

# Actividad antimicrobiana y examen fitoquímico preliminar de siete angiospermas y una muestra de propóleo

Antonio Sanabria-Galindo\*

Luz Adriana Cárdenas

María Lucy Parroquiano

## Resumen

Mediante la Concentración Crítica (C.C.) se determinó la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Chromolaena odorata*, *Mangifera indica*, *Sida rhombifolia*, *Equisetum bogotense*, *Thymus vulgaris*, *Musa paradisiaca*, *Phytolacca bogotensis* y una muestra de propóleo frente a dos bacterias Gram(+), tres Gram(-), una levadura y tres hongos filamentosos. Se encontró que el propóleo, *C. odorata* y *E. bogotense* tienen una potente actividad frente a las bacterias Gram(+) (C.C. entre 10 y 175  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); *C. odorata* inhibió parcialmente a *C. albicans* y *P. bogotensis* a *Aspergillus niger*.

**Palabras clave:** Antimicrobianos en plantas – Examen fitoquímico preliminar.

## Summary

### Antimicrobial activity and phytochemical screening of seven angiosperms and a propolis sample

Antimicrobial activity of ethanolic extracts from *Chromolaena odorata*, *Mangifera indica*, *Sida rhombifolia*, *Equisetum bogotense*, *Thymus vulgaris*, *Musa paradisiaca*, *Phytolacca bogotensis* and a propolis sample, was established by measuring the critical concentration (CC) in two Gram(-) bacteria, three Gram(+) bacteria, a yeast and three filamentous fungi. The results showed a high activity of propolis, *C. odorata*, and *E. bogotense* against Gram(+) bacteria (CC between 10 and 175  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). *C. odorata* and *P. bogotensis* exhibited partial inhibition of *C. albicans* and *Aspergillus niger* respectively.

**Key words:** Antimicrobials in plants – Phytochemical screening.

---

Recibido para evaluación: Diciembre de 2001  
Aceptado para publicación: Octubre de 2002

---

\* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias,  
Departamento de Farmacia, A.A. 14490, Bogotá, D. C.,  
Colombia.  
E-mail: asanab@ciencias.unal.edu.co

## Introducción

Continuando con los estudios iniciados en 1985 sobre actividad antibacteriana (1) y en 1986 sobre acción antifúngica (2) de especies de Angiospermas colombianas, en el presente trabajo se informa sobre el estudio de 7 especies vegetales y una muestra de propóleo en razón de su reputación de ser utilizadas en medicina popular como antiinfecciosas. A continuación se presenta los aspectos más notorios sobre las especies estudiadas.

***Sida rhombifolia*** (Malvaceae), n.v.: “Escoba babosa” o “escoba negra”. Según García-Barriga (3) es un gran desinfectante y desinflamante, Gupta (4) también informa sobre su actividad frente a *Bacillus antracis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Ascaris lumbricoides* y que las hojas contienen saponinas y la raíz efedrina; en medicina ayurvédica se utiliza para el tratamiento de inflamaciones (5).

***Mangifera indica*** L. (Anacardiaceae), n.v.: “Mango”. La decocción de la raíz se utiliza como antihelmíntico y en afecciones broncopulmonares (3). De la raíz se han aislado cromonas como 3-hidroxi-2(4'-metoxibenzoil)cromona y 3-metoxi-2(4'-metoxibenzoil)cromona (6) y triterpenoides (7).

***Phytolacca bogotensis*** H.B.K. (Phytolaccaceae), n.v.: “Guaba”, “yerba de culebra”. En muchas regiones de Colombia se utiliza en estados inflamatorios de encías, para el tratamiento de mastitis, parotiditis y el extracto fluido en casos de faringitis (3); *P. bogotensis* y otras especies del mismo género contienen triterpenos como el ácido serjánico y el ácido 3-acetiloleanólico (8).

***Musa paradisiaca*** (Musaceae), n.v.: “Plátano hartón”. Según Bejarano y Vejarano (9) en

“la cáscara del plátano hartón maduro están presentes butirato de isoamilo e isovalerato de isoamilo, que son sustancias que retardan el crecimiento de algunos hongos”.

