



X encuentro
Participación de la
Mujer
en la Ciencia



ZARZAMORAS SILVESTRES: PLANTAS MEXICANAS CON POTENCIAL ANTIMICROBIANO

María Blanca Silva-Adame, L.V. Pedraza-Arriola, Pedro Antonio García-Saucedo

Facultad de Agrobiología "Presidente Juárez", Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Uruapan, Michoacán

RESUMEN

La zarzamora es una planta perteneciente al género *Rubus* la cual se desarrolla en distintos países, registrándose en México más de 20 especies silvestres y en el mundo más de 700. Diversos estudios han evidenciado la bioactividad de extractos obtenidos de plantas pertenecientes a este género resaltando su potencial antioxidante, antiinflamatorio³ y antimicrobiano, los cuales han sido atribuidos principalmente al contenido en compuestos polifenólicos. Los polifenoles actúan, entre otras funciones, como mecanismo de defensa contra insectos y patógenos; en este sentido se ha reportado la actividad antimicrobiana de polifenoles extraídos de plantas del género *Rubus* frente a patógenos de humanos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Campilobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, etc.

En el presente trabajo se evaluó el potencial antimicrobiano de dos especies de zarzamora silvestre, *Rubus adenotrichos* y *Rubus coriifolius*, colectadas en el estado de Michoacán mediante la obtención de extractos metanólicos a partir de hojas y tallos deshidratados y la determinación del potencial de inhibición de los microorganismos fitopatógenos *Pantoea stewartii* y *Fusarium* sp. Se registró el mejor resultado de actividad antibacteriana con el extracto de tallo de la especie *Rubus adenotrichos* alcanzando un 97.78 % de inhibición de *Pantoea stewartii*, el cual presentó un contenido de polifenoles totales de $0.045 \pm 0.03 \mu\text{g EAG}/\mu\text{L}$. Por otro lado, el mejor resultado de actividad antifúngica fue exhibido por el extracto de hoja obtenido por extracción sucesiva en equipo Soxhlet de *Rubus adenotrichos* alcanzando un 36.335 % de inhibición de micelio de *Fusarium* sp. Estas son las primeras evidencias del potencial antimicrobiano de estas plantas; aún es necesaria la realización de mayores evaluaciones a reportar su efecto inhibitorio contra fitopatógenos de interés para el sector agroalimentario.

Palabras clave: actividad antimicrobiana, polifenoles, *Pantoea stewartii*, *Fusarium* sp.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Rubus* presenta plantas como la zarzamora que se desarrollan en México, destacando Michoacán. En el estado, estas plantas forman parte importante de la herbolaria en el tratamiento de distintos padecimientos e infecciones. En México se registran cerca de 20 especies silvestres pertenecientes a este género y 700 especies han sido reportadas a nivel mundial, de las cuales sólo se ha evaluado la bioactividad de un reducido número de ellas, generalmente bajo la perspectiva de beneficio para la salud humana (Rzedowski y Calderón, 2005; Cuevas-Rodríguez *et al.*, 2010; Quave *et al.*, 2012).

Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios y algunos pueden ser usados como moléculas o biopesticidas que eviten el desarrollo de insectos y microorganismos, tal es el caso de los polifenoles los cuales desempeñan funciones de protección contra la radiación UV y



X encuentro
Participación de la
Mujer
en la Ciencia



mecanismo de defensa contra patógenos y herbívoros, entre otras; por lo anterior, existe un creciente interés en la búsqueda de moléculas con la actividad y su aplicación en el manejo integrado de plagas y para el control de microorganismos patógenos, lo cual ha llevado a la búsqueda de nuevas fuentes de productos biológicamente activos, la identificación de moléculas bioactivas y los sus mecanismos de acción (Conner *et al.*, 2000; Céspedes *et al.*, 2014).

Actualmente los estudios realizados sobre polifenoles extraídos de especies de *Rubus* mexicanas y su efecto antimicrobiano, son escasos, más aún para el control de fitopatógenos; por ello, en el presente trabajo se determinó el potencial de inhibición extractos polifenólicos obtenidos de dos plantas silvestres de zarzamora sobre *Pantoea stewartii* y *Fusarium* sp., microorganismos patogénicos, aportando así evidencias sobre su actividad antimicrobiana para el control de fitopatógenos.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal. Se colectaron las especies *Rubus adenotrichos* y *Rubus coriifolius* en el cerro “La Charanda” en la ciudad de Uruapan, Michoacán, ubicado con los datos georreferenciales N 19° 26'17.6" W 102° 03'49.3" con una elevación de 1. Las dos morfoespecies colectadas fueron seleccionadas de acuerdo a características morfológicas contrastantes, destacando la presencia o ausencia de pubescencias en el tallo, así como el color de dicho órgano.

