

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *In vitro* DE ANGIOSPERMAS COLOMBIANAS

Antonio Sanabria-Galindo*, Adriana Mendoza Ruiz* y Amanda Lucía Moreno*

* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, AA 14 490, Santafé de Bogotá, Colombia.
E.-Mail: asanab@ciencias.ciencias.unal.edu.co

RESUMEN

Se determinó la actividad de 29 especies de Angiospermas frente a *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Mucor* sp. Las especies *Cavendishia bracterata*, *Piper aduncum*, *Aragoa abietina* y *Piper bogotensis* presentaron la mayor actividad antibacteriana y *Chromolaena odorata* mostró actividad antifúngica y antibacteriana.

Palabras Clave: antimicrobianos en angiospermas - antibacterianos en angiospermas - antifúngicos en angiospermas.

SUMMARY

IN VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COLOMBIAN ANGIOSPERMS

The activity of 29 species of Angiosperms against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* and *Mucor* sp. Among all the plants tested *Cavendishia bracterata*, *Piper aduncum*, *Aragoa abietina* and *Piper bogotensis* showed de best antibacterial activity; *Chromolaena odorata* showed in addition antifungal activity.

Key Words: Antimicrobial in Angiosperms - Antibacterial in Angiosperms - antifungal in Angiosperms.

INTRODUCCIÓN

A pesar de la amplia disponibilidad de antibióticos de uso clínico y análogos semisintéticos, en razón del incremento gradual de la resistencia de los microorganismos a los antibióticos y a la aparición de nuevas infecciones, es necesario continuar con la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos. Por ejemplo, en el mo-

mento se necesitan principios activos que exhiban buena actividad contra ciertas cepas de *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Legionellae*, de anaerobios y en los países tropicales el control de las infecciones causadas por hongos tiene grandes complicaciones (1).

Si bien es cierto que hasta el momento no se han aislado sustancias activas de plantas que compitan ventajosamente con los antibióticos obtenidos de bacterias y de hongos, desde la más remota antigüedad el hombre ha utilizado exitosamente las plantas para el control de una gran variedad de infecciones. Entonces aquí cabe preguntarnos por qué surge esta aparente contradicción y la respuesta puede ser que las plantas en su evolución, la mayoría de veces su respuesta adaptativa a un ambiente multifactorial está dado por la interacción de varias sustancias y no por constituyentes aislados como se ha pretendido que ocurra en la metodología que empleamos para la obtención de estos principios activos. En consecuencia, se hace necesario que en dichos métodos de detección de la actividad antimicrobiana se ponga especial atención a la actividad de los distintos extractos en una rigurosa comparación cuantitativa con la acción de los principios aislados.

En el sector agrícola, las infecciones producidas por hongos causan enormes pérdidas económicas y por esta razón también es muy importante la búsqueda de antifúngicos a partir de plantas, que contribuyan a solucionar este problema sin aumentar la contaminación ambiental y la toxicidad de los alimentos.

También es importante anotar que la actividad antimicrobiana *in vitro* sólo permite la detección de la presencia de sustancias que posean directamente acción antibiótica, pero deja por fuera todas aquellos constituyentes que ejercen su acción aumentando la respuesta inmune del huésped que le permiten controlar adecuadamente al organismo invasor (hongo o bacteria). Por esta razón, es necesario evaluar la actividad inmunomoduladora de las especies vegetales que nos ocupan.

Otro aspecto importante se refiere a las concentraciones más convenientes de los extractos para llevar a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana, porque puede ocurrir que se utilicen concentraciones tan

Recibido para evaluación: 4 de noviembre de 1997

Aprobado para publicación 28 de noviembre de 1997

elevadas que permitan la detección de sustancias con un potencial antimicrobiano útil muy pobre, o que se empleen concentraciones tan bajas que se dejen por fuera constituyentes con un buen potencial antimicrobiano. En el presente trabajo y gracias a experiencias anteriores (2-4) se seleccionó el método de difusión en agar utilizando concentraciones del extracto etanólico de 12, 6 y 3 mg/ml, con lo cual es posible detectar sustancias poco activas (inhiben a concentraciones superiores a 500 mcg/ml) presentes en la planta en altas concentraciones (alrededor del 5 % del peso seco) o sustancias muy activas (inhiben a concentraciones cercanas a 12 mcg/ml) presentes en bajas concentraciones en la planta (alrededor de 0,1 % de su peso seco). De esta manera es posible tener una idea aproximada del potencial antimicrobiano *in vitro* de la especie vegetal en estudio. La observación de la respuesta antimicrobiana a estas 3 concentraciones también permite darse cuenta si existe una correlación entre la concentración del extracto y la acción antimicrobiana, es decir, se puede apreciar si hay una correcta difusión de las sustancias en el agar.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Todas las especies analizadas se colectaron en regiones del Departamento de Cundinamarca (Colombia) teniendo en cuenta su uso en medicina popular como antiinfeccioso y/o el hecho de pertenecer a familias con antecedentes de poseer metabolitos secundarios con algún tipo de bioactividad.

