



FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA

**Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos etanólicos obtenidos de las flores de
Crescentia cujete L. frente a patógenos de importancia clínica**

Presentan

Milena Esther Díaz Theran
Código estudiantil: 202012226992

Ana María Nieto Tomases
Código estudiantil: 202012222878

Profesor tutor

Fabián Espitia Almeida, *Ph. D*

Profesor cotutor

Julián Cabrera Barraza, *M. Sc*

Roger Valle Molinares, *Ph. D*

Trabajo de investigación

Aplicada

Octubre 30 de 2023
BARRANQUILLA, ATLÁNTICO
REPÚBLICA DE COLOMBIA



RESUMEN

Los antibióticos han salvado millones de vidas, contribuyendo considerablemente al avance en distintos campos de la medicina y farmacología, sin embargo, el constante surgimiento de bacterias resistentes a antibióticos continúa en auge, convirtiéndose en un problema de salud pública. Se conoce según los datos de la OMS, 2023, que las enfermedades infecciosas en su gran parte son causadas por bacterias patógenas, donde los focos infecciosos se pueden derivar de alimentos contaminados, agua no potable, entidades de salud con gestión hospitalaria baja, entre otros. Asimismo, en los últimos tiempos se han realizado múltiples investigaciones y hallazgos con respecto a nuevas opciones terapéuticas antimicrobianas que puedan ser usadas como alternativas a las terapias convencionales como una respuesta a la alta tasa de resistencia que presentan algunos patógenos. Las plantas se presentan como posibles alternativas para la generación de nuevos tratamientos efectivos contra microorganismos sensibles y resistentes. Por tal motivo, en nuestro estudio se planteó evaluar la actividad antibacteriana de extractos etanólicos obtenidos de las flores de *C. kujete* L. frente a cuatro patógenos de importancia clínica. El estudio presenta tipología experimental con diseño factorial, donde la variable dependiente es el porcentaje de inhibición bacteriana y las variables independientes serán las bacterias, tipo de extracto y la concentración del extracto. El material vegetal (flores de *C. kujete* L.) se recolectó en Puerto Colombia Atlántico y Villanueva Bolívar. El material vegetal se trasladó al laboratorio de Nanotecnología y Química de la Universidad Simón Bolívar, seguidamente, se lavó con una solución 0.5% de hipoclorito de sodio, secado en un horno con flujo de aire continuo a 40°C y trituradas, para la obtención del extracto etanólico se usó el método Soxhlet y completado el tiempo de extracción el producto fue filtrado y secado por rotoevaporación al vacío. Finalmente, se hizo la caracterización fitoquímica preliminar siguiendo los lineamientos descritos por Bilbao 1997 y se determinó la actividad antibacteriana por el método de dilución establecido por el CLSI 2022. Los resultados son soportados por un análisis estadístico que buscó establecer similitudes o diferencias entre cada tratamiento mediante ANOVA de dos vías y un análisis Post Hoc (Tukey) usando el programa Graphpad Prism versión 8.0.1. Como hallazgo principal se obtuvo que el extracto obtenido de las flores recolectadas en el Atlántico resultó tener promisoria actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* y *S. warneri* con 95.2 ± 8.31 y $68.9 \pm 4.96\%$ de inhibición, respectivamente, y el extracto obtenido de las flores recolectadas en Bolívar presentó actividad moderada contra estas mismas dos bacterias con 53 ± 6.31 y 52 ± 2.51 % de inhibición. La variación que existe en las actividades presentadas por las flores de Atlántico y Bolívar se asocia a las diferentes proporciones de metabolitos secundarios tipo triterpenos, esteroides y taninos. Además, es relevante resaltar que ambos extractos resultaron sin actividad contra *S. aureus* y *E. coli*.



Palabras clave: Actividad antibacteriana, *Crescentia cujete*, metabolitos secundarios, flores, extracto etanólicos, resistencia de antibióticos.

ABSTRACT

Antibiotics have saved millions of lives, contributing considerably to the progress in different fields of medicine and pharmacology, however, the constant emergence of antibiotic resistant bacteria continues to grow, becoming a public health problem. According to WHO data, it is known that infectious diseases are mostly caused by pathogenic bacteria, where the infectious sources can be derived from contaminated food, unsafe water, health entities with poor hospital management, among others. Likewise, in recent times there have been multiple researches and findings regarding new antimicrobial therapeutic options that can be used as alternatives to conventional therapies as a response to the high rate of resistance presented by some pathogens. Plants are presented as possible alternatives for the generation of new effective treatments against sensitive and resistant microorganisms. Plants are presented as possible alternatives for the generation of new effective treatments against sensitive and resistant microorganisms. For this reason, our study aimed to evaluate the antibacterial activity of ethanolic extracts obtained from *C. cujete* L. flowers against four pathogens of clinical. The study presents an experimental typology with a factorial design, where the dependent variable is the percentage of bacterial inhibition and the independent variables are the bacteria, type of extract and concentration of the extract. The plant material (flowers of *C. cujete* L) was collected in Puerto Colombia Atlántico and Villanueva Bolívar. The plant material was transferred to the laboratory of Nanotechnology and Chemistry of the Universidad Simón Bolívar, then washed with a 0.5% solution of sodium hypochlorite, dried in an oven with continuous air flow at 40°C and crushed to obtain the ethanolic extract using the Soxhlet method. Finally, preliminary phytochemical characterization was performed following the guidelines described by Bilbao 1997 and the antibacterial activity was determined by the dilution method established by CLSI 2022. The results are supported by a statistical analysis that sought to establish similarities or differences between each treatment by means of two-way ANOVA and a Post Hoc analysis (Tukey) using Graphpad Prism version 8.0.1. The main finding was that the extract obtained from the flowers collected in Atlántico showed promising antibacterial activity against *P. aeruginosa* and *S. warneri* with 95.2 ± 8.31 and $68.9 \pm 4.96\%$ of inhibition, respectively, and the extract obtained from the flowers collected in Bolívar showed moderate activity against these same two bacteria with 53 ± 6.31 and 52 ± 2.51 % of inhibition. The variation in the activities presented by the flowers from Atlántico and Bolívar is associated with the different proportions of secondary metabolites such as