Obtención de extractos metanólicos. Hojas y tallos deshidratados de ambas especies fueron sometidos a extracción metanólica por maceración y extracción sucesiva en equipo Soxhlet. El primer método se realizó por un periodo de 5 días a 4 °C, considerando una proporción 1:10 de material vegetal y solvente; transcurrido ese tiempo, los extractos se filtraron con papel filtro Whatman # 4 y posteriormente se concentraron en evaporador rotatorio a 40 °C por triplicado. Por otro lado, el equipo Soxhlet fue utilizado para una extracción sucesiva con los solventes n-hexano, cloroformo y metanol, en ese orden. Se pesaron 5 g de material vegetal deshidratado el cual fue colocado en una bolsa hecha con papel filtro Whatman # 4 y se introdujo en un dedal de celulosa; se usó un volumen de 150 mL de cada solvente llevándolos a ebullición durante 4 horas. Finalmente, los EC se resuspendieron en una solución de DMSO (dimetil sulfóxido) y agua destilada en proporción 1:10 v/v y se almacenaron a 4 °C hasta su utilización. La extracción Soxhlet se realizó por triplicado utilizando únicamente hoja de la especie *Rubus adenotrichos*.

Cuantificación de compuestos polifenólicos. Se siguió el protocolo establecido por Estupiñán *et al.* (2011) con algunas modificaciones de acuerdo a Singleton *et al.* (1999). La mezcla de reacción consistió en 50 µL de extracto, 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (FC) 1N y 550 µL de agua destilada, dando un tiempo de incubación de 8 min con previa homogenización de la mezcla; posteriormente se agregaron 300 µL de Na₂CO₃ al 7.5 % y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Finalmente se registró la absorbancia a 760 nm en espectrofotómetro UV-Vis marca Nanodrop 2000c®.

Evaluación de actividad antibacteriana. Se realizó una cinética de crecimiento de *Pantoea stewartii* para la determinación del tiempo de incubación necesario para determinar el potencial antibacteriano, registrando la densidad óptica y las UFC/mL. Se preparó el inóculo bacteriano en medio PD incubando a 37 °C y 150 rpm durante 20 horas, corroborando que registrara una densidad óptica de 0.9-1 y una población microbiana aproximada a 1 x 10⁹ UFC/mL, para posteriormente inocular los tratamientos y controles con 500 µL, estableciéndolos por triplicado. El porcentaje de inhibición y las UFC/mL de *Pantoea stewartii* obtenidos se evaluaron a las 10 horas de ensayo empleando los métodos de diluciones seriales y siembra en placa.



X encuentro
Participación de la
Mujer
en la Ciencia



Evaluación de actividad antifúngica. Se utilizó el protocolo descrito por Rodríguez-Vaquero *et al.* (2007) con algunas modificaciones, utilizando cajas Petri que contenían medio de cultivo agar papa-dextrosa (PDA) formando una delgada capa de espesor de aproximadamente 0.5 cm; posteriormente se agregó 1 mL de los EC o de disolución DMSO-H₂O, se homogenizaron y finalmente se adicionó medio PDA suficiente para cubrir la capacidad de la caja. Después de la solidificación del medio de cultivo, Todas las cajas Petri fueron inoculadas con el hongo fitopatógeno *Fusarium sp.* en el centro de la caja por picadura con ayuda de palillos de madera estériles, se sellaron e incubaron a temperatura ambiente. Cada tratamiento y control fue establecido por triplicado. Los resultados fueron expresados como diámetro de la zona de inhibición de crecimiento del micelio, para lo cual se registró el diámetro micelial a partir de las 72 horas de incubación y hasta las 168 horas.

3. RESULTADOS

Actividad antibacteriana. Todos los extractos evaluados registraron más del 80 % de inhibición de la bacteria (Figura 1), destacando el tratamiento con extracto de tallo de *R. adenotrichos*, el cual presentó un bajo contenido en polifenoles al compararlo con el resto de los extractos y alcanzó un 91.18 % de inhibición.