Se prepararon especímenes de herbario los cuales se determinaron y registraron en el Herbario Nacional Colombiano (COL).

De cada especie se colectó la parte aérea (hojas, tallos tiernos, flores y/o frutos) a excepción de *Solanum oblongifolium* del cual se trabajó con los frutos desarrollados. Dicho material se secó durante 48 horas con aire circulante a 50 °C, se molió y se guardó en recipientes herméticos a 4 °C hasta el momento de su utilización.

Microorganismos de ensayo

Los microorganismos se seleccionaron teniendo en cuenta su facilidad de desarrollo en medios de cultivo convencionales, su empleo en ensayos de susceptibilidad a antibióticos y el ser representativos de grupos de organismos de importancia clínica y agrícola (5).

Se utilizaron los siguientes organismos de prueba: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Bacilo Gram positivo),

Escherichia coli ATCC 13706 (Bacilo Gram negativo), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 (Bacilo Gram negativo), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (Bacilo Gram negativo), *Salmonella typhi* ATCC 19430 (Bacilo Gram negativo), *Staphylococcus aureus* ATCC 65380 (Coco Gram positivo), *Candida albicans* ATCC 10231 (Levadura), *Aspergillus niger* FUN (Hongo filamentoso), *Fusarium oxisporum* FUN (Hongo filamentoso) y *Mucor* sp. FUN (Hongo filamentoso). (FUN significa cepario del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional).

Obtención de los extractos

Se macearon 10 g. de material vegetal seco con 120 ml de etanol del 95 % durante 24 horas, se agitó a 200 r.p.m. durante 10 minutos, se filtró al vacío y el residuo se lavó con 30 ml de etanol. Se destiló el etanol a presión reducida por debajo de 40 °C, se dejó secar perfectamente y de este extracto seco se prepararon soluciones en etanol del 95 % con 12, 6 y 3 mg/ml.

Preparación de los inóculos

En todo el estudio se partió de cepas de mantenimiento conservadas bajo refrigeración a 4 °C en tubos en cuña con agar Müeller Hinton (AMH) y agar Saboraud-dextrosa (AS) para bacterias y hongos respectivamente.

Cada una de las cepas de mantenimiento de las bacterias se sembraron por estrías en placas con agar Müeller Hinton (AMH), se incubaron a 37 °C por 24 horas, al cabo de las cuales se tomó una colonia y se sembró en 5 ml de caldo Müeller Hinton; se incubó a 37 °C por 18 horas, se realizaron resiembras sucesivas en el mismo caldo para asegurar que los microorganismos se encontraban en fase de crecimiento exponencial. Cada uno de estos cultivos se diluyeron con solución salina estéril con el fin de obtener entre 10^7 y 10^8 UFC (unidades formadoras de colonias); se utilizaron diluciones 1:1.000.000 para *Pseudomonas aeruginosa*, 1:100.000 para las demás bacterias Gram negativas, 1:100 para las bacterias Gram positivas y *Candida albicans* (se cultivó 24 horas en caldo Saboraud-dextrosa al 2 % a 25 °C) (6-8).

Para determinar la actividad antifúngica, se hicieron siembras por estría de los cultivos de mantenimiento en placas con agar Saboraud-dextrosa al 2 %, se incubaron a 25 °C por 48 horas *Candida albicans* y *Aspergillus niger* y por 72 horas *Fusarium oxisporum* y *Mucor* sp.

Evaluación de la actividad antibacteriana

La dilución indicada antes para cada bacteria se homogenizó en un agitador Vortex, se tomaron 0,5 ml y se inocularon en un vial con 25 ml de AMH a 42 °C, se homogenizó con el Vortex y se vertió en una caja estéril de 90 mm de diámetro, se dejó solidificar y se hicieron 8 perforaciones equidistantes de 7 mm de diámetro. En cada perforación se aplicaron 0,1 ml (micropipeta automática) del patrón de antibiótico (400 mcg/ml para *P. aeruginosa* y 40 mcg/ml de sulfato de estreptomina para las demás bacterias), 0,1 ml del blanco (etanol del 95 %) y por duplicado cada una de las concentraciones del extracto etanólico de la respectiva especie vegetal (12, 6 y 3 mg/ml en etanol). Se dejó en predifusión durante 30 minutos, se incubó a 37 °C y se realizaron las medidas de los diámetros de inhibición a las 24 y 48 horas.