triterpenes, sterols and tannins. In addition, it is important to note that both extracts showed no activity against *S. aureus* and *E. coli*.

Keywords: Antibacterial activity, *Crescentia cujete*, secondary metabolites, flowers, ethanolic extract, antibiotic resistance.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de los antibióticos ha supuesto un hito en la práctica clínica para la gestión y el control de las enfermedades infecciosas. Los antibióticos han salvado millones de vidas, contribuido considerablemente al avance de distintos campos de la medicina y la farmacología (como el trasplante de órganos, la supervivencia de neonatos prematuros y la cirugía) y, en general, han aumentado la esperanza de vida humana (Genevieve y Limaye, 2013; Espitia-Almeida et al, 2023). Sin embargo, la creciente aparición de bacterias resistentes ha reducido la eficacia de los antibióticos (Hou et al, 2023; Juan-Ignacio, 2015).

La resistencia se define como la capacidad de las bacterias de sobrevivir a la exposición a antibióticos en concentraciones que normalmente causarían la muerte bacteriana. La resistencia a los antibióticos se ha convertido en una de las condiciones determinantes del aumento de las tasas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, la aparición de enfermedades asociadas a la asistencia sanitaria y los elevados costos de hospitalización (Genevieve y Limaye, 2013; Espitia-Almeida et al, 2016). Se ha producido una creciente aparición de cepas bacterianas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella spp* entre otras, que son resistentes a antibióticos de amplio espectro como carbapenems, quinolonas, aminoglucósidos y ciclinas (Zhu et al, 2022; OMS, 2023).

De acuerdo a reportes de la Organización Mundial de la Salud, las enfermedades infecciosas causadas por bacterias patógenas, en el año 2020 afectaron aproximadamente 700 millones de personas en todo el mundo, casi uno de cada diez habitantes (OMS, 2023). Los principales focos de infección son los alimentos contaminados, agua no potable y entidades de salud con mala sanidad hospitalaria (Masana et al, 2015); este último, es la principal fuente de bacterias resistentes a los antibióticos. Como consecuencia, la creciente emergencia de bacterias resistentes genera altas tasas de morbilidad, mortalidad, altos costos de la atención médica y disminución en la calidad de la salud (Gonzales et al, 2019).

En las últimas décadas se han realizado múltiples investigaciones dirigidas a buscar nuevas opciones terapéuticas antimicrobianas que puedan ser usadas como alternativas a las terapias convencionales como respuesta a la alta tasa de resistencia que presentan los patógenos microbianos en todo el mundo



(Köser et al, 2012; Ramirez et al, 2013). En este sentido, la búsqueda de nuevas moléculas con propiedades antibacterianas provenientes de plantas medicinales se presenta como una ruta promisoriosa y de fácil acceso para la comunidad científica (Pájaro-González et al, 2022; Vivot et al, 2012).

Colombia se destaca por su extraordinaria biodiversidad, situándose como el segundo país con mayor diversidad en el mundo con especies de plantas nativas, endémicas e introducidas que crecen en territorio colombiano. La riqueza natural como tesoro de patrimonio nacional, se manifiesta a través de la variedad de ecosistemas, desde los climas calientes, húmedos, cálidos y fríos existen una diversidad de especies de plantas con alto potencial en los campos de la medicina, nutrición, cosmética y decorativo (Vitolo, 2023).

Las plantas han sido y son utilizadas con propósitos medicinales en diversas culturas alrededor del mundo, por presentar diversas actividades biológicas; destacándose sus efectos analgésicos, antioxidantes, antiinflamatorios, anticancerígenos, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios, antibacterianos, entre otros. Los metabolitos secundarios como los alcaloides, flavonoides, terpenoides, taninos, cumarinas y aceites esenciales son un tipo de biomoléculas abundantes en las plantas a los cuales se les atribuye esas propiedades curativas de las plantas (Avello et al, 2010; Luján et al, 2010; Pájaro-González et al, 2022).

