

ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit (ULTIMORRIAL)

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit (ULTIMORRIAL)

Rita Luz Márquez-Vizcaíno¹, Angelina Mercado-Pérez¹, Claudia Vargas-Montero¹. Catalino de La Rosa-Torres²

Resumen

Los extractos etanólico y la fracción de acetato de etilo de las hojas de *Pedilanthus tithymaloides* L Poit (Ultimorrial) fueron activas contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*; además en un *screening* fitoquímico se detectaron terpenos, esteroides, lactonas, flavonoides, antocianinas y alcaloides por un *screening* fitoquímico.

Palabras clave: antibacterial, *Pedilanthus tithymaloides*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomona aeruginosa*.

Abstract

Ethanol extract and ethyl acetate fraction from leaves of *Pedilanthus tithymaloides* L Poit (Ultimorrial) were active against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomona aeruginosa*; in addition, terpenes, sterols, lactones, flavonoids, anthocyanins and alkaloids were detected through a phytochemical screening.

Key words: antibacterial, *Pedilanthus tithymaloides*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomona aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

Desde hace años el empleo de las plantas medicinales y de productos derivados de las mismas, esta aumentando de manera importante, la OMS estima que el 80% de los más de 4.000 millones de habitantes de la tierra confían en las medicinas tradicionales para sus principales necesidades. La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como una fuente de agentes antiinfectivos permitiendo de esta manera un avance del uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica (López, 1997).

Muchos países se han involucrado en la obtención de medicamentos a partir de las plantas, la ONU ha estimado que el ochenta por ciento de los habitantes de los países en vía de desarrollo dependen de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de atención primaria de la salud (Mongeli y Pomilio, 2002); los países tercermundistas poseen los primeros lugares en estos programas de estudio para garantizar la obtención de preparados asequibles a toda la población. En países como Cuba se ha establecido un plan para mejorar la salud en la población que encierra la erradicación y prevención de gran cantidad de enfermedades mediante medicamentos de bajo

¹ Grupo de Investigación Fitoquímica (GIFUS), Departamento de Biología. Facultad de Educación y Ciencias. Universidad de Sucre. Colombia. Correo electrónico: <fitorita@yahoo.es>.

² Grupo de Investigación Fitoquímica (GIF), Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad del Atlántico. Colombia. Correo electrónico: <cdelarosa@uniatlántico.edu.co>.

costo que estén disponibles, convirtiéndose las plantas medicinales en la mejor alternativa (López, 1997; Martínez et al., 1997).

La familia Euphorbiaceae posee una amplia diversidad botánica y química por lo que abarca una gran gama de aplicaciones como alimenticias, venenosas, medicinales, industriales, entre otras. Los principales metabolitos secundarios detectados han sido los triterpenos, seguidos de flavonoides y alcaloides (Payo et al., 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y tratamiento del material vegetal. La recolección del material vegetal se realizó en el municipio de Corozal (Sucre), Colombia y fueron determinadas por determinada por el Edgar L. Linares como *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit; un ejemplar se encuentran en el Herbario Nacional de Colombia con el número COL 480935.

Extracción por percolación. Hojas frescas (700 g) fueron finamente picadas y depositadas en un erlenmeyer de 2000 ml al cual se le adicionó etanol al 98% a temperatura ambiente cubriendo la totalidad del material y haciendo pasar el solvente repetidas veces por el material, seguido de una filtración durante 10 días. El extracto etanólico obtenido fue concentrado en un rota evaporador a presión reducida y secado al vacío sin calor.

Identificación cualitativa de metabolitos secundarios. Se tomaron 30 ml de extracto etanólico total sin concentrar, a 10 ml de este extracto se le adicionó un volumen igual de una solución de acetato de plomo $Pb(C_2H_3O_2)_2$ al 4% con ácido acético al 0,5% para el reconocimiento de flavonoides y leucoantocianinas; los 20 ml de extracto restante se fraccionó con diclorometano y agua obteniéndose una fase orgánica y una acuosa para el reconocimiento de saponinas, terpenos, esteroides, quinonas, lactonas, taninos y antocianinas.

Finalmente, a 20 g de hoja fresca picada se le adicionó un volumen de ácido clorhídrico (HCl) al 2% hasta cubrir el material se calentó por 5 minutos para la identificación de alcaloides. El extracto etanólico concentrado se sometió a fraccionamiento líquido-líquido con diclorometano (CH_2Cl_2) y posteriormente con acetato de etilo en un embudo de separación, adicionando 20 ml de extracto con 10 ml del solvente, este procedimiento se repitió varias veces hasta el agotamiento del extracto monitoreado en cromatografía en capa delgada y revelando con vainillina/ H_2SO_4 .

Evaluación de actividad antibacteriana (García et al., 2002). Se determinó la actividad antibacteriana del extracto etanólico total seco y fracciones diclorometano y acetato de etilo utilizando las cepas de microorganismo Gram positivos *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y Gram negativos *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, mediante el método de difusión en agar.