Actividad frente a *Candida albicans*

Se siguió el mismo procedimiento descrito para determinar la actividad antibacteriana, pero se utilizó como medio de cultivo agar Saboraud-dextrosa al 2 %, incubación a 25 °C, las lecturas se hicieron a las 48 y a la 72 horas y se empleó como patrón nitrato de isoconazol a 31,3 mcg/ml.

Evaluación de la actividad antifúngica

Se tomaron 2 rodajas de 10 mm de diámetro del cultivo en placa de cada hongo y se suspendieron en 10 ml de solución salina estéril, se homogenizó por un minuto en el Vortex. Se tomaron 0,5 ml de *F. oxisporum* y de *Mucor* sp. y 0,1 ml de *A. niger* y se agregaron en viales con 25 ml de agar Saboraud-dextrosa a 42 °C, luego se siguió el mismo procedimiento descrito para las bacterias. Las lecturas se realizaron a las 48 y a las 72 horas. Como patrón de referencia se utilizó nitrato de isoconazol a 500 mcg/ml frente a *F. oxisporum* y *Mucor* sp. y 31,3 mcg/ml contra *A. niger*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1, se resumen los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana y antifúngica de las especies vegetales evaluadas. La actividad de cada especie se catalogó de acuerdo con su espectro, es decir, si actuaba sobre bacterias u hongos en general o si por el contrario su actividad era específica sobre ciertas especies de bacterias y/u hongos, y en segundo lugar a su grado de actividad

referido al tamaño de las zonas de inhibición que se presentaron a 12, 6 y/o 3 mg/ml de extracto.

Debido a que los extractos vegetales están constituidos por sustancias de diversas características, no es posible comparar su "potencia" con respecto al patrón, sino que sólo se puede determinar para cada microorganismo el **grado de actividad del extracto** en relación con un patrón de referencia. Ese grado de actividad se refiere a la presencia y al tamaño de las zonas de inhibición observadas para un extracto en particular como resultado de la sumatoria de las actividades de varias sustancias o la actividad que pueda expresar una determinada sustancia como reflejo de su concentración en el extracto.

El patrón de sulfato de estreptomina produjo los siguientes diámetros promedio de inhibición expresados en mm: *S. aeruginosa* 26,0 (400 mcg/ml), *S. typhi* 24,4 (40 mcg/ml), *K. pneumoniae* 23,4 (40 mcg/ml), *E. coli* 22,3 (40 mcg/ml), *S. aureus* 28,7 (40 mcg/ml) y *B. subtilis* 24,3 (40 mcg/ml). Igualmente, el nitrato de isoconazol dio lugar a los siguientes diámetros de inhibición: *Candida albicans* 29,0 (31,3 mcg/ml), *A. niger* 32,0 (31,3 mcg/ml), *F. oxisporum* 18,0 (500 mcg/ml) y *Mucor* sp. 15,5 (500 mcg/ml).

Como se muestra en la Tabla 1., de las 29 especies de plantas superiores estudiadas, 19 (66 %) presentaron algún tipo de actividad antimicrobiana.

Dentro de estas especies se destacan por su actividad sobre bacterias Gram positivas *Ageratum conyzoides*, *Heliopsis oppositifolia* (ambas Asteraceae), *Physalis peruviana*, *Solanum nigrum* (ambas Solanaceae) y *Hamelia patens* (Rubiaceae) presentaron actividad sobre las 2 bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*) con diámetros de inhibición ≤ 15 mm a una concentración de 3 mg/ml; la mayor actividad frente a estas dos bacterias la presentó *Piper bogotensis*, la cual produjo diámetros de inhibición de 39 mm (*S. aureus*) y 32 mm (*B. subtilis*) a 3 mg/ml, comparables a los obtenidos por el patrón de sulfato de estreptomina a 40 mcg/ml. En estudios previos *A. conyzoides* ha mostrado actividad insecticida (9,10) y antibacteriana (11) y los witanólidos de *P. peruviana* actividad antitumor y antibacteriana. (12)

La actividad sobre *Pseudomonas aeruginosa* es muy importante por su elevada patogenicidad y porque con frecuencia es resistente a los antibióticos, como lo demostró en el presente estudio al ser necesario utilizar concentraciones del patrón de sulfato de estreptomina 10 veces mayores frente a esta bacteria que contra los demás microorganismos del ensayo. *Digitallis purpurea* inhibió a *P. aeruginosa* a 6 mg/ml; *Piper aduncum* y *Aragoa abietina* inhibieron a 3 mg/ml a esta bacteria, además de pre-

sentar actividad frente a las dos bacterias Gram positivas. Se ha informado sobre actividad antifúngica en *D. purpurea* (13) y antibacteriana en *P. aduncum* (14).

