapéutico. Debido a esto, las grandes transnacionales tienen como objetivo primordial la búsqueda de nuevas fuentes de principios activos de origen vegetal y tienen en cuenta la amplia riqueza biótica presente en el planeta, donde existen aún regiones sin explorar (Sharapin, 2000; Vinatoru, 2001).

La *Annona muricata* L. también popularmente conocida como guanábana es un pequeño árbol perteneciente a la familia *Annonaceae*, género *Annona*. Es una planta de fruto comestible y se destaca por su aromática, subácida y jugosa pulpa (Lock y col., 2003).

Los flavonoides son metabolitos secundarios que se encuentran en todas las partes de las plantas, y cumplen una función protectora de ella y sus frutos. Así como estos compuestos tienen una función relevante en la planta, también cobran importancia farmacéutica.

Se ha identificado en extractos etanólicos de hojas de *A. muricata* la presencia de flavonoides, a los

cuales se les atribuyen actividades farmacológicas tales como: antidiabética, antibacteriana, antiinflamatoria y antioxidante (Pérez y col., 2013; Gaitén y col., 2012) y en el año 2006 se realizó un estudio en el que se demostró el efecto antibacteriano de extractos de *A. muricata* sobre las bacterias *S.aureus* y *S. subtilis* (Takahashi y col., 2006).

En los Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM) se elaboran productos biológicos y farmacéuticos veterinarios para prevenir y/o controlar algunas de las enfermedades que afectan a los animales como es el caso de la vacuna viva contra la Erisipela porcina o Mal Rojo como también se le llama. Esta patología causa pérdidas económicas y es una enfermedad bacteriana aguda, que se manifiesta en varias formas y afecta principalmente a los cerdos en crecimiento. Es de distribución mundial y común en áreas donde se crían cerdos. El Mal Rojo es una zoonosis típicamente ocupacional. Su agente etiológico es *E. rhusiopathiae*, bacilo Gram positivo, no móvil, no formador de esporas, facultativamente intracelular y con una alta sobrevivencia en los neutrófilos del cerdo, que puede ser eliminado con el uso de los antibióticos como la penicilina y/ amoxicilina, pero el uso irracional de los mismos en los últimos años ha creado resistencia por parte de las bacterias de ahí la importancia de emplear antibióticos naturales como alternativa terapéutica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

En los ensayos experimentales del proceso de extracción se utilizó hojas de *A. muricata* recolectadas de forma manual entre los meses de marzo y mayo de 2013 en LABIOFAM a las 7:30 am. Las hojas previamente molidas (3 -5 mm de tamaño de partículas) en un molino de cuchillas modelo CEMOTEC 1090 se secaron en estufa

eléctrica con recirculación de aire a 38 °C, durante un tiempo de 72 h.

### Caracterización físico-química del material vegetal

La caracterización físico-química del material vegetal se realizó mediante un tamizaje fotoquímico según lo reportado por Wagner y Bladt en el año 2001.

Para ello se pesó alrededor de 1g y se añadieron 20 mL de metanol. Se aplicó ultrasonido en un baño ultrasónico que trabaja a una potencia de 150 W y frecuencia de 40 kHz durante 20 min. Se filtró la solución resultante y el material no disuelto se le añadieron 20 mL de metanol, aplicando el mismo procedimiento 4 veces más. Se colectaron los filtrados y se concentró a presión reducida hasta obtener alrededor de 5 mL.

#### Obtención del extracto etanólico de hojas de *A. muricata*

Para llevar a cabo la extracción de las hojas se emplearon 5 g del material vegetal y etanol al 70% como disolvente. Para esto se pesaron en una balanza analítica 5 g del material vegetal y se mezclaron con 100 mL del disolvente. Dicha extracción se realizó durante un tiempo de 1 h, en una zaranda a 50 °C y relación material vegetal-volumen de disolvente 1:20. La velocidad de agitación fue de 138 rpm. Posteriormente se separó el extracto del residuo vegetal mediante filtración bajo presión reducida empleando lona de lienzo como medio filtrante.

#### Cuantificación del contenido de flavonoides presente en el extracto etanólico de *A. muricata*

La determinación se realizó empleando un método colorimétrico por reacción con cloruro de aluminio en metanol a 430 nm expresados como quercetina. Para esto se utilizó un espectrofotómetro modelo SPECTRONIC®GENESYSTM2 (Spectronic Instruments) (Ochoa y col., 2006).

