

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DE VOLÁTILES Y NO VOLÁTILES DE *LIPPIA ALBA* Y EXTRACTOS ORGÁNICOS Y ACUOSO DE *JUSTICIA PECTORALIS* CULTIVADAS EN DIFERENTES PISOS TERMICOS DEL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA

RESUMEN

Los hidrodestilados y extractos metanólicos de *L. alba* sin hidrodestilar y destiladas, además de extractos acuoso y orgánicos (acetato de etilo, etanol) de *J. pectoralis* fueron evaluados para su actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar con disco y diluciones dobles seriadas en medio líquido. Todos los extractos mostraron una insignificante actividad (leve o inactivo), mientras que los volátiles de *L. alba* mostraron fuerte actividad contra *Candida albicans* seguido de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En lo concerniente a la evaluación antimicrobiana de plantas cultivadas en diferentes altitudes, no se observó diferencia significativa en ninguno de los casos.

PALABRAS CLAVES: Actividad antimicrobiana, *staphylococcus aureus*, *candida albicans*, *escherichia coli*, *Justicia pectoralis*, *Lippia alba*.

ABSTRACT

On the one hand hydro-distilled and methanol extracts from both non distilled and distilled *L. alba* and the other hand, water and organic (ethyl acetate, ethanol) from *J. pectoralis* were evaluated for their antimicrobial activity by means of the agar disk diffusion and broth dilution (two-fold serial dilutions). All the extracts showed insignificant antimicrobial activity (weak or inactive). Otherwise, essential oils of *L. alba* exhibited strong activity against *Candida albicans* followed by *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Concerning the antimicrobial evaluation of plants growing in different altitudes, no significant difference was observed in any of these cases.

KEYWORDS: Antimicrobial, *staphylococcus aureus*, *candida albicans*, *escherichia coli*, *Justicia pectoralis*, *Lippia alba*.

1. INTRODUCCION

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado las plantas como materia prima para la elaboración de preparaciones tradicionales (infusiones, tes o jugos), con la finalidad de controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, resolver problemas de resistencia de los microorganismos y los efectos colaterales de algunos antimicrobianos sintéticos [1]. Muchos extractos y aceites esenciales obtenidos de plantas han mostrado ser bioactivos in Vitro e in Vivo, por lo que se justifica la investigación enfocada a evaluar la actividad antimicrobiana de estos vegetales [2]. En Colombia, se considera que *Justicia pectoralis* (amansa toros) y *Lippia alba* (pronto alivio) son fieles representantes de la medicina tradicional, en la cual se les ha conferido diversas propiedades, muchas de ellas validadas científicamente en otros países, como analgésica y expectorante, [3]; sedativo, antidiabético [4]; carminativa, espasmolítica [5], entre otras, para el caso de *Lippia alba*. A *J. pectoralis*, se le atribuye acción analgésica, antiinflamatoria [6] y broncodilatadora [7]. Todo lo anterior pone en evidencia el gran potencial fitoterapéutico de estas plantas y el interés por estudiarlas. En esta investigación se evaluó la actividad

antimicrobiana de extractos orgánicos y acuoso de *J. pectoralis* y volátiles y no volátiles de *L. alba* cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento del Tolima, reconociéndose que la diversidad climática y topográfica del país, puede generar diferentes quimiotipos [8]. Los microorganismos (MO) empleados fueron *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli*, los cuales son de importancia clínica por las patologías que originan y la actual resistencia que han mostrado a los antibióticos convencionales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

El material vegetal en estado óptimo de desarrollo vegetativo y fitosanitario se recolectó en el municipio de Chaparral (830 m.s.n.m) y el área urbana y rural del municipio de Ibagué (1050 y 1265 m.s.n.m) en el departamento del Tolima, durante el mes de abril, correspondiente al periodo de lluvias. Los especímenes de ambas plantas se llevaron al Herbario Toli de la Universidad del Tolima para su identificación. Las partes