Cavendishia bracteata se destaca por su actividad frente a *S. typhi* (bacilo Gram negativo causante de muchas infecciones), *S. aureus* y *B. subtilis* a una concentración de 3 mg/ml. Luteyn y col. aislaron flavonoides y otros fenoles simples con actividad antimicrobiana de esta especie (15).

Chromolaena odorata fue la única especie que presentó actividad antifúngica, la cual inhibió a *Mucor* sp. a 6 mcg/ml; además esta especie inhibió a *S. aureus* y a *B. subtilis* a 3 mg/ml. Esta especie se le conoce como sanalotodo en medicina tradicional y se utiliza en países como Venezuela para el tratamiento de infecciones y su aceite esencial mostró acción insecticida (16).

Si se toma en cuenta los estudios fitoquímicos preliminares y los ensayos de letalidad sobre larvas de *Ar-*

Tabla 1. Resultados de la actividad antibacteriana y antifúngica de especies de plantas superiores.

ESPECIE (Familia)	ORGANISMOS SENSIBLES Concentración en mg/ml (diámetro inhib. en mm)
<i>Hypoestes sanguinolenta</i> Hook (Aca)	<i>P. aeruginosa</i> 12(17); <i>S. aureus</i> 3(13); <i>B. subtilis</i> 3(15)
<i>Conium maculatum</i> L. (Api)	
<i>Ageratum conyzoides</i> L. (Ast)	<i>S. aureus</i> 3(13); <i>B. subtilis</i> 3(13)
<i>Austroeupatorium inulaefolium</i> (H.B.K.) King & Robinson (Ast)	<i>S. aureus</i> 3(13); <i>B. subtilis</i> 3(17)
<i>Bidens pilosa</i> L. (Ast)	<i>B. subtilis</i> 3(15)
<i>Chromolaena odorata</i> (HBK) K. & R. (Ast)	<i>S. aureus</i> 3(17); <i>B. subtilis</i> 3(21); <i>Mucor</i> 6(15)
<i>Clibadium villosum</i> Benth. (Ast)	
<i>Critoniella acuminata</i> (HBK) K. & R. (Ast)	
<i>Diplostegium phyllicoides</i> (HBK) Weed (Ast)	<i>B. subtilis</i> 3(13)
<i>Heliopsis oppositifolia</i> (Lam.) Díaz (Ast)	<i>S. aureus</i> 3(13); <i>B. subtilis</i> 3(15)
<i>Pentacalia vaccinioides</i> Cuatr. (Ast)	
<i>Tagetes caracasana</i> Humb. ex Willd. (Ast)	
<i>Cavendishia bracteata</i> (R.L.P.) Hook (Eric)	<i>S. typhi</i> 3(15); <i>S. aureus</i> 3(19); <i>B. subtilis</i> 3(21)
<i>Vaccinium floribundum</i> H.B.K. (Eric)	
<i>Hyptis mutabilis</i> (Rich.) Brig. (Lam)	<i>S. aureus</i> 6(15); <i>B. subtilis</i> 3(15)
<i>Piper aduncum</i> L. (Pip)	<i>P. aeruginosa</i> 3(15); <i>S. aureus</i> 3(13); <i>B. subtilis</i> 3(15)
<i>Piper bogotensis</i> C.D.C (Pip)	<i>S. aureus</i> 3(39); <i>B. subtilis</i> 3(33)
<i>Monnina salicifolia</i> R. & P. (Polgl)	
<i>Polygonum punctatum</i> Eill. (Polgn)	<i>P. aeruginosa</i> 12(15); <i>S. aureus</i> 6(13); <i>B. subtilis</i> 3(17)
<i>Arcytophyllum nitidum</i> (H.B.K.) Schd. (Rub)	
<i>Arcytophyllum</i> sp. (Rub)	
<i>Hamelia patens</i> Jacq. (Rub)	<i>S. aureus</i> 3(17); <i>B. subtilis</i> 3(15)
<i>Aragoa abietina</i> H.B.K. (Scro)	<i>P. aeruginosa</i> 3(13); <i>S. aureus</i> 3(13); <i>B. subtilis</i> 6(13)
<i>Calceolaria chelidonioides</i> H.B.K. (Scro)	<i>B. subtilis</i> 3(19)
<i>Digitalis purpurea</i> L. (Scro)	<i>P. aeruginosa</i> 6(15); <i>B. subtilis</i> 6(13)
<i>Physalis peruviana</i> L. (Sol)	<i>S. aureus</i> 6(13); <i>B. subtilis</i> 3(15)
<i>Solanum nigrum</i> L. (Sol)	<i>S. aureus</i> 3(13); <i>B. subtilis</i> 3(15)
<i>Solanum oblongifolium</i> R.E.P. (Sol)	<i>B. subtilis</i> 3(13)
<i>Tropeolum majus</i> L. (Trop)	

