

ESTUDIO FITOQUÍMICO PRELIMINAR Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ALGUNAS PLANTAS SUPERIORES COLOMBIANAS

CARMEN LILIA GRACIA DE GARCIA. *
ELSY CORREA A. *
NELSY ROJAS C. *

RESUMEN

Se hizo un análisis fitoquímico preliminar de 16 especies de plantas superiores pertenecientes a 12 familias. Se hallaron los siguientes metabolitos: alcaloides en 6 plantas, flavonoides en 15, antraquinonas en 2, taninos en 12, lactonas sesquiterpénicas en 4, cumarinas en 2. Todas presentaron esteroides y o triterpenoides y ninguna saponinas ni heterósidos cardiotónicos.

La actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos fué evaluada frente a 7 microorganismos Gram positivos, 9 microorganismos Gram negativos, 2 levaduras. La actividad antifúngica se evaluó frente a dos hongos: *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp.

Siete de las plantas presentaron buena actividad, pero se destacan por su amplio espectro de actividad: *Drymis granadensis* y *Monnina* cf. *mollis*.

SUMMARY

A preliminar phytochemical analysis was made of 16 higher plants, belonging to 12 families. The following metabolites were found: alkaloids in 6 plants, flavonoids in 15, anthraquinones in 2, tannins in 12, sesquiterpene lactones in 4, coumarins in 2. In all the studied plants steroids and or triterpenoids were found, but no saponins or cardioactive glycosides.

The antimicrobial activity of the ethanolic extracts of the plants was evaluated against 7 Gram-positive microorganisms, 9 Gram-negative microorganisms, 2 yeast. The antifungal activity was evaluated against two fungi: *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. Seven plants showed a good activity, but *Drymis granadensis* and *Monnina* cf. *mollis* presented a broad-spectrum of activity.

INTRODUCCION

Se han hecho muchas investigaciones con el objeto de demostrar actividad antimicrobiana en extractos de plantas; por ejemplo los trabajos de Kim y col (1) quienes encontraron que el extracto de *Scutellaria baicalensis* Georg. fue activo frente a varios microorganismos gram positivos y gram negativos. Rakhimova y col.(2) establecieron que especies de *Andrachne* tenían efecto antimicrobiano frente a 3 bacterias gram negativas y 2 gram positivas. Jain S. R. y col (3, 4), evaluaron algunos aceites esenciales volátiles de plantas nativas de la India de la familia de las *compositae* y demostraron actividad antibacteriana. Kohlmuenzer y col (5), estudiaron la *Emilia* *flaninea* y reportaron actividad antimicótica. D. J. Bhakumiy col.(6) encontraron que en extractos preparados de 519 muestras de plantas de varias familias, 14 presentaron actividad antitumoral. O. mazaru (7), demostró actividad antitumoral "in vivo" de un extracto de *Jacaranda* caucana. Hufford C. y col (8) encontraron actividad antibacteriana y antifúngica en extractos de plantas de la familia *Magnoliaceae*.

Igualmente hay estudios sobre la relación entre la actividad biológica y la estructura química de los compuestos responsables de la actividad. Ejemplo, en los trabajos de Towers y Morris donde se destaca la actividad de los flavonoides (9, 10). Jurd y col., cambel y Link (11, 12), estudiaron los efectos inhibitorios de las cumarinas sobre el crecimiento de gran variedad de bacterias, hongos y levaduras. Lactonas sesquiterpénicas: Lee K. H. y col (13), evaluaron la actividad antimicrobiana de 36 de estos compuestos. La estructura responsable era el anillo ciclopentanona a - b insaturado. De

* Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A.A. 14490. Santafé de Bogotá.

las plantas en estudio sólo Calle y col. (14) aislaron de *Drymis granadensis* variedad *grandiflora* el sesquiterpeno: poligodial, pero su actividad biológica no ha sido estudiada.

PARTE EXPERIMENTAL.

1. Material Vegetal:

Las plantas fueron recolectadas en diferentes regiones del Departamento de Cundinamarca, los ejemplares fueron clasificados taxonómicamente y registrados en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional.

El material (hojas, flores y tallos tiernos) fué secado el mismo día de su colección en estufa con aire circulante, a 50 °C. durante 24 horas y luego pulverizado hasta un tamaño de partícula adecuado para la extracción.

2. Analisis Fitoquímico preliminar.

Con 50 g. de material vegetal pulverizado se efectuó una marcha fitoquímica preliminar de acuerdo a la técnica establecida en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional (15).