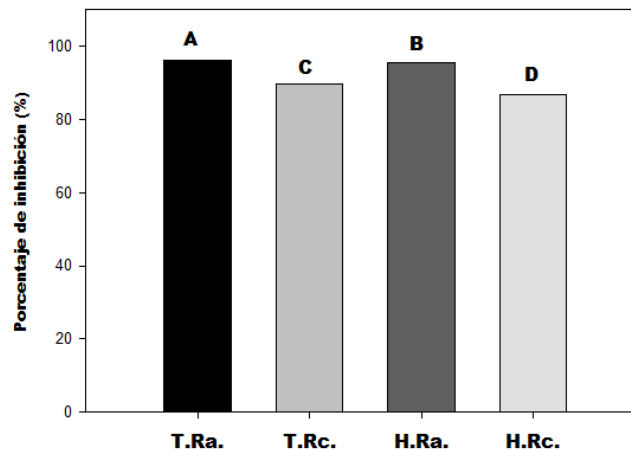


Figura 1. Porcentaje de inhibición de *Pantoaea stewartii* por efecto de su exposición a extractos de hojas (H.Ra y H.Rc) y tallos (T.Ra y T.Rc) de dos especies silvestres de zarzamora. R.c.: *Rubus coriifolius*, R.a.: *Rubus adenotrichos*. Literales distintas denotan diferencias significativas, Tukey ($p > 0.05$).

Pocas especies del género *Rubus* han sido evaluadas con la finalidad de evidenciar su potencial antimicrobiano, tal es el caso de *Rubus chamaemorus*, *Rubus coriifolius*, *Rubus urticaefolius* y *Rubus ulmifolius*, cuyos extractos metanólicos y acuosos en distintas concentraciones han inhibido el desarrollo de microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc. (Sisti *et al.*, 2008; Panizzi *et al.*; 2002). Sin embargo, no existe un reporte sobre el potencial antimicrobiano exhibido por plantas silvestres del género *Rubus* para control de fitopatógenos.

Actividad antifúngica. El extracto de hoja *R. adenotrichos* resultó ser el más activo, como ya se mostraba en el cuadro 9, mostrando una zona de inhibición máxima de 20.86 mm a las 144 h; por otro lado, el extracto con menor actividad fue tallo *R. coriifolius* el cual registró una zona de



X encuentro
Participación de la
Mujer
en la Ciencia



inhibición máxima de 6.43 mm a la misma hora que el tratamiento más activo. De manera interesante, todos los extractos registraron la mayor inhibición a las 144 h y, 24 horas después, éste valor disminuye. Lo anterior podría atribuirse a una posible adaptación del hongo al medio con los extractos. Céspedes *et al.* (2014) establecen que diámetros de zonas de inhibición de 6-9 mm son considerados como el resultado de una elevada actividad antifúngica; para esta evaluación, la zona de inhibición exhibida por el extracto de hoja *R. adenotrichos* a las 72 h, de acuerdo a este criterio, evidencia una elevada actividad de inhibición de *Fusarium* sp.

Tabla 1. Actividad antifúngica de extractos metanólicos de *R. adenotrichos* y *R. coriifolius* frente a *Fusarium* sp. expresada como diámetro de zona de inhibición del micelio.

Tratamiento	Concentración de polifenoles (µgEAG/µL)	Diámetro de zona de inhibición del micelio (mm)				
		72h	96h	120h	144h	168h
Control Absoluto	0	-	-	-	-	-
DMSO: H ₂ O 1:10 v/v	0	0.320	0.310	-	-	-
<i>R. adenotrichos</i> hoja	1.878 ± 0.038	4.850	4.600	5.630	9.610	7.280
	9.390 ± 0.159	6.440	8.390	11.160	18.260	15.870
<i>R. adenotrichos</i> tallo	0.454 ± 0.030	2.520	3.550	4.620	8.850	6.360
	2.271 ± 0.159	5.020	6.750	8.830	13.950	12.730
<i>R. coriifolius</i> hoja	3.608 ± 0.239	1.740	6.580	2.780	6.850	5.000
	18.044 ± 0.159	6.560	7.930	8.080	14.540	11.280
<i>R. coriifolius</i> tallo	0.761 ± 0.036	0.770	0.890	0.770	4.600	1.560
	3.807 ± 0.159	2.750	2.810	3.490	6.130	4.820
<i>R. adenotrichos</i> hoja (Soxhlet)	0.813 ± 0.02	4.060	7.740	3.920	6.430	3.600
	4.065 ± 0.16	7.660	10.520	13.880	20.860	19.560

