

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

Estudiantes

Milena Esther Díaz Therañ
Código estudiantil: 202012226992

Ana María Nieto Tomases
Código estudiantil: 202012222878

Trabajo de Investigación del Programa Microbiología

Profesor tutor

Fabián Espitia Almeida, *Ph. D*

Profesor cotutor

Julián Cabrera Barraza, *M. Sc*
Roger Valle Molinares, *Ph. D*

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. cujete* L. frente

a cuatro patógenos de importancia clínica en Colombia. El estudio presenta tipología experimental con diseño factorial, donde la variable dependiente es el porcentaje de inhibición bacteriano 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 promisorio 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 $52 \pm 2.51 \%$ 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 kujete*, 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. kujete* L. flowers against four pathogens of clinical importance in Colombia. 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. kujete* 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 $52 \pm 2.51 \%$ 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 kujete*, secondary metabolites, flowers, ethanolic extract, antibiotic resistance.

REFERENCIAS

- 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 tetrahidroquinolinas. Tesis. Disponible en:

- 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-Freyle 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 *Coton 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.