3. Determinación de la Actividad antimicrobiana.

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS.

Se maceraron durante la noche 10 g. de material vegetal seco y molido en 120 ml. de etanol del 95%, luego se agitó sobre un baño de maría a una temperatura de 60°C, a 200 rpm. , durante 10 minutos, se filtró en frío al vacío, se lavó el residuo con 30 ml. de etanol y se concentró a presión reducida a una temperatura no mayor de 40°C, el residuo se llevó a un volumen de 10 ml. con etanol del 95%. se llamó Extracto Concentrado (C). A partir de este extracto se preparó una dilución 1: 10. Y se obtuvo la Dilución (D). Estas concentraciones (C y D) se utilizaron para evaluar la actividad contra los diferentes microorganismos.

Microorganismos de Ensayo.

Se tomaron especies representativas de Bacterias Gram positivas, Gram negativas, Levaduras y Hongos filamentosos.

Preparación del Inóculo Bacteriano.

Los microorganismos de ensayo se mantuvieron en Agar Soya Trypticase, en cuña a 4 °C. para la prueba fueron activados sembrándolos en 2.5 ml de Caldo Nutritivo estéril e incubándolos a 37°C durante 24 horas. Los microorganismos

Gram negativos se sembraron a partir del inóculo activado y se incubaron a 37 °C. por 5 horas. antes de efectuar el ensayo.

Preparación del Inóculo Fúngico.

Los hongos filamentosos desarrollados en cajas de agar Sabouraud -glucosa al 4%, se conservaron en refrigeración. Para la prueba se activaron sembrándolos en cajas de agar Sabouraud-glucosa al 4% y se incubaron por 48 a 72 horas a 22 °C.

Ensayo microbiológico.

La determinación de la Actividad Antibacteriana fué evaluada por el método de dilución en agar e inoculación múltiple en superficie (16), empleando como medio Agar Peptona Caseina. En el ensayo se utilizaron los extractos etanólicos C y D, blanco de solvente: etanol del 95%, control de referencia positivo: Sulfato de Estreptomina (40 mcg/ml) y como control de crecimiento negativo: caja con medio de cultivo estéril. Todo se realizó por duplicado, para cada ensayo se tomaron 0.4 ml del producto a ensayar y se diluyeron en 14 ml de agar.

Determinación de la actividad antifúngica.

Se evaluó por el método de difusión en gel perforación en placa (17). Del cultivo activado se tomaron 2 rodajas de 9 mm. de diámetro, se suspendieron en 10 ml de caldo nutritivo estéril, se homogenizó y de esta suspensión se inocularon 0.5 ml. en 25 ml de Agar-sabouraud-glucosa al 4% mantenido a 45 °C y se vertieron en cajas de petri de 9 cm de diámetro. Una vez solidificado se hicieron 5 perforaciones de 9 mm de diámetro. En la perforación del centro se colocaron 0.2 ml de etanol del 95% (blanco de solvente), en el duplicado se aplicaron 0.2 ml de la sustancia de referencia: solución de Anfotericina, en concentración de 250 mcg/ml en etanol de 95%. En las cuatro perforaciones restantes se colocaron 0.2 ml. de los extractos etanólicos: C y D, Se usaron también placas inoculadas como control de crecimiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

Analisis Fitoquímico preliminar: la presencia de los diferentes metabolitos se resume en la Tabla No.1.