JUAN RAMÓN VERA

Tesista. Biólogo
Universidad del Tolima
juanbiolut@yahoo.es

PEDRO FELIPE PASTRANA

Tesista. Biólogo
Universidad del Tolima
p.f.p.c@hotmail.com

KHATERIN FERNÁNDEZ

Bióloga. Esp.
Universidad del Tolima
kafelo16@hotmail.com

AMPARO VIÑA

Químico.
Universidad del Tolima
amvipa36@gmail.com

areas de *Justicia pectoralis* se secaron a 50 ± 2 °C y las de *Lippia alba* se secaron a temperatura ambiente.

2.2 Obtención de extractos y aceites esenciales

El material vegetal seco y triturado de *J. pectoralis* se sometió a maceración hasta agotar la matriz utilizando etanol y acetato de etilo (1:10). Los diferentes extractos se concentraron a presión reducida en un rotavapor. El extracto acuoso se obtuvo por decocción, tratando de simular lo realizado por las comunidades. Para *L. alba* se obtuvieron dos macerados metanólicos: uno a partir del material vegetal seco (pre) y otro a partir del residuo del hidrodestilado (post). Los aceites esenciales fueron obtenidos por hidrodestilación de 100g de material vegetal, durante 2 h en un equipo Clevenger. El aceite se seco sobre sulfato de sodio anhidro y se almacenó a 4 °C protegido de la luz.

2.3 Tamizaje fitoquímico

Se evaluaron los principales componentes químicos presentes en las especies estudiadas, siguiendo la metodología sugerida por Sanabria [9] y Domínguez [10], con algunas modificaciones.

2.4 Actividad antimicrobiana

Se emplearon *S. aureus* (Gram. +) (ATCC 6538), *E. coli* (Gram. -) (ATCC 25992) y la levadura *C. albicans* (ATCC 14053). Las cepas suministradas por el laboratorio de microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá), se mantuvieron en medio líquido tripticasa de soya (oxid), incubadas durante 24 h a 37 °C. Se implementó el método de difusión en agar, utilizando discos estériles de papel Whatman No.1 de 1.25 cm. de diámetro, los cuales se colocaron sobre medio de cultivo sólido Muller-Hinton, previamente inoculado con los microorganismos. Los discos se impregnaron por 5 minutos con c/u de los extractos, aceites esenciales, los distintos controles negativos (etanol 96%, acetato de etilo, agua destilada y metanol) además de los diferentes controles positivos para cada uno de los microorganismos (tabla 1). Se incubaron las placas a 37 °C por 24 h y después de este periodo se midieron los halos de inhibición en cm. Las pruebas se consideraron negativas cuando se presentó crecimiento microbiano alrededor del disco; en los ensayos en los que el halo de inhibición fue similar o mayor a alguno de los controles positivos se procedió a evaluar concentraciones de 50, 25 y 12,5 %. Mediante la microdilución en medio líquido (caldo CASO) se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), en un rango de concentraciones doblemente seriadas de 1 – 500 µg/ml; después de 18 horas de incubación a 37 °C se midió la transmitancia a 580 nm mediante un espectrómetro UV PERKIN – ELMER lambda 1 UV / Vis, de los diferentes tratamientos y se

comparó con los siguientes controles: tubos con medio sin inóculo, medio inoculado. Dada la insolubilidad del aceite en agua, se utilizó etanol 95 % como solvente, por lo que fue necesario realizar paralelamente con la serie problema una serie blanco a fin de conocer el efecto del solvente; en ningún caso se encontró efecto del solvente sobre las células microbianas. La concentración mínima bactericida (CMB) se determinó mediante la inoculación del medio sólido con una alícuota proveniente de los medios líquidos en donde se registro inhibición del crecimiento. Todas las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. Se realizaron análisis de correlación lineal, análisis de varianza (ANOVA) y una prueba LSD para los diferentes tratamientos mediante el empleo del software estadístico ESM – EST.