Se realizó primeramente una prueba de sensibilidad colocando las bacterias en contacto con el extracto y fracciones a evaluar determinándose cual de las bacterias serían viables ante el ensayo.

Se preparó el inoculó de cada bacteria ajustada a 0,5 de Macfarland equivalente a 1×10^8 UFC/ml. En el centro de dos cajas de petri con agar Muller-Hinton solidificado se realizó una perforación con un sacabocado (6 mm de diámetro) y con ayuda de una pipeta se adiciono una gota de agar para sellar el fondo del pozo; se sembraron dos bacterias Gram positivas y Gram negativas en su respectiva caja y luego se adiciono en el pozo una concentración de 50 mg/ml de extracto etanólico. De igual forma se ensayo para las fracciones diclorometano, acetato de etilo; se usó cloramfenicol como control positivo y dimetilsulfoxido como control negativo. Las placas se incubaron por 24 horas a 37 °C y se observo en cual de ellas había inhibición del crecimiento

Medio de cultivo. Se usó el agar Muller-Hinton, teniendo en cuenta que en este medio crecen bien

la mayor parte de las bacterias patógenas; se adicionó 20 ml por placa, luego de solidificado se realizaron perforaciones (cinco por caja) con ayuda de un sacabocado.

Controles. Como control positivo se usó el cloramfenicol (10, 25, 30, 40 y 50 mg/ml) y como control negativo el dimetilsulfóxido.

Preparación del inóculo. A partir de una placa de cultivo en crecimiento activo con ayuda de un asa bacteriológica se tomaron cinco colonias y se inocularon en 5 ml de caldo nutritivo, ajustando el inóculo a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de Macfarland, incubándose a 35 °C durante 8 horas.

Inoculación de las cajas. Transcurrido ocho horas, se sumergió un hisopo de algodón estéril en la suspensión de bacterias estandarizada, eliminando el exceso de caldo presionando y rotando el hisopo firmemente contra el interior del tubo por encima del nivel del líquido. Para la inoculación de las placas se deslizó el hisopo por la superficie del agar tres veces rotando la placa y pasándolo por último por la periferia del agar para conseguir una siembra uniforme.

Se dejaron secar las cajas durante 5 minutos, se adicionó en los pozos los extractos en las concentraciones a ensayar de 10, 25, 30 y 40 mg/ml así como los controles positivo y negativo. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 horas y después se realizaron las lecturas en milímetros del diámetro del halo de inhibición del crecimiento de cada una de las cepas bacterianas; se realizaron dos mediciones desde la línea que define el halo de inhibición de un lado al otro incluyéndose el tamaño de la inhibición y se tomo como resultado el valor promedio de estas mediciones para calcular el porcentaje de inhibición relativo (Martínez *et al.*, 1997), de la siguiente manera:

$$\% \text{ efecto de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición del extracto}}{\text{Diámetro del halo de inhibición control positivo}} \times 100$$

Análisis estadístico. Los resultados del ensayo de actividad antibacteriana fueron evaluados mediante una prueba descriptiva por gráfico y análisis de varianza. El análisis estadístico fue aplicado utilizando las cuatro repeticiones que se efectuaron por triplicado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos de caracterización cualitativa realizados al extracto etanólico de las hojas frescas de *P. tithymaloides* indican la presencia de metabolitos secundarios tipo alcaloides, flavonoides, antocianinas, terpenos y lactonas, los cuales se encuentran reportados dentro de la fitoquímica de la familia *Euphorbiaceae* (Trease y Evans, 1982).

Evaluación de la actividad antibacteriana. Los resultados de la prueba de sensibilidad bacteriana indican que bacterias *S. aureus*, *B. cereus* y *P. aeruginosa* presentan inhibición de crecimiento en el extracto EtOH (figura 1) y la fracción AcOEt, siendo estos los microorganismos y extractos seleccionados para el ensayo de difusión en agar.

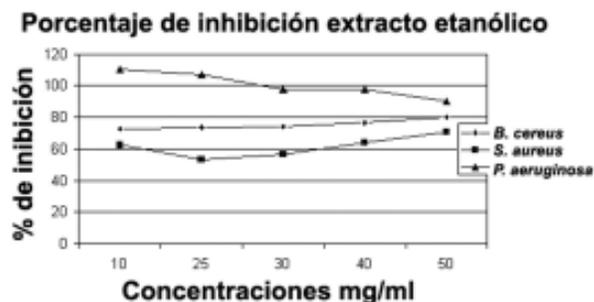


Figura 1. Porcentaje de inhibición extracto etanólico

Las tablas 1 y 2 muestran los diámetros del halo de inhibición de las bacterias en la prueba de difusión en agar con el extracto EtOH, fracción AcOEt y los % de inhibición relativos mayores al 50% en el extracto y fracción ensayada (110, 25 y 143,10 %) con todas las bacterias evaluadas.