***Chromolaena odorata*** (L.) Kin & H. Robinson (Asteraceae), n.v.: “Sanalotodo”. Biller (10) informa sobre la presencia de lactonas sesquiterpénicas, triterpenoides, flavonoides y 5 alcaloides derivados de la pirrolidina y por medio de cromatografía de gases se identificaron más de 40 componentes volátiles (11).

***Equisetum bogotense*** (Equisetaceae), n.v.: “Cola de caballo”. Es una especie muy utilizada en medicina popular especialmente como diurético y astringente y en afecciones pulmonares por vía oral (3).

***Thymus vulgaris*** (Lamiaceae), n.v.: “Tomillo”. Se utiliza popularmente para preparar tisanas sudoríficas y calmantes de la tos ordinaria y de la tosferina; también se utiliza para conservar las carnes y como condimento (3). Además de timol y carvacrol, de esta especie se aislaron flavonoides (12) con importantes actividades farmacológicas.

**Propóleo.** El propóleo es una sustancia resinosa constituida por bálsamos y resinas (55%), ceras (30%), aceites esenciales (10%) y polen (5%) que las abejas producen como protección de la colmena y de la miel a infecciones (13). La composición del propóleo es muy variada y depende del tipo de abeja y de la clase de plantas que visitan las abejas y en el mismo se han encontrado ácidos diterpénicos (14), flavonoides (15) y otras sustancias. El propóleo se reconoce universalmente por sus efectos desinfectantes y se encontró que su extracto etanólico aumenta la potencia de algunos antibióticos frente a *Staphylococcus aureus* (16).

## Parte experimental

### Material vegetal

Las especies se seleccionaron con base en informaciones sobre el uso popular recogida en diferentes plazas de Bogotá (Paloquemao, 7 de Agosto y Corabastos) y complementada con referencias bibliográficas que confirmaron su uso como antiinfecciosas. De la especie *M. indica* se utilizó la raíz, de *M. paradisiaca* se procesó la corteza del fruto maduro y de las demás especies la parte aérea. Todas las especies fueron determinadas en el Herbario Nacional Colombiano (COL) y en sus archivos reposa un ejemplar de las mismas.

El material vegetal se secó en una estufa con aire circulante a 50°C durante 48 horas, se molió, se pasó por un tamiz No. 30 (USP) y se almacenó en recipientes herméticos a 3°C. De propóleo se utilizó una muestra comercial (obtenido en la tienda "Apinal"), se pulverizó en mortero y se almacenó igual que el material vegetal.

### Microorganismos de ensayo

Para la realización de los ensayos para determinar la actividad antimicrobiana se utilizaron el bacilo Gram(+) *Bacillus subtilis* ATCC6633, los bacilos Gram(-) *Escherichia coli* ATCC13706, *Salmonella typhi* ATCC19430 y *Klebsiella pneumoniae*, el coco Gram(+) *Staphylococcus aureus* ATCC65380, la levadura *Candida albicans* ATCC10231 y los hongos filamentosos *Aspergillus niger*, *Mucor* sp. y *Fusarium oxysporum*, todos del cepario del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

### Análisis Fitoquímico preliminar

A cada una de las 8 muestras (7 especies vegetales y el propóleo) se les practicó un análisis

fitoquímico preliminar para evaluar la presencia de alcaloides (reacciones de Mayer, Valser, Dragendorff y Reineckato de amonio), flavonoides (Reacción de Shinoda y calentamiento con HCl para leucoantocianidinas), taninos (Reacción con gelatina-sal), nafto y antraquinonas (Reacción de Bornträger-Kraus), saponinas (Reacciones de espuma y de hemólisis), esteroides y/o triterpenoides (CCD y reacción de Liebermann-Burchard), lactonas terpénicas (CCD y reacción con vainillina-sulfúrico), cumarinas (CCD, UV, hidroxamato férrico) y cardiotónicos (CCD, reacción de Raymond), siguiendo estrictamente la metodología descrita por Sانبria y col. (17).

### Actividad antibacteriana y antifúngica

#### Obtención de los extractos

Los extractos para la evaluación de la actividad antimicrobiana se obtuvieron por maceración de 10 g de material (plantas o propóleo) seco y pulverizado en 80 mL de etanol del 95% durante 12-14 horas, se agitó magnéticamente a 40°C durante 1 hora, se filtró al vacío, se lavó el residuo con 40 mL de etanol y se destiló el solvente en un evaporador rotatorio a una temperatura inferior a 40°C. El residuo seco se utilizó para los ensayos.