Crescentia cujete L (*C. cujete* L) conocida en varias regiones de Colombia como totumo, es un árbol que se encuentra en varias regiones tropicales de América Central y del Sur, perteneciente a la familia Bignoniáceas, el cual ha recibido diferentes nombres alrededor del mundo como calabaza, jícara, morro, tapara, estelí y guira. Sus frutos tienen una cáscara dura y suave pulpa en el interior, en cuanto a su reproducción es de forma silvestre, por medio de la semilla y esquejes, este es reconocido por ser resistente a cambios extremos de temperaturas y condiciones como la sequía. Es un árbol de 6 a 12 m de altura; copa amplia y extendida con ramas largas y gruesas, su corteza es de color castaño claro, lisa o ligeramente escamosa y agrietada, sus flores anuladas de color verde pálido de 5.1 a 6.4 cm de largo. Las flores de la planta del totumo se forman directamente sobre el tallo y las ramas, el color de las flores tiende a obtener una variabilidad de su tonalidad de color dependiendo de su área o lugar donde se encuentre situada la planta. Dentro de los usos medicinales se reporta marcada actividad de diferentes órganos de esta planta como agente antiinflamatorio, analgésico, cicatrizante, antimicrobiano (Mejía- Suárez, 2022; Espinoza & Suyon Enriquez, 2023). Sin embargo, los extractos etanólicos de flores no han sido estudiados frente a patógenos de importancia clínica.

Por tal motivo, el objetivo principal de este proyecto fue evaluar la actividad antibacteriana de extractos etanólicos obtenidos de las flores de *C. cujete* L. frente a cuatro patógenos de importancia clínica.



MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrollará mediante un tipo estudio experimental, con diseño factorial, donde la variable dependiente será el porcentaje de inhibición bacteriana y las variables independientes serán el tipo de extracto y las cuatro bacterias.

Reactivos y solventes

Todos los reactivos y solventes utilizados para la preparación del extracto total de las flores de *C. kujete* L e identificación cualitativa de los metabolitos secundarios fueron de calidad analítica; Hexano (Hex), Acetona (Ac), etanol (EtOH), metanol (MeOH), cloroformo (CHCl_3) y diclorometano (CH_2Cl_2). Para las cromatografías en capa fina se usó sílice gel 60 F254 (0.063-0.200 mm) Millipore soportada en láminas de aluminio. Todos los productos fueron adquiridos de Merck Colombia

Área de estudio y recolección del material vegetal

El material vegetal (flores de *C. kujete* L) fue recolectado mediante salidas de campo hechas en los municipios Villanueva Bolívar (10°26'39"N 75°16'29"O/10.444166666667, -75.274722222222) y Puerto Colombia Atlántico (10°59'32"N 74°57'10"O/10.992222222222, -74.952777777778). A cada salida de campo se llevó el permiso de colecta tramitado ante la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) bajo los requerimientos establecidos en el permiso marco 01146 de 2018 de la Universidad Simón Bolívar. Las flores se recolectaron en estado fenológico de floración, en árboles en etapa adulta, el material vegetal fue recolectado directamente del árbol con unas tijeras, seguidamente, se revisó que estuvieran en buen estado y se almacenaron en bolsas de papel para ser trasladadas al Centro de Investigaciones en Ciencias de la Vida de la Universidad Simón Bolívar para ser procesadas.

Procesamiento del material vegetal

Las flores de *C. kujete* L fueron recolectadas de manera individual, se sometieron a un lavado con hipoclorito de sodio (0.5%) para su desinfección. Posteriormente, se secaron en un horno a 40 °C durante 5 días. Para la disminución de tamaño de las flores, se utilizó una trituradora de alimentos (Imusa, 650 W). Para la obtención del extracto etanólico se usó el método Soxhlet. Completado el tiempo de extracción el producto fue filtrado y secado por rotoevaporación al vacío. Finalmente, el extracto seco se pesó y almacenó en viales de vidrio refrigerados y protegidos de la luz (Folly et al, 2020).

Tamizaje fitoquímico preliminar

El tamizaje fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos obtenidos de las flores de *C. kujete* L se realizó en el laboratorio de Química y Nanotecnología de la Universidad Simón Bolívar, siguiendo



los lineamientos descritos por Bilbao 1997. Para ello, se tuvieron en cuenta las pruebas de identificación para cada una de las siguientes familias de metabolitos secundarios (Tabla 1).

Tabla 1. Reactivos de identificación de metabolitos secundarios en especies vegetales.

METABOLITO	REVELADOR	INTERPRETACIÓN
Alcaloides	Dragendorff, Wager	Manchas rojas o anaranjadas
Triterpenos y Esteroles	S.R de Lieberman-Burchard	Manchas de color (verde, azul, rojo, naranja) a la hora de inicio del ensayo.
Cumarinas	S.R KOH 5% en etanol	Intensificación de la fluorescencia
Saponinas	Espuma (PE)	Coloración azul-violeta y amarilla
Flavonoides	S.R Citrobórico	Intensificación de la fluorescencia azul, roja, verde
Quinonas	S.R KOH 5% en etanol	Las antraquinonas del color rojo las quinonas dan color amarillo en el visible
Taninos	S.R FeCl ₃ (10%) en etanol (PE)	Taninos hidrolizados: coloración azul Taninos no condensados: coloración verde

Convenciones: abundante (+++), moderado (++) , escaso (+), no detectado (nd); PE: prueba en tubo de ensayo.