#### Liofilización del extracto etanólico de hojas de *A. muricata*

El extracto obtenido se sometió a un proceso de concentración hasta obtener una concentración de etanol de un 30% y posteriormente se sometió a un proceso de liofilización en un Liofilizador USIFROID que posee una unidad condensadora de 60 Kg de H<sub>2</sub>O y opera en un rango de temperatura de -60 a -80 °C. Se empleó como estabilizador gelatina al 10%.

#### Estudio de susceptibilidad antimicrobiana frente a la bacteria *E. rhusiopathiae*

El estudio de susceptibilidad antimicrobiana se realizó por el método de Bauer- Kirby (Clavell L, 1992). Las tabletas obtenidas del proceso de liofilización se restituyeron con solución salina y se trabajaron dos concentraciones diferentes 250 mg/mL y 500 mg/mL. Dichas concentraciones también fueron empleadas por Abadie R y col. en un estudio realizado en octubre del año 2014. Se utilizó papel filtro Whatman N°3 y un perforador convencional para confeccionar los discos, que fueron esterilizados en el horno a 180°C por 1.5 horas; los mismos se embebieron en el producto y se dejaron secar durante 24 h a temperatura ambiente. Se empleó una muestra control negativa de solución salina y una control positiva con una mezcla de penicilina y estreptomicina (combiótico).

Usualmente en el proceso productivo de la vacuna viva de Erisipela Porcina elaborada a partir de una cepa bacteriana atenuada, obtenida del Instituto BRATZA, Bulgaria NTPVVL (VR2), se emplea como medio de crecimiento de la misma agar soya triptona, ya que es un medio general que presenta todos los requerimientos necesarios para que se expresen las bacterias y a su vez resulta más económica su adquisición. Debido a lo anterior descrito, en el estudio se utilizó placas de agar soya triptona para medir la acción del antibiótico de referencia frente al microorganismo.

Para comprobar la eficacia del producto natural se utilizaron placas de agar sangre ya que se visualiza mejor la morfología de las colonias así como su actividad hemolítica por lo que ha sido empleado por diferentes investigadores (Campos E y col., 2015; Chocos P y col., 2009)

#### Análisis estadístico de los resultados

Una vez obtenido los resultados se analizaron empleando el programa estadístico STATGRAPHICS PLUS 5.1 para analizar si eran o no estadísticamente diferentes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización físico-química del material vegetal

**Cuadro 1.** Tamizaje fitoquímico realizado al material vegetal

| Metabolito                             | Fase móvil                                                                                                | Revelador                                                 | Resultado |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------|
| Saponinas                              | Butanol: Agua: Acetato de Etilo(20:10:5)<br>Cloroformo: Metanol: Agua (13:7:2)                            | Vainillina: Sulfúrico<br>Ácido Sulfúrico 10%              | +         |
| Aminoácidos y Aminoas                  | Isopropanol: Acetato de Etilo: Ácido Fórmico (3:2:1)                                                      | Ninhidrina                                                | +         |
| Fosfolípidos                           | Cloroformo: Metanol: Acetona : Agua (18:15:2:1)                                                           | Ácido Fosfomolibdico 10%                                  | -         |
| Flavonoides                            | Acetato de Etilo: Agua: A. Fórmico: A Acético(10:1:1:1)<br>Cloroformo : Metanol: Agua(23:8:1)             | Vapores Amoniacos<br>UV 254<br>Cloruro de Aluminio        | ++        |
| Grasas                                 | Tolueno: Acetato de Etilo(85:15)                                                                          | Ácido Fosfomolibdico 10%                                  | +         |
| Triterpenos                            | Tolueno: Acetato de Etilo(95:5)                                                                           | Anisaldehído-Sulfúrico                                    | ++        |
| Glicósidos<br>Terpenoides              | Cloroformo: Metanol: Amoniacos concentrado(4:1:0.1)<br>n-Butanol: Etanol: Amoniacos conct: Agua (7:2:2:3) | Anisaldehído-Sulfúrico                                    | +         |
| Azúcares y oligosacáridos              | n- propanol: Acetato de Etilo: Agua: Ácido Acético (4:3:2:1)                                              | $\alpha$ - naphtol-Ácido Sulfúrico                        | ++        |
| Alcaloides                             | Cloroformo: Metanol: Amoniacos( 4:1:0.1)                                                                  | Dragendorff                                               | +         |
| Cumarinas y compuestos antraquinonicos | Acetato de Etilo: Metanol: Agua(10:1.5:1)                                                                 | Hidróxido de Potasio 10%<br>Ácido Bórico-Ácido Oxálico    | -         |
| Glicósidos<br>Cardiotónicos            | Acetato de Etilo: Metanol: Agua (100:13.5:10)                                                             | Hidróxido de Potasio 10%                                  | +         |
| Antraglicósidos                        | Acetato de Etilo: Metanol: Agua (100:13.5:10)                                                             | Ácido 3,5- dinitrobenzoico 3%<br>Cloruro de Antimonio III | +         |

