

Evaluación del extracto etanolico de la hoja de *Sapindus saponaria* L. (Gualulu) sobre *Escherichia coli*.

J. Garrido-Islas^{1*}, N.E. Jara-Ramírez², A. García-Ceja¹, A. Trapala-Islas¹, L. González-Montiel³

¹Ingeniería en Industrias Alimentarias. Instituto Tecnológico Superior de Venustiano Carranza, Av. Tecnológico S/N, Col. El Huasteco, Ciudad Lázaro Cárdenas, Venustiano Carranza, C.P. 73049, Puebla, México.

²Ingeniería Bioquímica. Universidad Autónoma de Coahuila. Facultad de Ciencias Biológicas. Carretera Torreón-Matamoros Km. 7.5, Ciudad Universitaria. Ejido El Águila, C.P. 27276, Torreón, Coahuila, México.

³Instituto de Tecnología de Alimentos. Universidad de la Cañada, Carretera Teotitlán – San Antonio Nanahuatipán Km 1.7, S/N, Paraje Titlacuatitla. Teotitlán de Flores Magón, C.P. 68540, Oaxaca, México.

[*jesus.garrido@itsvc.edu.mx](mailto:jesus.garrido@itsvc.edu.mx)

Área de participación: Ingeniería Química

Resumen

Dentro de la industria alimentaria, la contaminación microbiana por bacterias del género *Salmonella* y *Escherichia* son problema importante debido a las grandes pérdidas económicas anuales que esto produce. La planta de *Sapindus saponaria* L., conocida en la región como "Gualulu" ha sido utilizada desde épocas ancestrales como remedios caseros, además de usarse en la elaboración de jabón artesanal, ya que la pulpa del fruto contiene alta cantidad de saponina, la cual al estrujar los frutos genera espuma. Se ha reportado que la parte más utilizada es el fruto (pericarpio), aunque también existen referencias de la hoja, tallo, raíces, semillas y corteza.

Se realizaron análisis antimicrobianos con extracto de etanolico de la hoja de *Sapindus saponaria* L., en contra de *Escherichia coli* ATCC 25922, con concentraciones de 500 µL, 600 µL, 700 µL, 800 µL, 900 µL, 1000 µL y 1100 µL, demostrando que presenta inhibición en contra de la bacteria.

Palabras Clave: *E. Coli*, *luteolina*, *S. saponaria* L.

Abstract

Within the food industry, microbial contamination by bacteria of the genus *Salmonella* and *Escherichia* are a major problem due to the large annual economic losses that this produces. The *Sapindus saponaria* L. plant, known in the region as "Gualulu" has been used since ancient times as home remedies, in addition to being used in the production of artisan soap, since the pulp of the fruit contains a high amount of saponin, which squeezing the fruits generates foam. It has been reported that the most used part is the fruit (pericarp), although there are also references to the leaf, stem, roots, seeds and bark.

Antimicrobial analyzes were performed with ethanol extract of the *Sapindus saponaria* L. leaf, against *Escherichia coli* ATCC 25922, with concentrations of 500 µL, 600 µL, 700 µL, 800 µL, 900 µL, 1000 µL and 1100 µL, demonstrating that presents inhibition against the bacteria.

Key Words: *E. Coli*, *luteolin*, *S. saponaria* L.

Introducción:

En la actualidad el recurrir a fuentes naturales de desinfección, es algo que, a tomado fuerza, causando que se investigue cada vez más de nuevos métodos bactericidas naturales, que permitan eliminar fuentes químicas que causen alergias o resistencia a las bacterias.

El género *Sapindus* (*Sapindaceae*) está formado por unas 12 especies de árboles o arbustos distribuidos por los trópicos y subtropicos del mundo.

Del género se han informado 55 usos tradicionales y 29 efectos biológicos diferentes, mientras que de *S. saponaria*, conocida como "jaboncillo", se encontraron 32 (tabla 1) y 14 respectivamente (tabla 2). A esta especie es a la que se le reconoce un mayor número de aplicaciones tradicionales al igual que *S. trifoliatu*, presenta el mayor número de ensayos biológicos realizados [11].

