

Dalea bicolor: Una alternativa para el tratamiento de bacterias de importancia en salud pública

Dalea bicolor: An alternative for the treatment of bacteria of public health importance

Yesica Anayanci Morales-Ubaldo¹, Nallely Rivero-Perez¹,
Ana Lizet Morales-Ubaldo¹, Benjamín Valladares-Carranza²,
Gabino Misael López-Rodríguez¹, Adrian Zaragoza-Bastida^{1*}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de *Dalea bicolor* sobre bacterias de importancia en salud pública. La actividad antibacteriana se determinó mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Se determinó que el extracto hidroalcohólico de *Dalea bicolor* posee actividad inhibitoria a concentraciones de 3.12 a 12.5 mg/ml y actividad bactericida a 50 y 100 mg/ml, pudiendo ser considerado como una alternativa para el tratamiento de infecciones asociadas a bacterias de importancia en salud pública.

Palabras clave: actividad antibacteriana, extracto hidroalcohólico, *Dalea bicolor*, salud pública

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the *in vitro* antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of *Dalea bicolor* on bacteria of importance in public health. The antibacterial activity was determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

¹ Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Hidalgo, México

² Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Estado de México, México

* E-mail: adrian_zaragoza@uaeh.edu.mx

Recibido: 18 de mayo de 2022

Aceptado para publicación: 14 de noviembre de 2022

Publicado: 22 de diciembre de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

and the Minimum Bactericidal Concentration (MBC). It was determined that the hydroalcoholic extract of *Dalea bicolor* has inhibitory activity at concentrations of 3.12 to 12.5 mg/ml and bactericidal activity at 50 and 100 mg/ml and can be considered as an alternative for the treatment of infections associated with bacteria of importance in public health.

Key words: antibacterial activity, hydroalcoholic extract, *Dalea bicolor*, public health

INTRODUCCIÓN

El uso inadecuado de antimicrobianos en el sector humano y animal vienen afectando seriamente el control de las infecciones bacterianas, considerándose actualmente como un problema de gran importancia para la salud pública (McEwen y Collignon, 2018; Pachay-Solórzano, 2018).

Una gran cantidad de antimicrobianos se ha empleado en dosis sub-terapéuticas como promotores de crecimiento, así como para la profilaxis o tratamiento de infecciones en animales de producción, lo cual ha incrementado la aparición de bacterias resistentes a dichos fármacos. Así mismo, en muchos casos no se observa el adecuado tiempo de retiro de los antimicrobianos aplicados a los animales, lo cual deriva en la generación de residuos en alimentos de origen animal (Camou *et al.*, 2017).

Se requiere implementar acciones para disminuir el problema de la resistencia de los microorganismos a los antimicrobianos, incluyendo la regulación y vigilancia del uso y administración de estos fármacos en el sector agropecuario, así como el desarrollo de tratamientos alternativos frente a este tipo de patógenos (McEwen y Collignon, 2018). En este sentido se han propuesto diversas alternativas, destacando de entre ellas el uso de plantas medicinales y sus extractos para tratar enfermedades metabólicas, neurodegenerativas e infecciosas (Lundstrom, 2016).

En México existe una gran diversidad de especies botánicas con potenciales actividades biológicas, ejemplo de ello se encuentra *Dalea bicolor*, tradicionalmente conocida como hierba de la víbora, cabeza de ratón o escobilla. Se le atribuye diversos usos medicinales, principalmente en problemas gastrointestinales como vómito y diarrea (CONABIO, s.f.; Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana, 2009; Vásquez-Montes *et al.*, 2020). Ante esto, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de *Dalea bicolor* sobre bacterias de importancia en salud pública.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de Material Vegetal

Dalea bicolor fue colectada en el municipio Mineral del Chico, estado de Hidalgo, México (20°10'24.93" N 98°45'26.30" O). Se colectaron las partes aéreas de plantas en diversos estados fenológicos (1200 g). El material vegetal fue secado en ausencia de luz y a temperatura ambiente, y triturado en un molino semi-industrial (Pulvex MPP300).

Se corroboró la identificación de *Dalea bicolor* en el herbario de la Universidad Autónoma de México (UNAM), registrada como IBUNAM:MEXU:1414355.