TABLA Nº 1. RESULTADOS DEL ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR EFECTUADO A 16 MUESTRAS DE PLANTAS

Nº	PLANTA	Alc	Fla	Ant	Sap	Tan	Est-Tri	LST	Cu	Car
55	<i>Senecio americanus</i> (Compositae)	-	++	-	-	+	+	-	-	-
56	<i>Buettneria mollis</i> H.B.K (Sterculiaceae)	-	++	++	-	+	++	-	-	-
	<i>Acnistus arborescens</i> (L)Schet (Solanaceae)	+++	+	-	-	+	+	-	-	-
58	<i>Ageratum conyzoides</i> (Compositae)	++	++	-	-	++	+++	+	+	-
59	<i>Drymis granadensis</i> L.f. (Winteraceae)	-	+++	-	-	+++	+	-	-	-
74	<i>Solanum ovalifolium</i> H.B.K. (Solanaceae)	+++	+	-	-	+	+	+	+	-
78	<i>Monochaetum myrtoideum</i> (Melastomataceae)	-	+	-	-	-	++	-	-	-
79	<i>Polygonum</i> sp. (Polygonaceae)	-	+	-	-	-	+	-	-	-
83	<i>Cleome anomala</i> H.B.K. (Capparidaceae)	++	+	-	-	+	++	+	-	-
86	<i>Monnina</i> cf. <i>mollis</i> Pl& Lind (Polygalaceae)	++	+++	-	-	++	++	-	-	-
87	<i>Salvia scutellaroides</i> H.B.K. (Labiatae)	-	+	-	-	-	++	-	-	-
92	<i>Kolheria trianae</i> (Regel)Hanst. (Geuneraceae)	-	-	-	-	+	++	-	-	-
99	<i>Miconia caesia</i> . Cogn.e Gleas (Melastomataceae)	-	++	++	-	++	++	-	-	-
102	<i>Erato vulcanica</i> (Klatt)H.Robb (Compositae)	-	+	-	-	+	+++	-	-	-
104	<i>Verbena litoralis</i> H.B.K. (Verbenaceae)	-	+	-	-	+	+	-	-	-
109	<i>Senna bicapsularis</i> (L)Roxburg(Leguminosae)	++	+	-	-	-	++	+	-	-

El Número corresponde al número de colección del Dr. A. Sanabria G.

Alcaloides (Alc), Flavonoides (Fla), Antraquinonas (Ant), Saponinas(Sap), Taninos (Tan), Esteroides Y o triterpenoides (Est-Tri), Lactonas sesquiterpénicas (LST), Cumarinas (Cu), Heterósidos cardiotónicos (Car).

+++ Presente en abundancia

++ presente en mediana cantidad

+ presente en poca cantidad

- resultado negativo.

En cuanto a la **actividad antibacteriana**, este método es adecuado para ensayar extractos de plantas. Los resultados se aprecian en la Tablas No. 2.

TABLA No. 2. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS EVALUADOS POR EL METODO DE DILUCION EN AGAR

PLANTA MICROORGANISMO	S.R	55		56		57		58		59				74		78	
		C	D	C	D	C	D	C	D	C	D	D1	D2	C	D	C	D
Bacillus subtilis	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
Bacillus anthracis	+	+	<u>+</u>	+	-	+	+	-	-	+	+	<u>+</u>	-	-	-	+	-
Bacillus cereus	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	<u>±</u>	-
Candida albicans	-	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-
Saccharomyces cerevisiae	+	<u>+</u>	-	-	-	+	-	-	-	<u>+</u>	-	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus aureus	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	<u>+</u>
Staphylococcus epidermidis	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Streptococcus faecalis	-	<u>±</u>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	<u>±</u>	-	+	-
Enterobacter aerogenes	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Escherichia coli	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>+</u>	-	-	-	-	-	<u>±</u>	-
Klebsiella pneumoniae	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>+</u>	<u>±</u>	<u>+</u>	<u>+</u>	+	-	-	-
Morganella morganii	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>+</u>	<u>±</u>	-	-	-	-	-	-
Pseudomonas aeruginosa	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Salmonella typhi	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-	-
Salmonella panama	+	-	-	-	-	-	-	-	-	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-	-
Shigella sonnei	+	-	-	+	-	+	<u>+</u>	+	-	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-	-
Serratia marcescens	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Sarcina lutea	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	<u>+</u>	<u>+</u>	-	-	+	-

CONVENCIONES:

- Crecimiento similar a controles

+ Reducción de la población.

+

 Ausencia de crecimiento

C : Extracto concentrado

D : Dilución 1:10 del Extr. concentrado

D1 : Dilución 1:100 del Extr. Concentrado.

D2 : Dilución 1:1000 del Extr. concentrado..

S.R.: Estreptomicina: 40 mcg/ml.