Ensayo de actividad antibacteriana

Las cuatro bacterias de importancia clínica; dos gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC6538 y *Staphylococcus warneri*) y dos gram negativas (*Escherichia coli* ATCC25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145), fueron tratadas con los extractos etanólicos obtenidos de las flores de *C. cujete* recolectadas en los departamentos de Bolívar y Atlántico.

Para la estandarización y determinación de los parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas utilizadas, se utilizó un asa de inoculación estéril para depositar una pequeña porción del inóculo que contenía las cepas crioconservadas (-86°C) en un tubo de ensayo que contenía 5 mL de caldo nutritivo. La mezcla se incubó a 37 C bajo agitación durante toda la noche. A continuación, se midió la absorbancia de la mezcla a 600 nm utilizando un espectrofotómetro Multiskan Skyhigh (Thermo Scientific). Se determinó el volumen apropiado del inóculo utilizando la fórmula de dilución ($V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$). Este volumen se retiró del tubo de ensayo y se añadió a un nuevo tubo de ensayo que contenía 5 mL de caldo nutritivo estéril para iniciar el crecimiento en un cultivo con una densidad óptica (DO) próxima a 0.05 (1.5×10^8 células/mL). El nuevo cultivo se incubó a 37°C, y el aumento de la absorbancia se registró a intervalos de media hora hasta que se inició la fase estacionaria del



crecimiento bacteriano. Los datos de la curva de crecimiento se utilizaron para identificar el tiempo en que se alcanza la mitad de la fase exponencial de crecimiento de las bacterias, y ese periodo de calcularon los porcentajes de inhibición de las bacterias en todos los tratamientos (Espitia-Almeida et al, 2016; Espitia-Almeida et al 2023; CLSI, 2022).

En el desarrollo de los experimentos de actividad antibacteriana se utilizó un total de 50 mg/mL de cada extracto y se disolvió en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), para obtener una solución madre cuya concentración es de 50,000 µg/mL, seguidamente, a partir de esta solución madre se preparó 1,000 µL de una solución de trabajo a 2,000 µg/mL utilizando PBS a pH = 7 como diluyente. A continuación, las bacterias en plena fase exponencial de crecimiento se diluyeron hasta ajustar la DO 600 nm a 0.05 en PBS a pH = 7 para obtener el inóculo de trabajo. Finalmente, para cada tratamiento realizado en una placa de 96 pozos, se agregó una alícuota de 100 µL de medio fresco, 50 µL de la solución de trabajo de cada extracto y 50 µL del inóculo de trabajo preparado con las bacterias, obteniendo una concentración en todos los pozos de 500 µg/mL de extracto frente cada batería. En cada placa se realizaron controles positivos con gentamicina y controles negativos. Las placas que contenían los tratamientos se incubaron por 4 horas, midiendo la DO 600 nm. Se realizaron cuatro replicas independientes para cada extracto frente a las cuatro bacterias (Espitia-Almeida et al, 2016; Espitia-Almeida et al, 2023; Pájaro-González et al, 2022; CLSI, 2022). La concentración del DMSO en los tratamientos fue del 1%.

Al finalizar los tratamientos, los datos fueron procesados en Excel y usando la ecuación 1 se calcularon los porcentajes de inhibición (Espitia-Almeida et al, 2014; Tesis pregrado, Espitia-Almeida et al, 2016; Espitia-Almeida et al, 2023).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{DO_{NC} - DO_T}{DO_{NC}}$$

Donde,

DO NC, corresponde a la densidad óptica del control negativo y DOT, la densidad óptica de los tratamientos

Análisis estadístico

Los datos obtenidos serán soportados mediante un análisis estadístico riguroso, en consecuencia, para cada ensayo se realizarán cuatro réplicas (cada réplica está conformada por 3 repeticiones independientes). Se calcularán promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación porcentual para estimar la reproducibilidad de cada réplica (CV<10%). Además, se realizó una



ANOVA de dos vías y un análisis Post Hoc (Tukey) para determinar las diferencias o similitudes que existieran entre los diversos tratamientos y niveles de las variables. Los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Graphpad Prism versión 8.0.1.

RESULTADOS

Extracción e identificación de metabolitos secundarios

Finalizado el proceso de extracción por Soxhlet y secado los extractos, se realizó el tamizaje fitoquímico. Para ello, algunas pruebas se hicieron en capa fina y otras en tubo. Mediante cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en ingles), eluida en mezcla de CHCl_3 : AcOEt 8:2 para los extractos de flores se evidenció abundancia leve (+) de alcaloides para las flores de Atlántico y abundancia moderada (++) para las flores de Bolívar mediante la reacción con el reactivo de Dragendorff y Wagner. Además, se observó una mancha azul fluorescente en luz UV (365nm) con revelador químico Borntträger, a 110°C, dando positivo para cumarinas (+) en ambos extractos; En esta placa, con el mismo revelador no se observaron mancha al visible, lo que indicó la ausencia de quinonas (Tabla 2).