Técnica de Extracción

El extracto hidroalcohólico de la planta se realizó según González-Alamilla *et al.* (2020). Para esto, se maceró el material vegetal (1000 g) en una solución de agua con metanol (70:30) durante 48 h a temperatura ambiente en ausencia de luz. Pasado ese tiempo, la solución fue pasada en dos oportunidades por papel filtro (Whatman® 42) y algodón para eliminar la mayor parte posible del material vegetal. Se utilizó un rotavapor (Büchi R-300) para concentrar a presión el líquido residual y el extracto resultante se conservó a 4 °C.

Material Biológico

Se utilizaron cepas de referencia (ATCC) de *Staphylococcus aureus*⁶⁵³⁸, *Listeria monocytogenes*¹⁹¹¹³, *Bacillus subtilis*⁶⁶³³, *Escherichia coli*³⁵²¹⁸, *Pseudomonas aeruginosa*⁹⁰²⁷, *Salmonella choleraesuis*¹⁰⁷⁰⁸ y *Salmonella tiphy*¹⁴⁰²⁸. Cada una de las cepas fue reactivada de la crioconservación en agar Müller-Hinton (BD Bioxon, Germany), por medio de la técnica de estría simple con la finalidad de obtener colonias aisladas. Se incubaron durante 24 h a 37 °C y luego se realizó la tinción Gram para corroborar su morfología y pureza. Posteriormente, las colonias en estudio fueron inoculadas en caldo nutritivo (BD Bioxon, Alemania) e incubadas en agitación constante (70 rpm) a 37 °C durante 24 h.

Actividad Antibacteriana

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de acuerdo con lo establecido por el CLSI (2012) y por Morales-Ubaldo *et al.* (2020). Así mismo, para determinar el efecto bacteriostático o bactericida se calculó la relación CMB/CMI (Rangel-López *et al.*, 2022).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se trabajó con el método de microdilución en placa evaluando con concentraciones de 400 a 3.12 mg/ml. Se utilizaron placas de 96 pozos y las muestras se trabajaron por triplicado. En cada pozo se colocó 100 µl de cada concentración y 10 µl de la suspensión bacteriana (150×10^6 cel/ml), la cual había sido ajustada al 0.5 del patrón de turbidez de McFarland (Remel, R20421, Lenexa, USA). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h en agitación constante (70 rpm). Se utilizó como control positivo a la kanamicina (AppliChem 4K10421, Germany) a concentraciones de 64 a 0.5 µg/ml y como control negativo al caldo nutritivo.

El punto final de la CMI fue determinado mediante un método colorimétrico con sales de tetrazolio (Sigma-Aldrich I8377, USA). Para esto, se colocó 20 µl de una solución de p-iodonitrotetrazolium (0.04% v/v) en cada pozo, considerándose como CMI la concentración que se tornó de color rosa.

Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Se inoculó 5 µl de cada pozo en agar Mueller Hinton. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Se consideró como CMB la concentración negativa al crecimiento bacteriano.

Análisis Estadístico

Los resultados de la actividad antibacteriana fueron normalizados (\log^{10}) y analizados mediante un diseño completamente al azar a través de un análisis de varianza. Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante una comparación de medias por Tukey con un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$), usando el programa SAS v. 9.0.

Cuadro 1. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del extracto hidroalcohólico (EHA) de *Dalea bicolor* sobre bacterias de importancia en salud pública

Bacteria	Concentración Mínima Inhibitoria		Concentración Mínima Bactericida	
	EHA (mg/ml)	Kanamicina (µg/ml)	EHA (mg/ml)	Kanamicina (µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	6.25 ^b	4	50 ^a	8
<i>Bacillus subtilis</i>	6.25 ^b	0.5	100 ^b	2
<i>Listeria monocytogenes</i>	12.5 ^c	0.5	50 ^a	2
<i>Escherichia coli</i>	12.5 ^c	1	SA	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12.5 ^c	2	SA	8
<i>Salmonella typhi</i>	3.12 ^a	2	SA	4
<i>Salmonella choleraesuis</i>	3.12 ^a	2	SA	4

SA, sin actividad

a,b,c Diferentes literales dentro de columnas indican diferencias significativas (p<0.05)