Los números de las plantas están relacionados en la Tabla N° 1

TABLA No. 2. CONTINUACION

PLANTA MICROORGANISMO	S.R.	79 C D	83 C D	86 C D	87 C D	92 C D	99 C D	102 C D	104 C D	109 C D
Bacillus subtilis	+	- -	- -	+ -	- -	- -	+ -	<u>+</u> -	- -	- -
Bacillus anthracis	+	<u>+</u> -	- -	<u>+</u> -	- -	- -	+ -	+ -	+ -	- -
Bacillus cereus	+	- -	- -	<u>+</u> -	<u>± ±</u>	- -	+ -	+ -	- -	- -
Candida albicans	-	+ +	- -	- -	+ +	+ +	- -	- -	- -	- -
Saccharomyces cerevisiae	+	+ -	- -	+ -	- -	+ -	- -	- -	- -	- -
Staphylococcus aureus	+	<u>± ±</u>	- -	+ <u>+</u>	- -	+ <u>+</u>	- -	- -	- -	- -
Staphylococcus epidermidis	-	- -	- -	+ -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
Streptococcus faecalis	-	<u>+</u> -	- -	- <u>±</u>	- -	<u>± ±</u>	<u>±</u> -	- -	- -	- -
Enterobacter aerogenes	+	- -	- -	+ -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
Escherichia coli	+	<u>±</u> -	- -	+ -	+ +	+ +	- -	- -	- -	- -
Klebsiella pneumoniae	+	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
Morganella morganii	+	- -	- -	+ -	- -	<u>+</u> -	- -	- -	- -	- -
Pseudomonas aeruginosa	+	- -	- -	+ -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
Salmonella typhi	+	+ +	- -	+ +	- -	+ -	- -	- -	- -	- -
Salmonella panama	+	- -	- -	- -	- -	+ -	- -	- -	- -	- -
Shigella sonnei	+	- -	- -	+ -	- -	- -	+ -	<u>±</u> -	- -	- -
Serratia marcescens	+	- -	- -	+ -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
Sarcina lutea	+	- -	- -	+ -	<u>± ±</u>	<u>+</u> <u>+</u>	- -	- -	- -	- -

CONVENCIONES:

- Crecimiento similar a controles

+ Reducción de la población.

+ Ausencia de crecimiento

C : Extracto concentrado

D : Dilución 1/10 del Extr. concentrado

S.R. Streptomycin: 40 mcg/m1.

Los números de las plantas están relacionados en la Tabla N° 1

Se consideraron activas si inhibieron totalmente el crecimiento o si hubo reducción notable del crecimiento. De acuerdo a esto se observa que las plantas que presentaron buena actividad fueron: *Acnistus arborescens*, *Drymis granadensis*, *Solanum ovalifolium*, *Monochaetum myrtoideum*, *Polygonum sp.*, *Monnina cf. mollis*, y *Kohleria trianae*. De las plantas ensayadas la mayoría fueron activas contra bacterias Gram positivas: ejemplo contra *Bacillus subtilis*: 8 (50%), *Bacillus anthracis* 8 (50%), *Bacillus cereus*: 6 (37%), *Staphylococcus aureus*: 5 (31%), *Sarcina lutea* 6 (37%) *Staphylococcus epidermidis*: 4 (25%). Contra bacterias Gram negativas: *Escherichia coli*: 6 (37%), *Enterobacter aerogenes* 2 *Morganella morganii*: 2, *Pseudomonas aeruginosa*: 2,

Salmonella typhi: 4, *Shigella sonnei*: 7. Se destaca que 7 plantas presentaron actividad contra la levadura *Candida albicans*.

La actividad antifúngica se evaluó por el método de difusión en gel, contra los hongos: *Aspergillus niger* y *Penicillium sp.*; en la Tabla N° 3, se anotan los halos de inhibición en mm. (se incluye el diámetro de perforación). Se considera halo nítido (N), a aquella zona donde no hubo crecimiento y halo de reducción: (R), donde se observó marcada disminución de la población. Se puede observar de acuerdo a la tabla; que 8 de las plantas fueron activas contra los 2 hongos.

TABLA No. 3. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LAS PLANTAS ANALIZADAS

Nº.	PLANTA	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium sp.</i>	
		C	D	C	D
55	<i>Senecio americanus</i>	21 R	13 R	21 R	13 R
56	<i>Buettneria mollis</i> H.B.K.	-	-	-	-
57	<i>Acnistus arborescens</i>	19 R	15 R	19 R	15 R
58	<i>Ageratum conyzoides</i>	-	-	-	-
59	<i>Drymis granadensis</i>	39 N	29 N	49 N	29 N
74	<i>Solanum ovalifolium</i>	19 R	21 R	17 R	13 R
78	<i>Monochaetum myrtoideum</i>	33 R	21 R	29 R	19 R
79	<i>Polygonum sp.</i>	-	-	-	-
83	<i>Cleome anomala</i> H.B.K	-	-	-	-
86	<i>Monnina cf. mollis</i> .	29 R	19 R	29 R	19 R
87	<i>Salvia scutellaroides</i>	-	-	-	-
92	<i>Kohleria trianae</i>	-	-	-	-
99	<i>Miconia caesia</i> .	-	-	-	-
102	<i>Erato vulcanica</i> (Klatt)	-	-	-	-
104	<i>Verbena litoralis</i> H.B.K.	25 R	24 R	24 R	12 R
109	<i>Senna bicapsularis</i> (L).	19 R	15 R	17 R	13 R

C : Extracto concentrado

D : Dilución 1 : 10 del Extracto concentrado.