El árbol de *Sapindus saponaria* (gualulu) es común en climas cálidos y semicálidos, típico de los bosques de Mesoamérica, proporciona un fruto que ha sido utilizado por sus propiedades detergentes, así como su uso de manera artesanal hasta terapéutico [1].

Los patógenos microbianos en alimentos han sido confirmados como la causa principal de enfermedades [7]. La contaminación de los alimentos, en la mayoría de los casos, suele ocurrir después de ser cocidos y no ser conservados adecuadamente, lo que favorece la multiplicación de los microorganismos.

Microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* son reconocidos como patógenos causantes de enfermedades y graves intoxicaciones alimentarias, generando un gran impacto sobre la salud pública (Demo M et al, 2005). Este grupo de bacterias, debido a su ubicuidad e incidencia, se ha constituido en el blanco de acción de muchos de los sistemas de aseguramiento de la calidad en industrias alimentarias [6].

Las propiedades de antimicrobianas de hierbas y especias han sido reconocidas y usadas desde tiempos antiguos en la preservación de los alimentos y en la medicina, pero científicamente confirmado hace pocos años [4].

Este trabajo propone realizar un análisis de actividad antimicrobiana del extracto etanólico de la hoja de *Sapindus saponaria* L., sobre *Escherichia coli* (ATCC 25922), mediante la técnica de vertido en placa y pozo en agar.

Se trabajó solo con esta sepa para conocer la efectividad del extracto y posteriormente trabajarlo con otro tipo de bacterias u hongos e implementarlo en la conservación de algún alimento.

Antibiótico

Se usó Ceftriaxona Fresenius Kabi como antibiótico, ya que al ser de tercera generación tiene acciones de amplio espectro en contra de bacterias Gram negativas y Gram positivas. La acción se debe a la inhibición de la síntesis de la pared celular, dentro de las bacterias Gram negativas aerobias con acción encontramos a *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, entre otros

Tabla 1: Usos tradicionales de *Sapindus spp.*

Uso	1	2	3	4	5	Total
Alexifármaco	x		xxx		xx	6
Antidiarreico			x			1
*Antihelmíntico			x			1
Antipirético	x	xx	xx			5
*Antirreumático		x	xxx			4
Antivenin			xxx			3
Asma bronquial			x		xx	3
Asma humoral			x			1
Astringente			xxx			3
Baños			x			1
Cabello, cuidado		x	x	x		3
Cataratas			x			1
*Circulación			x			1
Cólera			x			1
Dentición			x			1
*Detersivo		xx	xx		x	5
Dolor uterino			x		x	2
Encías		x	x			2
*Epilepsia		xxx	x		xxx	7
*Escabida		x	xx	xx		5
Expectorante		xx	xx		xxx	7
Ictericia			x			1
*Insecticida			x	xxx		4
*Molusquicida			x			1
Oftalmias			xx			2
*Piscida		xx	xxxxxx	xx	xxx	13
Psoriasis			x			1
Soporífero			xx			2
Riñón, enfermedades			x			1
Tónico			xxxx			4
Veneno		x	x			2

+Úlceras			x			1
Total de reportes	2	16	54	8	15	95
Total usos	2	10	32	4	7	

1: *S. laurifolius*, 2: *S. mukorossi*, 3: *S. saponaria*, 4: *S.rarak*, 5: *S. trifoliatum*

* Usos que han sido comprobados de alguna u otra forma biológicamente en alguna especie.

Fuente: Abreu Guirado O.A. 2005 con modificación.