Adicionalmente, en la prueba de flavonoides, reveladas con el reactivo citrobórico se observaron a la luz UV (365 nm) zonas fluorescentes de colores amarillo y azules de intensidad baja, lo que evidencia poca presencia de esta familia de metabolitos. Los terpenoides triterpenos fueron detectados mediante vainillina/ H_2SO_4 en etanol (luz visible, a 110°C), como manchas coloreadas, especialmente, violetas, mientras que manchas azules verdosas y verdes claros fueron intensas para esteroides. Las pruebas para taninos se hicieron en tubo, estos y otros resultados se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis fitoquímico preliminar de las flores de *C. cujete* L.

METABOLITO SECUNDARIO	FLORES ATLÁNTICO	FLORES BOLÍVAR
Alcaloides	+	++
Cumarinas	+	+
Taninos	+++	++
Flavonoides	+	++
Saponinas	+	+
Triterpenos	+++	++
Esteroides	++	+
Quinonas	nd	nd



Ensayos de actividad antibacteriana

En los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana realizados por el método de dilución en caldo para los extractos de flores de *C. kujete* L a 500 µg/mL recolectados en los departamentos de Bolívar y Atlántico (Figura 1), se evidenció que los resultados obtenidos del extracto de flores Atlántico mostraron mayor respuesta con 95.2 ± 8.31 % de inhibición frente *P. aeruginosa* y se proyecta como un extracto muy promisorio para esta bacteria, en comparación del extracto de flores Bolívar quien mostró actividad moderada frente a *P. aeruginosa* con un 53 ± 6.31 % de inhibición ($p = 0.001$). Adicionalmente, estos extractos mostraron actividad moderada alta frente a *S. warneri* con 68.9 ± 4.96 y 52 ± 2.51 % inhibición ($p = 0.056$), respectivamente. Sin embargo, no presentaron actividad contra *E. coli* y mostraron actividad muy leve frente *S. aureus* (Figura 1).

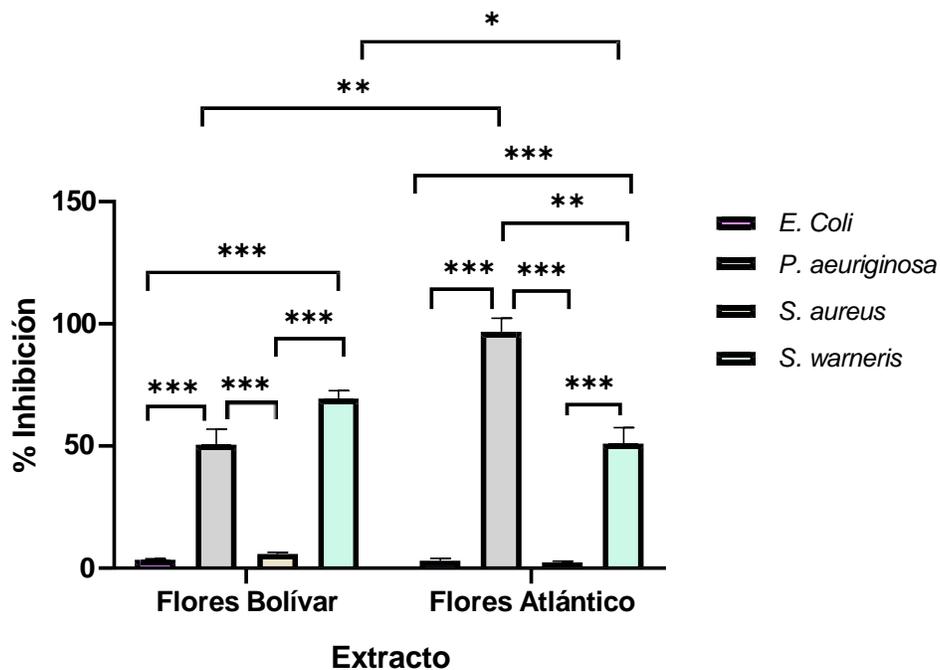


Figura 1. Efecto antibacteriano de los extractos etanólicos de *C. kujete* L evaluados a 500 µg/mL contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. warneris*. En el análisis de varianza de dos vías y la prueba Tukey se identificaron diferencias significativas entre los tratamientos a nivel inter e intragrupo. * indica un resultado estadísticamente significativo ($p = 0.02$), ** indica un resultado estadísticamente significativo ($p = 0.001$) y *** indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0.0001$).

Al analizar las curvas de crecimiento de las bacterias en función de la exposición a los tratamientos con los extractos obtenidos de las flores de *C. cujute* L (Figura 2), se evidencia que en algunos casos como *E. coli* y *S. aureus* (Figuras 2A y 2C) al parecer los extractos potenciaron el crecimiento de las bacterias, por ello, la curva de los tratamientos se ubica por encima del control negativo, estos sucesos se deben a que las bacterias pueden usar las fuentes de carbono de las moléculas que componen al extracto debido que estas moléculas no tienen efecto tóxico frente a las bacterias (Espitia-Almeida et al, 2014. Tesis pregrado).