### Mantenimiento del Cepario

Las cepas de mantenimiento se obtuvieron por incubación de las bacterias en agar Müller-Hinton a 37°C y la levadura y los hongos en agar Sabouraud-dextrosa al 2% (18).

### Preparación de los inóculos

Las distintas bacterias se sembraron por estrías en placas con agar Müller-Hinton, se

incubaron por 24 horas a 37°C, luego se tomó una colonia y se sembró en 25 mL de caldo Müeller-Hinton, se agitó en vortex, se tomaron 40 µL de este inóculo y se resembró en 25 mL de caldo Müeller-Hinton, se incubó a 37°C por 24 horas y se realizaron las siguientes diluciones: 1:100.000 para las bacterias Gram(-) y 1:100 para las bacterias Gram(+) y para *Candida albicans*, condiciones en las cuales se obtuvieron entre 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> UFC (Unidades Formadoras de Colonias), número recomendado para estos ensayos (2,18). Para *C. albicans* se utilizó el mismo procedimiento sustituyendo el caldo Müller-Hinton por caldo Sabouraud-dextrosa al 2%.

Los inóculos para hongos se prepararon por la siembra de 2 rodajas de agar Sabouraud-dextrosa al 2% (diámetro 10 mm y altura 3 mm) en 4 puntos equidistantes con el hongo correspondiente y luego se incubó a 27°C durante 72 horas; luego se suspendieron las rodajas en 10 mL de solución salina estéril y se homogenizó por un minuto en un agitador vortex (18).

### Evaluación de la actividad antibacteriana por el método de perforación y difusión en gel

Las diluciones indicadas antes para las bacterias y la levadura se homogenizaron en un vortex y se tomaron 500 µL, los cuales se inocularon en viales con agar Müller-Hinton (M-H) fundido a 42°C, se homogenizó en vortex y se vertieron sobre cajas de Petri estériles de 150 mm de diámetro, se dejó solidificar y se hicieron 10 perforaciones equidistantes de 7 mm de diámetro. En dichas perforaciones se agregaron 100 µL de: etanol del 95%, sulfato de estreptomina a 40 µg/mL, y diluciones de los extractos secos en alcohol a 24.000, 12.000, 6.000, 3.000, 1.500, 750, 375 y 187,5 µg/mL; se dejó en pre-difusión durante 30 minutos a temperatura

ambiente, se incubó a 37°C durante 24 horas y al cabo de este tiempo se midieron los diámetros de inhibición; los resultados son el promedio de 2 determinaciones. Para *C. albicans* se siguió el mismo procedimiento sustituyendo el agar M-H por agar Sabouraud-dextrosa al 2% (S-D), se incubó a 25°C y como control se utilizó una solución de nitrato de isoconazol a 62,5 µg/mL.

### Evaluación de la actividad antifúngica por el método de perforación y difusión en gel

Se siguió el mismo procedimiento descrito para la evaluación de la actividad antibacteriana con las siguientes modificaciones: Se utilizó agar S-D en lugar de agar M-H; sobre los viales con agar fundido se adicionaron 500 µL del inóculo para *F. oxysporun* (*F.o.*) y *Mucor* sp. (*M.*) y 100 µL para *A. niger* (*A.n.*); como patrón se utilizó nitrato de isoconazol a 500 µg/mL para *F.o.* y *M.* y 100 µg/mL para *A.n.*; la incubación se llevó a cabo a 25°C durante 48 horas.

### Determinación de la Concentración Crítica (C.C.)

Una vez realizadas las lecturas, se graficó el logaritmo natural de las concentraciones contra el cuadrado de los diámetros de inhibición; se trazó la recta y el punto de intersección sobre la ordenada corresponde al valor de la Concentración Crítica (2,19).

## Resultados y discusión

### Análisis fitoquímico preliminar

En la Tabla 1 se resumen los resultados de practicar una marcha fitoquímica preliminar (17) a las 7 especies de plantas y la muestra de propóleo.