Tabla 2: Ensayos realizados a *Sapindus spp.*

Ensayo biológico	1	2	3	4	5	Total
Abortivo			x			1
Acaricida			xx			2
Antiandrogénico			x		x	2
Antihemorrágico			x			1
Antiprotozoario			xx			2
Antiulceroso		x	x			2
Citótico			x			1
Espasmolítico			x		x	2
Estimulante uterino			x		x	2
Insecticida		x	xx			3
Molusquicida		xx	xxxxxx	x	x	10
Nematicida			x		x	2
Piscida		x	xx			3
Repelente			x			1
Total reportes	0	5	22	1	5	34
Total ensayos	0	4	14	1	5	

1: *S. laurifolius*, 2: *S. mukorossi*, 3: *S. saponaria*, 4: *S.rarak*, 5: *S. trifoliatum*

Fuente: Abreu Guirado O.A. 2005 con modificación.

Metodología

Extracción del compuesto

La recolección de la muestra se realizó en la región de Lázaro Cárdenas, Puebla. Para esto se seleccionaron hojas que presentaran en un estado fitosanitario correcto, para cual la hoja debe estar libre de plaga, de enfermedades o en estado de descomposición, una vez terminada la selección se secó en un horno de convección marca LUZEREN a una temperatura de 35 °C $\pm$ 1, durante un periodo de 24 horas, al terminar este la hoja se almaceno en bolsas herméticas y se guardaron hasta su uso.

La hoja se sometió a una molienda para posteriormente ser tamizada hasta tener partículas de 1 mm $\pm$ 0.1, el polvo fino se almacenó en un frasco oscuro hermético para su posterior uso y el polvo grueso fue nuevamente molido hasta obtener un polvo fino y ser guardado.

Se tomaron 20 g de polvo obtenido y se mezcló con metanol en una relación de 1:10 p/v [3], se homogenizo durante 5 minutos con ayuda de un bortex marca LB PRO MX-S, posteriormente se ocupó un baño ultrasónico AS7240B para realizar la extracción de los compuestos, el cual se realizó a 55 kHz por un periodo de 10 minutos dentro de un frasco oscuro a temperatura ambiente [13], al terminar se filtró al vacío con papel filtro Whatman N°40 y se destilo al vacío a 35 °C $\pm$ 2 (figura 1) con ayuda de un baño maría, hasta obtener el extracto seco.

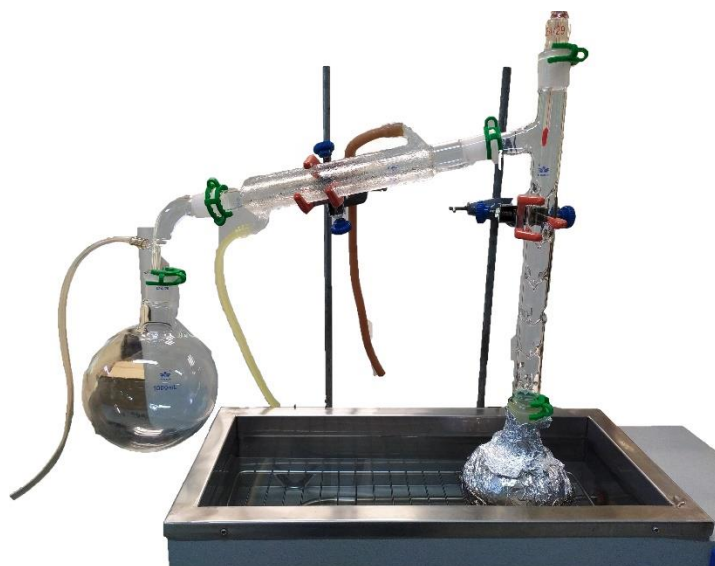


Figura 1: Destilador al vacío

Activación de la bacteria

La bacteria se tenía guardada en tubos eppendorf con 20% de caldo nutritivo y 80% glicerol a una temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, para activarla se tomaron tres azadas con un aza microbiológica estéril del tubo y se mezcló en caldo soya, esto se realizó por triplicado, para posteriormente dejar los tubos en incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas [5].