Aca= Acanthaceae; Api= Apiaceae; Ast=Asteraceae Eric=Ericaceae; Lam=Lamiaceae; Pip.=Piperaceae
Polgl=Polygalaceae; Polgn=Polygonaceae; Rub=Rubiaceae; Scro=Scrofulariaceae; Sol=Solanaceae
Trop=Tropaeolaceae; 3(17)= Diámetro de inhibición de 17 mm a una concentración de 3 mg/ml

temia salina practicados sobre estas mismas especies (17), se observa que no existe una correlación entre la actividad antimicrobiana y letalidad sobre *A. salina* y tampoco se aprecia una relación clara entre la presencia de metabolitos secundarios y actividad antimicrobiana.

Las especies citadas antes presentaron una actividad antimicrobiana tan destacada que amerita profundizar en el aislamiento e identificación de las sustancias responsables de dicha bioactividad. Sin embargo, en la Tabla 1 se pueden apreciar otras especies con resultados que pueden justificar la iniciación de estudios orientados a precisar sobre dichas actividades.

Agradecimientos

Se agradece al Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional y a COLCIENCIAS por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo por medio del proyecto "Búsqueda de principios bioactivos en plantas superiores colombianas" que dirige el doctor Roberto Pinzón.

BIBLIOGRAFÍA

1. L. A. Ríos y M. C. Villar. *J. Ethnopharmacol.* **23**, 127 (1988).
2. J.R. Mantilla y A. Sanabria. *Rev. Col. Cien. Quím. Farm.* **4(2)** 25-33 (1985)
3. A. Sanabria y J.R. Mantilla. *Rev. Col. Cien. Quím. Farm.* N° **15**, 17-22 (1986).
4. A. Sanabria-Galindo, G.R. Sarmiento y M.A. Rodríguez. *Rev. Col. Cien. Quím. Farm.* N° **23**, 58-63 (1995).
5. M. Quetin y W. Russel. "Bacteriología y Micología médica", Interamericana, Mc Graw Hill, 1991, pp. 22, 301.
6. W. B. Hugo y A. D. Russel. "Pharmaceutical Microbiology", Blackwell Scientific Publications, 1977, p.103.
7. M. H. Caicedo y C. Y. Ruiz. "Aislamiento y caracterización de las fracciones con actividad antimicrobiana de *Drimys granadensis*. Tesis, Universidad Nacional de Colombia, 1989.
8. V. Lorian. "Antibiotics in Laboratory Medicine", William & Wilkins, 1981, p. 27.
9. A. G. González, Z.E. Aguilar, T.A. Grillo, J.G. Luis, A. Rivera y J. Calle. *Phytochem.* **30**, 1269 (1991).
10. T. Horie, H. Tominaga y Y. Kawamura. *Phytochem.* **32**, 1076 (1993).
11. G.P. Sharma, N.K. Jain y B.D. Gar. *Sci. Cult.* **45**, 327 (1979).
12. A.Y. Zaki, T.S.M. El-Alfy, H.M.A. El-Gohary. *Egypt. J. Pharm. Sci.* **28**, 235 (1987).
13. P. Kintia, G. Lazurievsky y N. Balashova. *Chem. Abst.* **83**, 05235 (1981).
14. M. Nair y B. Burke. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1093 (1990).
15. J. Luteyn, J. Harborne y C. Williams. *Brittonia*, **32**, 1 (1980).
16. X.D. Nguyen, K.B. Le y P.A. Leclerq. *Journal of the Essential Oil Research.* **4**, 309 (1992).
17. A. Sanabria-Galindo, S. López y R. Gualdrón. *Rev. Col. Cien. Quím. Farm.* N° **26**, 15-19 (1997).