**Tabla 1.** Resultados de los análisis fitoquímicos preliminares practicados a 7 especies de Angiospermas.

Ensayo para	C.o.	M.p.	M.i.	S.r.	P.b.	E.b.	T.v.	Prop.
Alcaloides	(++)	(-)	(-)	(+)	(++)	(++)	(-)	(-)
Flavonoides	(+)	(-)	(+++)	(+)	(-)	(++)	(+++)	(+)
Nafto y/o antraquinonas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Taninos	(+)	(-)	(++)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
Saponinas	(-)	(-)	(-)	(++)	(+++)	(-)	(-)	(-)
Lactonas terpénicas	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Cumarinas	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Cardiotónicos	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Esteroides y/o triterpenoides	(++)	(++)	(++)	(++)	(+++)	(-)	(++)	(++)

Notas: Presente en abundancia (+++), mediana cantidad (++), pequeña cantidad (+), ausente (-). C.o.=*Chromolaena odorata*; M.p.=*Musa paradisiaca*; M.i.=*Mangifera indica*; S.r.=*Sida rhombifolia*; P.b.=*Phytolaca bogotensis*; E.b.=*Equisetum bogotense*; T.v.=*Thymus vulgaris*.

## Evaluación de la actividad antimicrobiana

Siguiendo la metodología descrita, se determinó la Concentración Crítica (C.C.) de diluciones en etanol del 95% (24.000, 12.000, 6.000, 3.000, 1.500, 750, 375 y 187,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de los residuos de extractos etanólicos de las 7 especies de plantas frente a los 9 organismos de ensayo.

Inicialmente se determinó la C.C. de los patrones sulfato de estreptomycin para bacterias y nitrato de isoconazol para la levadura y los hongos, cuyos resultados se expresan entre corchete en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : *Bacillus subtilis* [6], *Escherichia coli* [15], *Salmonella typhi* [26], *Klebsiella pneumoniae* [20], *Staphylococcus aureus* [8], *Candida albicans* [8], *Aspergillus niger* [14] *Mucor* sp. [32] y *Fusarium oxysporum*[48].

Respecto a la actividad antibacteriana, se encontró que en las condiciones de los ensayos, los extractos sólo presentaron actividad frente a

las dos bacterias Gram(+), resultados que se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Concentración Crítica (en  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de los extractos etanólicos de 7 especies de Angiospermas frente a *B. subtilis* y *S. aureus*.

Especie	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>C. odorata</i>	108	175
<i>M. indica</i>	880	430
<i>S. rhombifolia</i>	*	10
<i>E. bogotense</i>	122	110
<i>T. vulgaris</i>	790	680
<i>M. paradisiaca</i>	(-)	(-)
<i>P. bogotensis</i>	*	(-)
Propóleo	10	17

\*=Resultados insuficientes para calcular la C.C., (-) = Resultado negativo

En relación con la acción antifúngica y frente a *C. albicans*, la actividad de los 8 extractos fue muy baja. Frente a *C. albicans* la especie *C. odorata* presentó halos de reducción a concentraciones comprendidas entre 12000 y 750  $\mu\text{g/mL}$ ; contra *A. niger*, la especie *P. bogotensis* presentó halos de reducción del crecimiento entre 3000 y 750  $\mu\text{g/mL}$ .

De todos los resultados obtenidos se destaca una significativa actividad del propóleo frente a *B. subtilis* y *S. aureus* (C.C. de 10 y 17  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente), resultados comparables con la actividad del patrón de sulfato de estreptomina (6 y 14  $\mu\text{g/mL}$ ) que ameritan una investigación posterior orientada a la identificación de los constituyentes activos. De las especies de plantas se destaca la actividad de *C. odorata* y de *E. bogotense* frente a las dos bacterias Gram(+) con C.C. comprendidas entre 175 y 108  $\mu\text{g/mL}$ , valores para un extracto etanólico total que permiten necesariamente el posible aislamiento de sustancias con potencia muy similar a los antibióticos de uso clínico actual.

Si comparamos los resultados del análisis fitoquímico preliminar (Tabla 1) con la actividad antibacteriana frente a *B. subtilis* y *S. aureus* (Tabla 2), se observa que en los 3 extractos más activos (propóleo, *C. odorata* y *E. bogotense*) tienen en común la presencia de flavonoides. El extracto de *C. odorata* que produce una inhibición parcial de *C. albicans*, da reacciones positivas para flavonoides, alcaloides, lactonas terpénicas, taninios y esteroides y/o triterpenoides; el extracto de *P. bogotensis*, que inhibió parcialmente a *A. niger*, produjo reacciones positivas para alcaloides, saponinas y esteroides y/o triterpenoides.