Preparación del extracto

El extracto se preparó en diferentes concentraciones, las cuales fueron 500 μL , 600 μL , 700 μL , 800 μL , 900 μL , 1000 μL y 1100 μL , una vez terminado se guardaron en un lugar oscuro y fresco hasta su posterior uso. Estos extractos se prepararon el mismo día que se utilizaron para evitar que se oxidaran o perdieran su acción.

Sembrado

La bacteria se ajustó a 0.5 de acuerdo a la escala de McFarland, siguiendo el procedimiento descrito por Elles N.E. *et al* (2010), se suspendieron las cepas en 60 mL de solución salina estéril en la cual se inoculó *E. coli*, se leyó la absorbancia y el resultado fue comparado con la absorbancia del tubo 0.5 de la escala de McFarland, el tubo ajustado presentó una concentración entre 10^6 ufc/mL a 10^8 ufc/mL.

Se preparó agar para métodos estándar y agar bacteriológico al 3% (para conferir mayor dureza al agar) de acuerdo a las especificaciones del proveedor y se esterilizó [9], se procedió a realizar un vertido en placa en un medio estéril tomando 1 mL del tubo ajustado y 25 mL de agar a una temperatura aproximada de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$. Una vez que solidificó el agar se realizaron pozos con un diámetro de $7.05\text{ mm} \pm 0.1$ con ayuda de una pipeta Pasteur estéril de acuerdo al diagrama presentado por M. Bernal & M. Guzmán (1984), como se muestra en la figura 2. En el centro se colocó el antibiótico (Ceftriaxona Fresenius Kabi), en el pozo marcado con el número 1 (figura 2) se colocó etanol para corroborar que no presentara actividad antimicrobiana contra la bacteria y en los demás pozos se colocaron las diferentes concentraciones 2- 500 μL , 3-600 μL , 4-700 μL , 5-800 μL , para los extractos restantes se distribuyeron de acuerdo a lo anterior excluyendo el pozo 5, 2-900 μL , 3-1000 μL y 4-1100 μL .

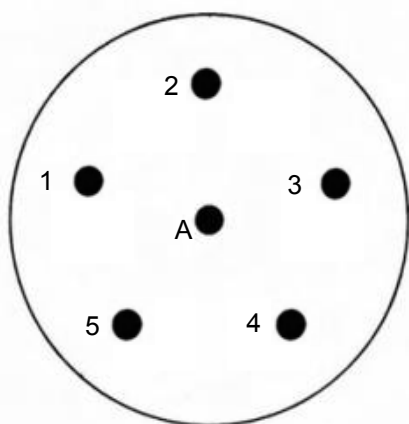


Figura 2: Patrón de distribución de los pozos en el medio de cultivo.
Fuente propia.

Una vez hechos los pozos en el agar, se vertió 25 μL de cada preparación del extracto en cada uno y se dejó la caja Petri en incubación a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 24 horas, colocada boca arriba para evitar que se perdiera el extracto. Todas las muestras se realizaron por triplicado.

Resultados y Discusiones

La actividad antibacteriana del extracto etanolico de la hoja de *Sapindus saponaria* L. (gualulu) en diferentes concentraciones frente a la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 se presentó de la siguiente manera: el extracto etanolico de la hoja a 500 μL tuvo un promedio de halo de inhibición de $8.84\text{ mm} \pm 0.89$, el extracto etanolico de la hoja a 600 μL tuvo un promedio de halo de inhibición de $8.97\text{ mm} \pm 0.08$, el extracto etanolico de la hoja a 700 μL tuvo un promedio de halo de inhibición de $8.13\text{ mm} \pm 0.54$, el extracto etanolico de la hoja a 800 μL tuvo un promedio de halo de inhibición de $8.62\text{ mm} \pm 0.21$, el extracto etanolico de la hoja a 900 μL tuvo un promedio de halo de inhibición de $9.1\text{ mm} \pm 0.96$, el extracto etanolico de la hoja a 1000 μL tuvo un promedio de halo de inhibición de $9.43\text{ mm} \pm 3.43$ y el extracto etanolico de la hoja a 1100 μL tuvo un promedio de halo de inhibición de $9.66\text{ mm} \pm 1.33$ (Tabla 3). EL etanol no presentó inhibición contra la bacteria.