R : Halo de Reducción.

N : Halo Nítido. (Reportado en mm.).

C: Extracto concentrado

D: Dilución 1:10 del Extracto concentrado.

R: Halo de Reducción.

N: Halo Nítido. (Reportado en mm.).

El extracto concentrado (C), de la planta *Drymis granadensis* presentó una amplia actividad contra la mayoría de los microorganismos empleados para la actividad antibacteriana, por esto se analizó en una forma más específica tomando el extracto C, y otras tres diluciones del original: D, D1 y D2., los resultados se aprecian en la misma Tabla N° 3.

En cuanto a la actividad antifúngica, fué la única que inhibió el crecimiento de los hongos presentando halos nítidos; por esto las Concentraciones C, D (1:10), D1 (1:100) y D2 (1:1000 de C), fueron provadas contra los mismos hongos, la levadura *Candida albicans* y además, *Alternarium* sp, *Fusarium* sp, *Rhizopus* sp. y *Mucor* sp. de naturaleza fitopatogénica. Se observó que hasta la dilución D2 presento inhibición de crecimiento.

En general las plantas que presentan actividad antifúngica tienen en común entre sus metabolitos secundarios: Flavonoides, esteroides y o triterpenoides.

En conclusión de las 16 plantas estudiadas las que presentaron un espectro de actividad amplio fueron: *Drymis granadensis* y *Monnina* cf. *mollis*, que son activas frente a microorganismos Gram positivos, Gram negativos, Levaduras y Hongos.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen a Colciencias y a la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo financiero a través del programa de investigación: "Búsqueda de Principios Bioactivos en plantas superiores Colombianas".

BIBLIOGRAFIA.

1. J. KIM y M. K. JYUNG. *Biological Abstract* **54**, 24318 (1972)
2. I. V. RAKHIMOVA, F. N. ZUEAROV y Z. N. NAZIROV. *Biological Abstract*. **59**, 64956 (1975)
3. A. KAR y R. JAIN. *Qual Plant. Mat. Veg.* **20**, 231 (1971).
4. S. R. JAIN y col. *Planta Med.* **26**, 196 (1974).
5. KOHLMUENZER y col. *Plo. J. Pharmacol. Pharm.* **25**, 293 (1973).
6. D. S. BHAKUMI, M. BITTNER y col., *Lloydia* **39**, 181 (1976).
7. O. MAZARU, G. A. CORDELL y N. R. FARNSWORTH. *Lloydia* **40**, 157 (1977).
8. C. D. HUFFORD, A. S. SHARMA y B. O. OGUNTIMEIN. *J. Pharm. Sci.* **69**, 1180 (1980)
9. G. N. N. TOWERS y C. K. WAT. *Rev Latinoam. Quim.* **9**, 165 (1978).
10. K. MORRIS y E. BAUERSCHMIT. *Phytochemistry*, **10**, 664 (1971).
11. L. JURD, A. D. KING y K. MIHARA, *Phytochemistry*, **10**, 2965. (1971).
12. C. E. CASTRILLÓN y F. E. FARFÁN, Aislamiento de Sustancias con Actividad Antimicrobiana en *Conyza floribunda*. H.B.K. Tesis. Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. (1981).
13. K. H. LEE, T. IBUKA, R. Y. WU., y T. A. GEISSMAN. *Phytochemistry*. **16**, 1171 (1977).
14. J. Calle, M. T. Reguero., A. Rivera. *Rev. Col. Quim.* **14**, 27 (1985).
15. A. SANABRIA. Análisis Fitoquímico Preliminar. Metodología y su Aplicación en la Evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Universidad Nacional, Departamento de Farmacia, Bogotá. 1983.
16. J. R. MANTILLA y A. SANABRIA. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas.* **4**, 25 1985.
17. A. SANABRIA y J. R. MANTILLA. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas.* N° 15, 17 (1986).