## Agradecimientos

Se agradece al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y a

COLCIENCIAS por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo a través del proyecto "Búsqueda de principios activos en plantas medicinales colombianas" que dirige el doctor Roberto Pinzón Serrano.

## Bibliografía

1. J.R. Mantilla y A. Sanabria, Actividad antibacteriana de plantas superiores colombianas. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, **4**(2), 25 (1985).
2. A. Sanabria y J.R. Mantilla, Actividad antifúngica de plantas superiores colombianas. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, **15**, 17 (1986).
3. H. García Barriga, "Flora Medicinal de Colombia: Botánica Médica", Instituto de Ciencias Naturales, U.N., Imprenta Nacional, Bogotá, Vol. 1-3, 1974.
4. M.P. Gupta E., "270 Plantas medicinales Iberoamericanas", CYTED, 1995, pp. 397-98, 438-40.
5. S. Venkatesh, M. Swamy and S. Vijayalakshmi, Pharmacognostical observation on *Sida rhomboides*. *Indian Drugs*, **31**(9), 421 (1994). *Vía Chem. Abst.*, **121**, 308105j (1994).
6. M.A. Khan, S.S. Nitami y S.W. Azeem, New chromones from the root of *Mangifera indica*. *Phytotherapy*, **66**(5), 423 (1995). *Vía Chem. Abst.*, **124**: 170641f (1996).
7. V. Anjaneyulo, K. Prasad, M. Harischandra, K. Ravi and J.D. Connolly, Triterpenoids from *Mangifera indica*. *Phytochem.*, **24**, 2359 (1985).
8. E. Salka and O. Nielsen, Triterpenoid saponins from *Phytolacca rivinoides* and *Phytolacca bogotensis*. *Phytochem.*, **39**, 625 (1995).

9. M. Bejarano y X. Vejarano, "Algunos ésteres con actividad fungistática, presentes en la cáscara de plátano hartón maduro (*Musa paradisiaca*)", Tesis de grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1971.
10. A. Biller and M. Bopre, Perrolizidine alkaloids in *Chormolaena odorata*, chemical and chemoecological aspect. *Phytochem.*, **35**, 615 (1994).
11. X. Nguyen, B. Kim and L.E. Clerq, The constituents of the leaf oil of *Chromolaena odorata* (L.) R.M. King and H. Robinson from Vietman. *J. Essent. Oil Res.*, **4(3)**, 309 (1992). *Vía Chem. Abst.*, **118**, 209414n (1993).
12. C.O. Van Den Broucke, O. Chris, M. Dommissie, A.R. Esmans, L. Eddy and A. Jozef, Three methylated flavones from *T. vulgaris*. *Phytochem.*, **21**, 2581 (1982).
13. N. Ioiris, "Las abejas farmacéuticas aladas", Ed. MIR, Moscú, 1985, pp. 121-144.
14. V. Bankova and L. Marccuci, Antibacterial diterpene acids from Brazilian propolis. *Z. Naturforsch, C. Biosci.*, **51(5/6)**, 227 (1996). *Vía Chem. Abst.*, **125**, 138223f (1996).
15. C. Jiapong, M. Xue and L. Bingwe, The chemical constituents of flavonoids from Liaoxi propolis. *Zhongguo Yaoxue Zazhi.*, **31(5)**, 224 (1996). *Vía Chem. Abst.*, **125**, 177146c (1996).
16. W. Krol and S.Y. Scheller, Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on growth of *Staphylococcus aureus*. *Arsneim. Foesch.*, **43(5)**, 607 (1993). *Vía Chem. Abst.*, **118**, 55971c (1993).
17. A. Sanabria-Galindo, S.I. López y R. Gualdrón, Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, **26**, 15 (1997).
18. J. Garzón y L. Quintero, "Identificación de la(s) sustancia(s) responsable(s) de la actividad antimicrobiana de *Drimys granadensis*", Tesis de grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 1996, pp. 23-34.
19. W.B. Hugo and A.D. Rusell, "Pharmaceutical Microbiology", Blackwell Scientific Publications, 1977, p. 103.