**Legenda:** + presencia, ++ abundancia, - ausencia del metabolito

Se identificaron como componentes presentes en las hojas saponinas, aminoácidos y aminoas, grasas, glicósidos terpenoides, alcaloides, glicósidos cardiotónicos, antraglicósidos y en mayor cantidad flavonoides, triterpenos, azúcares y oligosacáridos.

En la literatura consultada se encontraron reportes sobre los usos medicinales de las hojas de la guanábana, así como sus actividades fitoquímicas y farmacológicas y sus mecanismos de acción (Ana V y col, 2016). Si bien aparecen reportes sobre la actividad antibacteriana de otros metabolitos

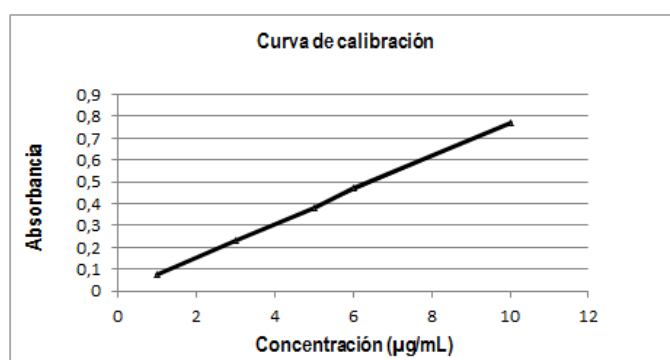
aislados de las hojas de este árbol frutal como es el caso de alcaloides (Boyom y col., 2011; Tsabang y col., 2012 y Radgi y col., 2015), los cuales se encuentran en el extracto, la mayoría de la literatura consultada atribuye dicha actividad a la presencia de flavonoides, de ahí que hacia este metabolito esté referida la investigación. (Roger y col., 2015; Solomon-Wisdom y col., 2014; Bento y col., 2013; Viera y col., 2010; Bussmann y col., 2010; y Tereschuk M y col., 2007).

Cuantificación del contenido de flavonoides presente en el extracto etanólico de *A. muricata*

Después de realizado el proceso de extracción se obtuvo un contenido de flavonoides de 0.15 mg/g mat.veg seco. Para ello se empleó una curva de calibración de flavonoides totales en base a quercetina, la cual se muestra en la Figura 1. La ecuación del modelo obtenido fue:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/g}) = (\text{ABS} - (-0,0018)) / 0,0774$$

$$R^2 = 0,999$$



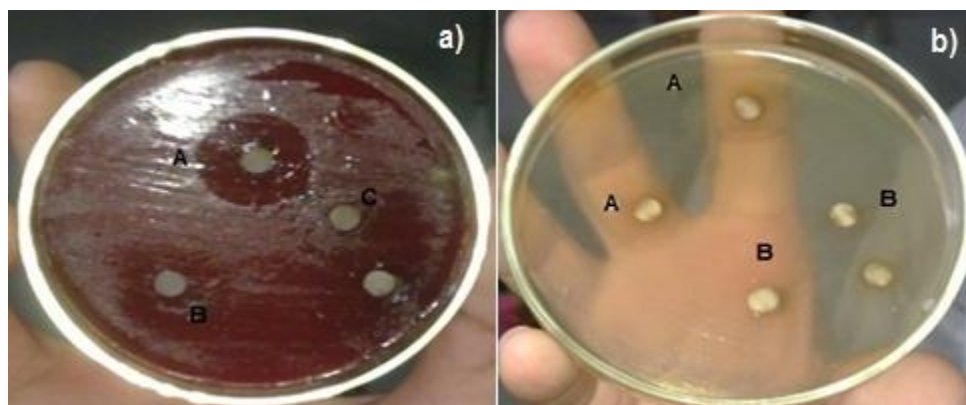
**Figura 1.** Curva de calibración de flavonoides en base de quercetina

Susceptibilidad antimicrobiana extracto etanólico de *A. muricata*, a través de estudios *in vitro* frente a la bacteria *E. rhusiopathiae*.