4. CONCLUSIONES

Gracias a los resultados obtenidos puede concluirse que la concentración y tipo de polifenoles están ligados a la técnica de extracción empleada. Por otro lado, aunque no se realizó un análisis de perfil fitoquímico, las diferencias en el grado de inhibición observadas hacen suponer que existen distintos tipos de polifenoles en los materiales colectados. En lo referente a la bioactividad, el extracto metanólico de tallo de *Rubus adenotrichos* resultó ser el más efectivo para la inhibición de *Pantoea stewartii*. Asimismo los extractos metanólicos de ambas especies evaluadas afectaron el desarrollo micelial de *Fusarium* sp. en distinto grado, por lo que pueden ser propuestos como alternativa de control. Las investigaciones bibliográficas permiten establecer que este es el primer trabajo donde se reporta el efecto inhibitorio de extractos obtenidos a partir de especies silvestres del género *Rubus* con enfoque fitopatológico. Además, las evidencias científicas sobre la bioactividad de especies silvestres de zarzamora mexicanas son escasas o nulas, más aun considerando que en este trabajo se evaluaron dos órganos vegetales de manera independiente.



X encuentro
Participación de la
Mujer
en la Ciencia



Los resultados mostrados en esta investigación permiten proponer a dos materiales silvestres de zarzamora, *R. coriifolius* y *R. adenotrichos* para su uso como fuente de compuestos con potencial antimicrobiano, pudiendo ser considerados como alternativas para el control de microorganismos fitopatógenos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Céspedes, C. L.; Salazar, J. R.; Ariza-Castolo, A.; Yamaguchi, L.; Ávila, J. G.; Aqueveque, P.; Kubo, I.; Alarcón, J. Biopesticides from plants: *Calceolaria integrifolia* s.l. *Environ Res*, 132, 2014 pp. 391-406.
2. Conner, W. E.; Boada, R.; Schroeder, F. C.; Gonzalez, A.; Meinwald, J.; Eisner, T. Chemical defense: bestowal of a nuptial alkaloidal garment by a male moth on its mate. *Proc Nat Acad Sci*, 97, 2000, pp. 14406-14411.
3. Cuevas-Rodríguez, E. O.; Dia, V. P.; Yousef, G. G.; García-Saucedo, P. A.; López-Medina, J.; Paredes-López, O.; González de Mejía, E.; Lila, M. A. Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of mexican blackberry (*Rubus* spp.) extracts. *J Agric Food Chem*, 58, 2010, pp. 9542-9548.
4. Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Op Biotech*, 23, 2012, pp.174-181.
5. Estupiñán, D. C.; Schwartz, S. J.; Garzón, G. A. Antioxidant activity, total phenolics content, anthocyanin and color stability of isotonic model beverages colored with Andes berry (*Rubus glaucus* Benth) anthocyanin powder. *J Food Sci*, 76, 2011, pp. S26-S34.
6. Panizzi, L.; Caponi, C.; Catalano, S.; Cioni, P. L.; Morelli, I. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. *J Ethnopharm*, 79, 2002, pp. 165-168.
7. Paredes-López, O.; Cervantes-Ceja, M. L.; Vigna-Pérez, M.; Herández-Pérez, T. Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life-A review. *Plant Foods Hum Nutri*, 65, 2010, pp. 299-308.
8. Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Alakomi, H. L.; Oksman-Caldentey, K. M. Bioactive berry compounds-novel tools against human pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol*, 67, 2005, pp. 8-18.
9. Quave, C. L.; Estévez-Carmona, M.; Compadre, C. M.; Hobby, G.; Howard, H.; Beenken, K. E.; Smeltzer, M. S. Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *Plos ONE*, 7, 2012, pp. e28737.
10. Rodríguez-Vaquero, M. J.; Alberto, M. R.; Manca de Nadra, M. C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food control*, 18, 2007, pp. 93-101.
11. Rzedowski, J. y Calderón, R. G. Rosaceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes, Fascículo 135, Co-edición entre el Instituto de Ecología, A.C. y la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Morelia, Michoacán, 2005, pp. 123-143.
12. Singleton, V. C.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Meth Enz*, 299, 1999, pp. 152-178.
13. Sisti, M.; De Santi, M.; Fraternali, D.; Ninfali, P.; Scoccianti, V.; Brandi, G. Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture. *LWT-Food Sci Tech*, 41, 2007, pp. 946-950.