Al analizar los resultados en el programa Minitab 1 mediante una prueba Tukey ($\alpha = 0.05$) se encontró que no existe diferencia significativa entre las concentraciones analizadas, pues todas inhiben estadísticamente igual a la bacteria (Tabla 3).

Tabla 3: Determinación de halos de inhibición del extracto de la hoja de *Sapindus saponaria* L, sobre *Escherichia coli* ATCC 25922.

Concentración de extracto	n	Promedio (mm)
500 μL	3	8.843 ± 0.67^a
600 μL	3	8.967 ± 0.20^a
700 μL	3	8.127 ± 0.52^a
800 μL	3	8.623 ± 0.33^a
900 μL	3	9.097 ± 0.69^a
1000 μL	3	9.427 ± 1.40^a
1100 μL	3	9.657 ± 0.81^a

En la Figura 3 se muestra gráficamente como se comportaron los resultados en relación a la inhibición, se aprecia que la inhibición de la bacteria aumenta conforme incrementa el concentrado del extracto, aunque la concentración de 700 μL disminuye al analizarlo con Tukey demuestra que no existe diferencia significativa con las demás pruebas.

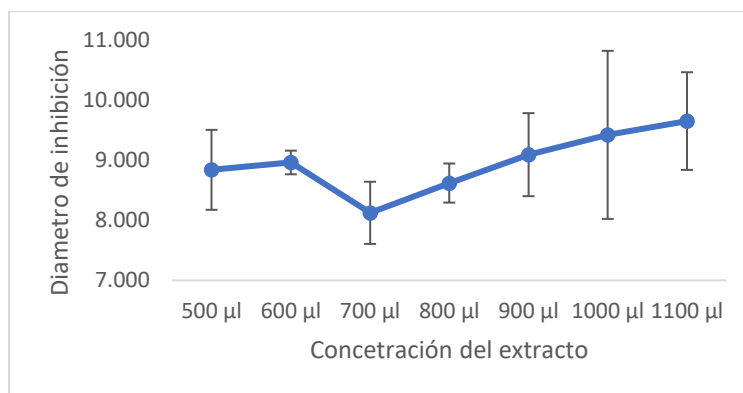


Figura 3: Inhibición de la bacteria

Abreu O.A. menciona que las hojas presentan metabolitos como flavonoides, de los cuales los dos principales compuestos son luteolina y 4-metoxiflavona, siendo la luteolina un agente antibacteriano utilizado [12] para dañar la permeabilidad de la pared celular contra *Trueperella pyogenes*, al igual G. Eumkeb *et al.*, (2012), indican que este compuesto presenta actividad contra *E. coli*. Mientras que C.M. Fuertes *et al* (1998) indican que los flavonoides presentan actividad antibacteriana contra bacterias gram negativas.

Por tal motivo encontramos que el extracto obtenido presentó actividad contra la bacteria *E. coli* ATCC 25922, aunque aún se deberían realizar más pruebas para diferenciar cual es el extracto que interviene directamente contra la bacteria.

Trabajo a futuro

Se pretende trabajar con diferentes bacterias como lo son *Salmonella*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus*, entre otras bacterias u hongos, al igual se trabajará con diferentes partes del árbol y no solo con las hojas, como los son semillas, frutos, tallos o raíces y conocer cuales presentan mejor actividad antibacteriana. Una vez teniendo resultados de otras bacterias se comenzará a trabajar con alimentos y conocer su efectividad y vida útil del extracto bajo ciertas condiciones.