Al realizar la prueba de sensibilidad *in vitro* mediante difusión en disco (Figura 2a) se comprobó la acción antibacteriana del producto a ambas concentraciones pues se obtuvo inhibición en ambos casos. Estos resultados coinciden con lo planteado por Viera y col en el año 2010 cuando demostraron que el efecto del extracto

hidroalcohólico de la hoja de *A. muricata*, presentó actividad antibacteriana frente a las 19 cepas de *Staphylococcus aureus*. En el caso del control negativo la bacteria logró crecer sin dificultad alrededor del disco.

En la Figura 2b se puede apreciar el efecto de la bacteria *E. rhusiopathiae* frente al combiótico Penicilina-Estreptomicina elaborado en LABIOFAM y al control negativo de solución salina.



**Figura 2. a)** Susceptibilidad antimicrobiana de la bacteria *Erysipelothrix rhusiopathiae* empleando agar sangre. A: Producto a la concentración de 500 mg/mL, B: Producto a la concentración de 250 mg/mL, C: Control negativo (solución salina). **b)** Susceptibilidad antimicrobiana de la bacteria *Erysipelothrix rhusiopathiae* empleando agar soya triptona. A: Combiótico de Penicilina- Estreptomina y B: Control negativo (solución salina).

Al analizar los diámetros del halo inhibitorio de cada concentración utilizada (Cuadros 1 y 2) se pudo apreciar que existe mayor susceptibilidad antimicrobiana cuando se empleó la concentración de 500 mg/mL de extracto etanólico de *A. muricata*, obteniendo un halo de inhibición de 25 mm, mientras que al emplear la concentración de 250 mg/mL se obtuvo un halo de inhibición de 18 mm, coincidiendo con el alcanzado por el combiótico. El resultado obtenido coincide con otros descritos en la literatura, que plantean la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de *A. muricata* (Abadie y col, 2014; Viera y col, 2010).

Por otro lado un extracto etanólico de hojas de *A. muricata* mostró actividad frente al *S. aureus* con

una MIC= 128 mg/mL. Dichos resultados fueron obtenidos por Bussmann y col, 2010 y Bento y col, 2013.

Es importante destacar que los resultados obtenidos por el producto a la concentración de 500 mg/mL son muy alentadores pues para considerar que la *E. rhusiopathiae* es susceptible, la zona del halo de inhibición frente al fármaco de referencia debe ser  $\geq 24$  mm, siendo a su vez menor que el obtenido con el producto en estudio (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014; Guía de Terapéutica Antimicrobiana del Área Aljarafe, 2012).

**Cuadro 2.** Halos inhibitorios de la bacteria frente al producto

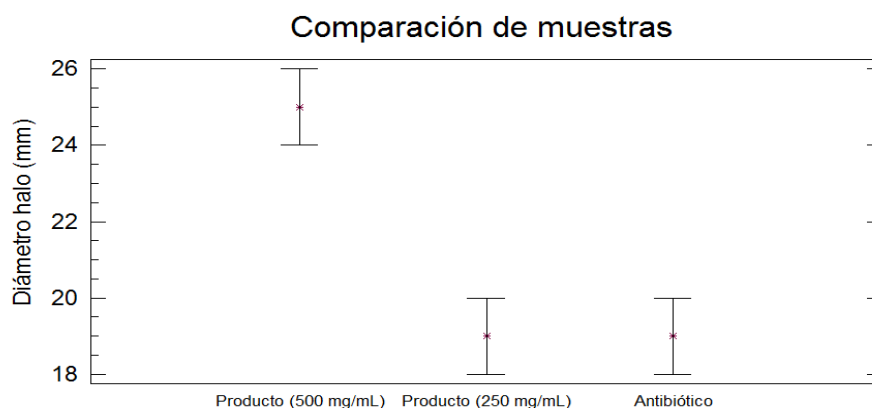
| Producto | Descripción     | Diámetro halo inhibitorio |
|----------|-----------------|---------------------------|
| A        | 500 mg/mL       | 25 mm                     |
| B        | 250 mg/mL       | 18 mm                     |
| C        | Solución salina | -                         |

El análisis estadístico realizado a partir de los valores de los diámetros obtenidos arrojó que existen diferencias estadísticamente significativas

**Cuadro 3.** Halos inhibitorios de la bacteria frente al combiótico

| Producto | Descripción     | Diámetro halo inhibitorio |
|----------|-----------------|---------------------------|
| A        | Combiótico      | 18 mm                     |
| B        | Solución salina | -                         |

entre las variables estudiadas para un valor de probabilidad menor que 5 % (P- Value  $\leq 0.05$ ). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.