RESULTADOS

El extracto hidroalcohólico (EHA) de *Dalea bicolor* presentó actividad sobre todas las cepas evaluadas, determinándose una mejor actividad inhibitoria sobre bacterias Gram negativas como *S. choleraesuis*¹⁰⁷⁰⁸ y *S. typhi*¹⁴⁰²⁸, al obtenerse una concentración de 3.12 mg/ml para ambas bacterias. Los mejores resultados en el caso de bacterias Gram positivas se obtuvieron para *S. aureus*⁶⁵³⁸ y *B. subtilis*⁶⁶³³ al determinarse una CMI de 6.25 mg/ml, en tanto que *L. monocytogenes*¹⁹¹¹³, *E. coli*³⁵²¹⁸ y *P. aeruginosa*⁹⁰²⁷ fueron las cepas menos sensibles al tratamiento (12.5 mg/ml). De igual forma, se determinó una CMB de 50 mg/ml frente a *L. monocytogenes*¹⁹¹¹³ y *S. aureus*⁶⁵³⁸ y de 100 mg/ml para *B. subtilis*⁶⁶³³ (Cuadro 1).

La relación CMB/CMI determinó que el efecto de *D. bicolor* frente a *S. aureus* y *B. subtilis* fue bacteriostático, considerando que la relación entre ambas concentraciones fue mayor a 4, en tanto que frente a *L. monocytogenes* el efecto fue bactericida, al obtenerse una relación

igual a 4. Respecto a las bacterias Gram negativas, el extracto únicamente presentó actividad bacteriostática.

DISCUSIÓN

No se dispone de reportes sobre la actividad antibacteriana de *D. bicolor*; sin embargo, Nanayakkara *et al.* (2002) reportaron actividad antibacteriana de tres compuestos aislados a partir del extracto de acetato de etilo de las raíces de *Dalea scandens* var. *paucifolia* sobre *Staphylococcus aureus* mediante la técnica de microdilución en caldo, determinando actividad inhibitoria en un rango de concentraciones de entre 1.56 y 3.13 µg/ml, concluyendo que la actividad antibacteriana estuvo asociada a los compuestos de carácter fenólico (flavonoides).

De manera similar, Belofsky *et al.* (2004) determinaron la actividad antibacteriana de extractos orgánicos de *Dalea versicolor* var. *sessilis* sobre *S. aureus* y *B. cereus*, por el método de microdilución en placa, utilizando concentraciones de entre 7.8 y 500 µg/ml, indicando

que la actividad antibacteriana fue conferida por la presencia de chalconas y estilbenos. En un estudio posterior, Belofsky *et al.* (2014) determinaron que el extracto metanólico de partes aéreas y raíces tuvo actividad inhibitoria a concentraciones de 2.0 y 8.0 µg/ml de *Dalea searlsiae* sobre *S. mutans*, *S. aureus* y *B. subtilis*, y actividad bactericida a la concentración de 2.7-15.0 µg/ml. Por su parte, Villa-Ruano *et al.* (2017) determinaron la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Dalea foliolosa* frente a *P. syringae* pv tabaci y *P. syringae* pv tomato por el método de microdilución en caldo, determinando concentraciones de entre 35.6 y 155.3 µg/ml.

Estos estudios permiten confirmar la actividad antibacteriana asociada a *Dalea bicolor*; sin embargo, en concentraciones inferiores a las del presente estudio. Al respecto, Rangel-López *et al.* (2020) explican que la concentración de metabolitos secundarios puede verse afectada por el empleo de diferentes solventes para la obtención de los extractos.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se determinó una mejor actividad sobre bacterias Gram positivas. En este sentido, Martins *et al.* (2013) señalan que las bacterias Gram negativas son menos susceptibles a los agentes antimicrobianos en comparación con las bacterias Gram positivas, debido a la presencia de una barrera de permeabilidad en la membrana externa, la cual limita el paso de los agentes antimicrobianos al sitio de acción sobre la bacteria.

La mayoría de los estudios asocia la actividad antibacteriana a la presencia de compuestos de tipo fenólico, por lo cual se sugiere que en *D. bicolor* se encuentran contenidos compuestos químicos de este tipo que presentan actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas; sin embargo, se requiere realizar la caracterización fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *D. bicolor* para determinar el o los compuestos bioactivos.