Conclusiones

La actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Sapindus saponaria* L., incrementa a medida que la concentración aumenta, aunque estadísticamente no presenta diferencia significativa.

A pesar de que no se maneja una concentración demasiado alta se logró la inhibición de la bacteria, por lo que se analizará cual concentración tiene la capacidad de inhibir completamente la bacteria para así trabajar en alimentos.

Agradecimientos

Se agradece al Instituto de Ciencias Agropecuarias y al Dr. Rafael Campos Montiel por la donación del cepario de 11 bacterias.

Referencias

- [1]. C.A. Amaya, and N.E. Gutiérrez, "Evaluación de la actividad antimicrobiana y antifúngica del extracto etanólico del fruto de *Sapindus saponaria* (Pacún)". Tesis de Licenciatura. Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador. 2004.
- [2]. C. M. Fuertes, M. Roque and M. Tristan. "Flavonoides y alcaloides de *lupinus ballianus* C.C. Smith con actividad antibacteriana y antifúngica". *Ciencia e Investigación*. Vol.1-2, pp. 71-80. 1998.
- [3]. E. Corona-Jiménez, N. Martínez-Navarra, H. Ruiz-Espinosa and J. Carranza-Concha. "Ultrasound-Assisted extraction of phenolic compounds from chia (*Salvia hispanica* L.) seeds and their antioxidant activity". *Agrociencia*, vol. 50, pp. 403-412. 2016
- [4]. E. Nereyda. "Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas". *Ra Ximhai*. Vol 7-1, pp. 153-170. 2010
- [5]. J. Gutiérrez-Jiménez, L.M. Luna-Cazárez, M.I. Mendoza-Orozco, G. J. Díaz-Mariana, J.C. Burguete-Gutiérrez and J.M. Feliciano-Guzmán. "Organización, mantenimiento y preservación de la colección de

- cultivos bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH, México". *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. Vol. 35, pp. 95-102. 2015.
- [6]. J. M. Gamboa and M. N. Vásquez. "Efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus Cereus*". *REBIOLEST*, vol. 1, no. 3, pp. 41-51. 2015.
- [7]. F. Herrera, and R. García, "Evaluación in vitro del efecto bactericida de extractos acuosos de laurel, clavo, canela y tomillo sobre cinco cepas bacterianas patógenas de origen alimentario". *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. (43), pp.13-19. 2006.
- [8]. G. Eumkeb, S. Siri Wong and K. Thumanu. "Synergistic activity of luteolin and amoxillin combination against amoxillin-resistant *Escherichia coli* and mode of action". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Vol. 117, pp. 247-253. 2012.
- [9]. M. Bernal and M. Guzmán. "El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer". *Biomedica*. Vol. 4, pp.112-121. 1984
- [10]. N.E. Elles, O.M. Salcedo, P.M. Muñoz and A.R. Mendoza. "Validation of the total coliform and e. coli counting technique by the membrane filtration method in the quality control laboratory of aguas de Cartagena sa esp". *Ciencia y Salud Virtual*. Vol. 2-1. pp. 21-30. 2010.
- [11]. O.A. Abreu. "Potencial medicinal del género *Sapindus* L. (Sapindaceae) y de la especie *Sapindus saponaria* L." *Rev Cubana Plant Med*, vol. 10 n. 3-4. 2005.
- [12]. Y. Guo, Y. Liu, Z. Zhang, C. Tian, M. Liu and G. Jiang. "The antibacterial activity and Mechanism of action of luteolin against *Trueperella pyogenes*". *Infection and Drug Resistance*. Vol. 13, pp. 1697-1711. 2020.
- [13]. Z. Rodríguez-Riera, M. Robaina-Mesa, U. Jáuregui-Haza, A. Blanco-González and J.E. Rodríguez-Chanfrau. "Empleo de la radiación para la extracción de compuestos bioactivos provenientes de fuentes naturales. Estado actual y perspectiva". *CENIC Ciencias Químicas*. (45), pp. 139-147. 2014.