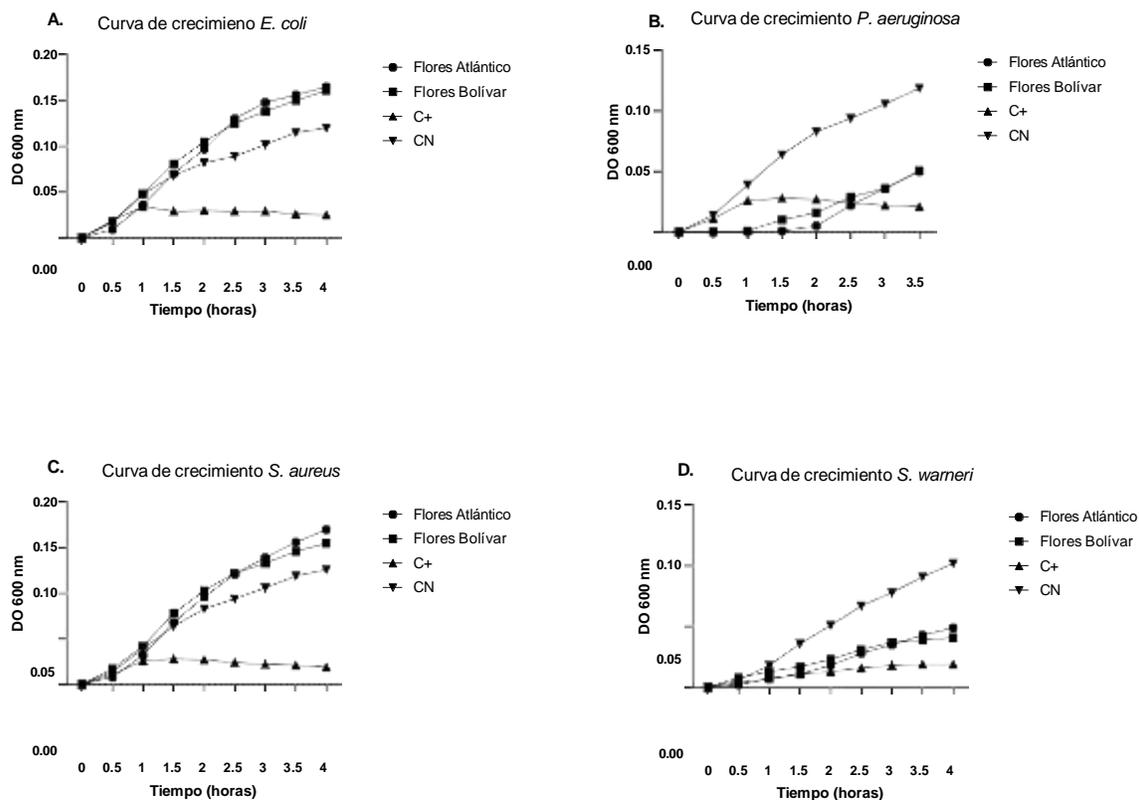


Figura 2. Curva de crecimiento de las bacterias en función de la exposición a los tratamientos con los extractos obtenidos de las flores de *C. cujute* L.

DISCUSIÓN

La alta frecuencia de resistencia presentada por las bacterias a nivel mundial, es motivo de investigaciones permanentes con el objetivo de identificar nuevas moléculas con alta eficacia contra estos patógenos (CDC, 2022; Andersson, Hughes, 2016; Van Duin, Paterson, 2020). En la última década un buen número de estudios se centra en el estudio de los recursos naturales, especialmente en las plantas, debido a la variedad de moléculas con actividad frente a diversos patógenos (OMS, 2023; Uddin et al, 2021). Además, los productos fitoquímicos pueden ser usados como una alternativa complementaria que ayude a mejorar la respuesta de las terapias antibióticas convencionales debido



a su riqueza en compuestos con alto valor biológico como los alcaloides, cumarinas, fenoles, terpenos y otros (Suganya et al, 2022), quienes han evidenciado alto potencial inhibidor contra patógenos sensibles y MDR a través de sus mecanismos de acción contra las proteínas de la membrana bacteriana, bombas de eflujo, biopelículas y comunicaciones bacterianas entre células, que son factores importantes para promover la aparición de resistencia a los medicamentos (Suganya et al, 2022; Borges et al, 2016).

En nuestro estudio se evidenció la presencia de metabolitos secundarios con abundancias diferenciales; siendo los taninos, esteroides y triterpenos los de mayor abundancia, seguido de alcaloides, cumarinas, flavonoides y saponinas (Tabla 2). Existiendo diferencias en la composición química en las flores recolectadas en Atlántico y Bolívar, estas diferencias podrían estar influenciadas por factores extrínsecos e intrínsecos propios de cada especie, tales como: localización geográfica, variación temporal de los metabolitos, abundancia o concentración relativa de cada metabolito. Estos resultados concuerdan con reportes hechos previamente en diferentes órganos de *C. cujete* L y otras plantas de la familia *Bignoniaceae* (Espitia-Baena et al, 2011; Ejelonu et al, 2011; Fatai Oladunni y Saheed Sabiu, 2021). Los terpenoides, esteroides y taninos que hacen parte de los metabolitos secundarios con mayor abundancia en los extractos etanólicos obtenidos de las flores de *C. cujete* han sido informados como potentes agentes antimicrobianos por la capacidad que estos poseen para causar desestabilización en la integridad y permeabilidad de la membrana, esta actividad es asociada a la capacidad que tienen dichos metabolitos al interferir con la disipación y alteración del potencial de membrana y fuerza de los protones a nivel mitocondrial (Xi et al, 2021; Sikkema et al, 1994).