Tabla 1. Promedio del halo de inhibición (mm) y % de inhibición de las cepas bacterianas con el extracto total

Extracto total						
[mg/ml]	p.h. I <i>B. cereus</i>	% I <i>B. cereus</i>	p.h. I <i>S. aureus</i>	% I <i>S. aureus</i>	p.h. I <i>P. aeruginosa</i>	% I <i>P. aeruginosa</i>
10	13,75	72,63	10,75	62,32	13,75	110,25
25	14,87	73,54	14,50	53,35	15,50	107,02
30	15,87	73,93	16,00	56,57	18,75	97,50
40	17,50	76,32	18,25	63,88	20,00	97,84
50	19,62	80,20	20,50	70,63	20,00	90,29

Tabla 2. Promedio del halo de inhibición (mm) y % de inhibición de las especies bacterianas en la Fracción F₂

Fracción acetato de etilo F₂						
[mg/ml]	p.h. I <i>B. cereus</i>	% I <i>B. cereus</i>	p.h. I <i>S. aureus</i>	% I <i>S. aureus</i>	p.h. I <i>P. aeruginosa</i>	% I <i>P. aeruginosa</i>
10	19,50	103,05	13,75	80,84	15,25	122,11
25	23,50	116,19	21,62	79,71	20,75	143,10
30	24,00	111,59	24,50	86,78	21,75	113,12
40	25,50	110,98	26,00	91,57	24,25	118,66
50	26,62	108,85	26,62	91,55	26,62	120,18

El extracto EtOH (figura 1) produjo mayor halo de inhibición en la bacteria *P. aeruginosa* (20mm) y la fracción AcOEt, presentó mayor halo de inhibición en la concentración de 50 mg/ml en todas las bacterias evaluadas (26, 62 mm).

El análisis de varianza indica que entre las variables (bacterias, concentraciones y extractos) existen diferencias significativas, es decir, la acción de los extractos varia con respecto a las concentraciones y a las bacterias ensayadas. La actividad fue positiva en todos los tratamientos, teniendo mayor efecto inhibitorio la fracción AcOEt y la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* la más inhibida con ambos extractos.

El potencial de *P. tithymaloides* como antibacteriano no ha sido establecido anteriormente; sin embargo estos resultados positivos coinciden lo reportado para un especie del género *Croton* (Euphorbiaceae) que indican que esta especie tiene actividad antibacteriana en un 76% para Gram positivas (Martínez et al., 2000).

La actividad antibacteriana dio resultados no solo para bacterias Gram positivas sino también en *P. aeruginosa*, una bacteria Gram negativa menos sensible a los metabolitos provenientes de extractos vegetales. Los resultados en *P. tithymaloides* sobre esta bacteria demuestran lo contrario, alentando la continuidad de estudios en esta actividad

debido a la multiresistencia ofrecida por este tipo de bacterias.

Se conoce que las actividades antibacteriana están relacionada con los metabolitos secundarios tipo terpenos, alcaloides y flavonoides (Prego *et al.*, 1999); si bien el elemento por el cual este tipo de sustancias ejerce actividad antimicrobiana es desconocido es necesario precisar estudios para indicar que compuestos son los responsables.

La fracción diclorometano no inhibió el crecimiento de las bacterias Gram negativas y Gram positivas evaluadas.

El extracto etanólico total y la fracción acetato de etilo presentaron actividad antibacteriana frente a las bacterias *S. aureus*, *B. cereus* y *P. aeruginosa* a las concentraciones ensayadas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén Darío Torrenegra, Director del Grupo de Investigación Fitoquímica Pontificia Universidad Javeriana, por su colaboración en el desarrollo de la actividad biológica. Al Prof. Oscar Vergara, Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad de Sucre por su asesoría en el análisis estadístico.

REFERENCIAS

- García JA, Cantón R, García J.** 2002. *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los Antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología clínica.* Sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica.
- López R, Álvarez M, López T, González J.** 1997. Actividad antifúngica in vitro de *Pinus caribaea*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2:25-29.
- Martínez J, Bernal H, Cáceres A.** 2000. *Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas.* Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo (CITED). Convenio Andrés Bello. Bogotá, Colombia.
- Martínez J, Molina N, Boucourt E.** 1997. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Psidium guajava*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2:12-14.
- Mongeli E, Pomilio A.** 2002. Nuevos medicamentos y etnomedicina del uso popular a la industria. *Revista de Divulgación científica y tecnológica de la asociación ciencia hoy*, 12:2-3.
- Payo A, Vélez H, Martínez.** 2001. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Crotón L.* *Revista Cubana de Farmacia*, 35:203-206.
- Prego M, Díaz J, Merino F.** 1999. Actividad antifúngica de la capsicina frente a varios hongos fitopatógenos. *Memorias, XIII Reunión Nacional de Sociedad Española de Fisiología Vegetal.*
- Trease G, Evans W.** 1982. *Farmacognosia.* Segunda edición. CIA. Editorial Continental, S. A. México.