**Figura 3.** Comparación de las muestras en estudio

## CONCLUSIONES

Se logró demostrar actividad antimicrobiana contra *Erysipelothrix rhusiopathiae* a la concentración del extracto etanólico de hojas de *A. muricata* de 500 mg/mL según lo establecido por el SLCI, 2014.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadie R; Medina R; Ruiz L; Ayala A (2014). Antibacterial activity of plant extracts against nosocomial strains, Iquitos-Perú. *Revista ECI Perú*: 11(1).
- Bento E.B; Matías E.F; Brito F.E; Oliveira D.R; Coutinho H; Costa J.G y col. (2013). Association between food and drugs: antimicrobial and synergistic activity of *Annona muricata* L. *Int. J. Food Prop.* 16(4), 738-744.
- Boyom F.F; Fokou P.V; Yamthe L.R; Mfopa A.N; Kemgne E.M; Mbacham W.F y col. (2011). Potent antiplasmodial extract from Cameroonian Annonaceae. *J. Ethnopharmacol.* 134, 717-724.
- Bussmann R.W; Malca G; Glenn A; Sharon D; Nielsen B; Parris B y col. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *J. Ethnopharmacol.* 132, 101-108.
- Campos E; Gutiérrez S; Guerra F; De Haro MJ (2015). Aislamiento e identificación de *Erysipelothrix rhusiopathiae* en Guadalajara, Jalisco.
- Chocos P; Ángel M. (2009). Producción y Salud de Porcinos. *Erisipela Porcina*. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias Agrarias. 442 p.
- Clavell L; Pedrique de Aulacio, M (1992). Microbiología. Manual de Métodos Generales. Segunda edición. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.
- Gaitén G; Yamilet I (2012). "Estudio farmacognóstico de *Phyllanthus orbicularis* HBK, especie endémica de Cuba."
- Guía de Terapéutica Antimicrobiana del Área Aljarafe (2012). 2ª edición.
- Lock O; Rojas R (2003). Química y Farmacología de *Annona muricata* Linn. *Revista de Química*; 8(2): 23-8.
- Massibo M; He Q (2008). Major mango polyphenols and their potential significance to human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 7:309-319.
- Ochoa A; Marín J; Rivero D (2006). Caracterización física y química de los extractos totales de *Petiveria alliacea* L. con acción antimicrobiana. Universidad de Oriente. Facultad de Ciencias Naturales. Departamento de Farmacia.
- Pérez N; Cervantes L; Gutiérrez L; Del Toro S (2013). "Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante". *Rev. Cub. Invest. Biomed.* 3: 18-22.
- Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement (2014). M100-S17. Vol. 27, No. 1.
- Radji M; Kurniati M; Kiranasari A (2015). Comparative antimicrobial activity of some Indonesian medicinal plants against multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *JAPS* 5 (01), 19-22.
- Roger T; Pierre-Marie M; Igor V; Patrick V (2015). Phytochemical screening and antibacterial activity of medicinal plants used to treat typhoid fever in Bamboutos division, West Cameroon. *J. Appl. Pharm. Sci.* 5 (06), 034-049.
- Sharapin N (2000). "Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos." 27-60.

Solomon-Wisdom G.O; Ugoh S.C; Mohammed B (2014). Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Annona muricata* (L.) leaf extract. Am. J. Biol. Chem. Pharm. Sci. 2, 1–7.

Takahashi JA; Pereira CR; Pimenta LP; Boaventura MA; Silva LG (2006). Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. Nat Prod Res. Jan: 20(1):21-6.

Tereschuck M.L, Quarenghi M.V., González M, Baigorí M.D (2007). Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de Tagetes del Noa. Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromáticas: Vol.6 (6).

Tsabang N; Fokou P.V; Tchokouaha L.R; Noguem B; Bakamga-Via I; Nguépi M.S y col. Ethnopharmacological survey of Annonaceae

medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroun. J. Ethnopharma-col. 139, 171–180.

Viera F; Mourão A; Ângelo A; Costa R; Viera R (2010). Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo: 52(3)129-132.

Vinatoru M (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry. (8):303-313.

Wagner H; Blatt S (2001). Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. 2th ed., Springer, Germany.