En el análisis antibacteriano, el extracto obtenido de las flores procedentes de Atlántico y Bolívar demostró ser efectivo contra *P. aeruginosa* y *S. warneri* a una concentración de 500 µg/mL, con una inhibición del 95.2±8.31 y 68.9±4.96% (Figura 1), esta diferencia puede estar asociada a la mayor abundancia de derivados terpenoides, esteroides y taninos encontrados en las flores del Atlántico (Tabla 1), (Xi et al, 2021; Sikkema et al, 1994). Sin embargo, estos extractos no presentaron actividad significativa contra *E. coli* y *S. aureus*, estos resultados son similares a los reportados por Espinosa y Suyon, 2023, quienes evaluaron los extractos de hoja de *C. cujete* contra *S. aureus* y Hasanah et al, 2018, quienes reportan resultados negativos contra *E. coli* para los extractos cascara y pulpa de *C. cujete* L. Lo que puede asociarse a las diferencias estructurales existentes entre las membranas y paredes celulares de ambas bacterias (Xi et al, 2021). Además, según los datos obtenidos en la literatura la actividad antibacteriana podría tener resultados diferentes según el tipo de bacteria e



incluso en diferentes cepas de una misma bacteria (Espitia-Almeida et al, 2023; Syaefudin et al, 2018).

Los resultados descritos en esta propuesta son preliminares y se continua con la extracción y caracterización de las fracciones activas o metabolitos puros que representa dicha actividad. Dentro de las limitaciones presentadas en el desarrollo de esta investigación se resalta el difícil acceso al lugar de recolección del material vegetal.

CONCLUSIONES

Se hizo la caracterización fitoquímica preliminar de los extractos obtenidos de las flores de *C. kujete* recolectadas en Atlántico y Bolívar, destacándose la presencia de taninos, triterpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, flavonoides y saponinas. En los ensayos de actividad antibacteriana, se observó que el extracto obtenido de las flores de *C. kujete* L del Atlántico presentó actividad superior al extracto de las flores de Bolívar frente a *P. aeruginosa* y *S. warnesis*, ambos extractos fueron inactivos contra *E. coli* y *S. aureus* a la concentración evaluada.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersson D & Hughes D. (2017). Selection and transmission of antibiotic-resistant bacteria. *Microbiology spectrum*, 5(4), 5-4.
- Avello M & Cisternas I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista médica de Chile*, 138(10), 1288-1293.
- Borges A, Abreu AC, Dias C, Saavedra M, Borges F & Simões M. (2016). New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. *Molecules*, 21(7), 877.
- Centers for disease control and prevention-CDC (2020). About Antimicrobial Resistance. Disponible en:
<https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html#:~:text=Antimicrobial%20resistance%20happens%20when%20germs,and%20sometimes%20impossible%2C%20to%20treat>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI (2022). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth. Information Supplement.
- Domingo D & López-Brea M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap*, 16(4), 385-393.



- Ejelonu B, Lasisi A, Olaremu A & Ejelonu O. (2011). The chemical constituents of calabash (*Crescentia cujete*). *African Journal of Biotechnology*, 10(84), 19631-19636.
- Espinoza Olazabal C & Suyon M. (2023). Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Crescentia Cujete* L.(Totumo) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Tesis, Disponible en: <https://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12970/1502/TESIS%20ESPINOZA-SUYON.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=Conclusi%C3%B3n%3A%20El%20extracto%20etan%C3%B3lico%20de,cujete%2C%20Staphylococcus%20aureus%2C%20Totum.>
- Espitia-Baena J, Duran-Sandoval H, Fandiño-Franky J, Díaz-Castillo F & Gómez-Estrada H. (2011). Química y biología del extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L.(totumo). *Revista cubana de plantas medicinales*, 16(4), 337-346.
- Espitia-Almeida F, Meléndez-Gómez C, Gómez-Camargo D & Ochoa-Díaz M. (2014). Estudio de la actividad antibacteriana en *Pseudomonas aeruginosa* de 4-amido-2-alquil tetrahydroquinolinas. Tesis. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/282239643_ESTUDIO_DE_LA_ACTIVIDAD_ANTIBACTERIANA_en_Pseudomonas_aeruginosa_DE_4-AMIDO-2-ALQUIL_TETRAHIDROQUINOLINAS.](https://www.researchgate.net/publication/282239643_ESTUDIO_DE_LA_ACTIVIDAD_ANTIBACTERIANA_en_Pseudomonas_aeruginosa_DE_4-AMIDO-2-ALQUIL_TETRAHIDROQUINOLINAS)
- Espitia-Almeida F, Meléndez-Gómez C, Ochoa-Díaz M, Valle-Molinares R., Gutiérrez M & Gómez-Camargo D. (2016). Antimicrobial and degradative bacterial DNA effects of new 2-alkyl (tetrahydroquinoline-4-yl) formamide. *Pharmacologyonline*. 1, 72-80.
- Espitia-Almeida F, Valle-Molinares R, Navarro Quiroz E, Pacheco-Londoño L.C & Galán-Freyre N. J. (2023). Photodynamic Antimicrobial Activity of a Novel 5, 10, 15, 20-Tetrakis (4-Ethylphenyl) Porphyrin against Clinically Important Bacteria. *Pharmaceuticals*, 16(8), 1059.
- Balogun F & Sabiu S. (2021). A review of the phytochemistry, ethnobotany, toxicology, and pharmacological potentials of *Crescentia cujete* L. (Bignoniaceae). *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2021.
- Folly M. L, Ferreira G. F, Salvador M. R, Sathler A. A, Da Silva G. F, Santos J. C & Lang, K. L. (2020). Evaluation of in vitro Antifungal Activity of *Xylosma prockia* (Turcz.) Turcz. (Salicaceae) Leaves Against *Cryptococcus* spp. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3114.
- Genevieve L & Limaye A. (2013). Infections in Transplant Patients. *Med. Clin. N. Am.*, 97, 581–600.