LITERATURA CITADA

1. **Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. 2009.** Cabeza de ratón. En: Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. México. [Internet]. Disponible en: https://web.archive.org/web/20140102200741/http://www.-medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.-php?l=3&t=Cabeza_de_rat%C3%B3n&id=7032
2. **Belofsky G, Aronica M, Foss E, Diamond J, Santana F, Darley J, Dowd, PF, et al 2014.** Antimicrobial and antiinsectan phenolic metabolites of *Dalea searlsiae*. J Nat Prod 77: 1140-1149. doi: 10.1021/np401083g
3. **Belofsky G, Percivill D, Lewis K, Tegos GP, Ekart J. 2004.** Phenolic metabolites of *Dalea versicolor* that enhance antibiotic activity against model pathogenic bacteria. J Nat Prod 67: 481-484. doi: 10.1021/np030409c
4. **[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Standard-Ninth Edition. CLSI
5. **Camou T, Zunino P, Hortal M. 2017.** Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. Rev Med Urug 33: 104-127.
6. **[CONABIO] Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. s.f.** *Dalea bicolor* Humb. & Bonpl. ex Willd. México [Internet]. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/fabaceae/dalea-bicolor/fichas/ficha.htm>
7. **González-Alamilla E, Rivas-Jacobo M, Sosa-Gutiérrez C, Delgadillo-Ruiz L, Valladares-Carranza B, Rosenfeld-Miranda C, Zaragoza-Bastida A, et al. 2020.** Antibacterial effect of the methanol extract of *Salix babylonica* against important bacteria in public Health. Abanico Veterinario 10: e3. doi: 10.21929/abavet2020.1

8. **Lundstrom K. 2016.** Unlocking the therapeutic potential of plant extracts. *Future Med Chem* 8: 245-248. doi: 10.4155/fmc-2015-0012
9. **Martins S, Amorim ELC, Sobrinho TJSP, Saraiva AM, Pisciotano MNC, Aguilar CN, Teixeira JA, Mussatto SI. 2013.** Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. *Ind Crops Prod* 41: 306-311. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.04.037
10. **McEwen SA, Collignon PJ. 2018.** Antimicrobial resistance: a one health perspective. *Microbiol Spectr* 6. doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017
11. **Morales-Ubaldo A, Hernández-Alvarado J, Valladares-Carranza B, Velázquez-Ordoñez V, Delgadillo-Ruiz L, Rosenfeld-Miranda C, Rivero-Pérez N, et al. 2020.** Antibacterial activity of the *Croton draco* hidroalcoholic extract on bacteria of sanitary importance. *Abanico Veterinario* 10: e1. doi: 10.21929/abavet2020.2
12. **Nanayakkara NP, Burandt CL Jr, Jacob MR. 2002.** Flavonoids with activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from *Dalea scandens* var. *paucifolia*. *Planta Med* 68: 519-522. doi: 10.1055/s-2002-32554
13. **Pachay Solórzano JW. 2018.** Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. Caso de estudio: Hospital Oncológico «Dr. Julio Villacreses Colmont Solca», Portoviejo. *Universidad y Sociedad* 10: 219-223.
14. **Rangel-López L, Rivero-Pérez N, Valladares-Carranza B, Olmedo-Juárez A, Delgadillo-Ruiz L, Vega-Sánchez V, Hori-Oshima S, Nassan MA, Batiha GE, Zaragoza-Bastida A. 2022.** Antibacterial potential of *Caesalpinia coriaria* (Jacq) willd fruit against *Aeromonas* spp of aquaculture importance. *Animals* 12: 511. doi: 10.3390/ani1204051
15. **Rangel-López L, Zaragoza-Bastida A, Valladares-Carranza B, Peláez-Ace-ro A, Sosa-Gutiérrez CG, Hetta HF, Batiha GE-S, et al.. 2020.** *In vitro* antibacterial potential of *Salix babylo-nica* extract against bacteria that affect *Oncorhynchus mykiss* and *Oreochromis* spp. *Animals* 10: 1340. doi: 10.3390/ani10081340
16. **Vásquez-Montes S, Villarreal-Guerre-ro F, Amaya-Olivas NI, Hernández-Ochoa LR. 2020.** Producción y composición química del aceite esencial de *Dalea bicolor* en diferentes regiones de Chihuahua, México. *Bot Sci* 98: 486-498. doi: 10.17129/botsci.2602
17. **Villa-Ruano N, Pacheco-Hernández Y, Zárate-Reyes JA, Lozoya-Gloria E, Cruz-Durán R. 2017.** Chemical profile, nutraceutical and anti-phytobacterial properties of the essential oil from *Dalea foliolosa* (Fabaceae). *Emir J Food Agr* 29: 724-728. doi: 10.9755/ejfa.-2017.v29.i9.99