- González Mendoza, J., Maguiña Vargas, C., & González Ponce, F. D. M. (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Médica Peruana*, 36 (2), 145-151.
- Hou J, Long X, Wang X, Li L, Mao D, Luo Y & Ren H. (2023). Global trend of antimicrobial resistance in common bacterial pathogens in response to antibiotic consumption. *Journal of Hazardous Materials*, 442, 130042.
- Alós J. I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 33 (10), 692-699.
- Köser C. U, Ellington M, Cartwright E, Gillespie S. H, Brown N. M, Farrington M, Holden M, Dougan G, Bentley S, Parkhill J & Peacock S. J. (2012). Routine Use of Microbial Whole Genome Sequencing in Diagnostic and Public Health Microbiology. *PLoS Pathogens*, 8 (8), e1002824.
- García Luján C, Martínez R, Ortega S & Castro B.F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9(2), 86-96.
- Masana, M. O. (2015). Factores impulsores de la emergencia de peligros biológicos en los alimentos. *Rev Argentina Microbiol*, 47(1), 1-3.
- Mejía Suarez K. (2022). Revisión bibliográfica frente a un método de conservación para jarabe elaborado a base de totumo (*Crescentia cujete*), *Salvia* (*Lamiaceae*), y *Anamú* (*Petiveria*), por la comunidad indígena Zenú. Retrieved November 1, 2023, from <https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/4726/1.%20Proyecto%20final%20-%20Katheryn%20Mejia%20PDF.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Organización Mundial de la Salud-OMS. (2023). Estrategia de la OMS para la medicina tradicional 2012-2023. 2013: 75.
- Organización Mundial de la Salud-OMS. (2023). Resistencia antimicrobiana. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/6-6-2023-partir-ahora-semana-mundial-concientizacion-sobre-uso-antimicrobianos-waaw-por>.
- Pájaro-González Y, Oliveros-Díaz A.F, Cabrera-Barraza J, Cerra-Domínguez J & Díaz-Castillo F. (2022). A review of medicinal plants used as antimicrobials in Colombia. *Elsevier EBooks*, 3-57.
- Ramírez L, Castillo Castañeda A & Melo Vargas A. (2013). Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *Nova*, 11(19), 51.



- Sikkema J, de Bont J. A & Poolman B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of biological chemistry*, 269 (11), 8022–8028.
- Suganya T, Packiavathy I. A, Aseervatham G. S, Carmona A, Rashmi V, Mariappan S, Devi N. R & Ananth, D. A. (2022). Tackling Multiple-Drug-Resistant Bacteria With Conventional and Complex Phytochemicals. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 883839.
- Syaefudin Nitami D, Utari M. D, Rafi M & Hasanah U. (2018). Antioxidant and Antibacterial Activities of Several Fractions from *Crescentia cujete* L. Stem Bark Extract. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 197, 012004.
- Uddin T. M, Chakraborty A. J, Khusro A, Zidan B. R, Mitra S, Emran T. B, Dhama K, Ripon M. K, Gajdács M, Sahibzada M. U, Hossain M & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. *Journal of infection and public health*, 14(12), 1750–1766.
- Van Duin D & Paterson D. L. (2020). Multidrug-Resistant Bacteria in the Community: An Update. *Infectious disease clinics of North America*, 34(4), 709–722.
- Vitolo A. L. (2023). Biodiversidad (Biogeografía en un País Megadiverso). *Escuela de Ciencias Básicas Y Aplicadas B-Learning*. https://ciencia.lasalle.edu.co/blearning_ciencias_basicas/8
- Vivot E. P, Sánchez C, Cacik F & Sequin, C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 23 (45), 165-185.
- Yap P. S, Yusoff K., Lim S. H, Chong C.-M & Lai K. S. (2021). Membrane Disruption Properties of Essential Oils-A Double-Edged Sword? *Processes*, 9(4), 595.
- Zhu Y, Huang W. E & Yang Q. (2022). Clinical Perspective of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Infection and drug resistance*, 15, 735–746.