Microorganismos	Antimicrobianos (controles positivos)
<i>S. aureus</i> (Sa)	Gentamicina (12mg/ml)
	Cloranfenicol (15mg/ml)
	Eritromicina (12mg/ml)
<i>E. coli</i> (Ec)	eritromicina (10mg/ml)
	Cloranfenicol (15mg/ml)
	Gentamicina (12mg/ml)
<i>C. albicans</i> (Ca)	Cloranfenicol (mg/ml)
	Fluconazol (15mg/ml)
	Ketoconazol (10mg/ml)

Tabla 1. Controles positivos de susceptibilidad antimicrobiana de los microorganismos

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Tamizaje fotoquímico

En todos los extractos se evidenció la presencia de flavonoides, esteroides, taninos, saponinas, cumarinas y lactonas terpénicas. Sin embargo, en los macerados metanólicos de *L. alba* las quinonas se detectaron tan solo en el extracto pre de la meseta.

3.2 Actividad antimicrobiana

Como se evidencia en la tabla 2, los halos de inhibición de todos los extractos fueron inferiores al de sus respectivos controles. En *J. pectoralis*, se registró una única inhibición (*S. aureus*) correspondiente al extracto de acetato de etilo obtenido de la muestra de la meseta. Por consiguiente, los metabolitos secundarios responsables de dicha acción en esta especie, son en su mayoría de carácter apolar y además sugiere una posible diferencia en la composición fitoquímica, relacionada con el sitio de recolección. En el caso de los extractos metanólicos de *L. alba*, los resultados coinciden con la ineficacia mostrada en otros estudios de actividad antimicrobiana, aunque con extractos etanólicos, realizados por Holetz et al., (2002) y Teixeira et al., (2005) con la misma especie [11, 12].

Trat MO	Extractos <i>J. pectoralis</i>						Extractos (MOH) <i>L. alba</i>				Controles positivos				
	Meseta			Gaviota			Meseta		Chaparral		Gen	Eri	Clo	Flu	Ket
	A.E	E	A	A.E	E	A	Pre	Pos t	Pre	Pos t					
Sa	0	0	0	0	0	0	1.7 ±0 ^a	1.4 ±0 ^a	1.5 ±0 ^a	1.5 ±0 ^a	3 ±0.2 ^b	3.1 ±0.9 ^b	5.3 ±0.3 ^a	---	---
Ec	2.1 ±0.2	0	0	0	0	0	1.5 ±0 ^a	1.6 ±0 ^a	1.5 ±0 ^a	1.7 ±0 ^a	3.3 ±0.6	3.4 ±0	6.1 ±0.4 ^a	---	---
Ca	0	0	0	0	0	0	1.5 ±0 ^a	1.8 ±0 ^a	1.4 ±0 ^a	1.6 ±0 ^a	---	---	2.5 ±0 ^b	2.7 ±0.3 ^b	2.6 ±0.5 ^b

Tabla 2. Promedio de los halos de inhibición (cm) de extractos de *J. pectoralis* y *L. alba* (A.E) Acetato de etilo; (E) Etanol; (A) Agua; (MOH) Metanol. (Gen) gentamicina; (Eri) eritromicina; (Clo) cloranfenicol; (Flu) fluconazol; (Ket) ketoconazol. * Datos con letra diferente indican diferencias significativas en cada microorganismo. P < 0,05.

Trat MO	Aceite esencial (Meseta)					Aceite esencial (Chaparral)					Controles positivos				
	100	50	25	12.5	CMI	100	50	25	12.5	CMI	Gen	Eri	Clo	Flu	Ket
Sa	3.6 ±0.35 ^b	2.2 ±0.1	1.8 ±0.1	1.8 ±0	500	3.4 ±0.3 ^b	2.3 ±0.2	1.7 ±0	1.7 ±0	500	3 ±0.2 ^b	3.1 ±0.9 ^b	5.3 ±0.3 ^a	---	---
Ec	1.9 ±0.1 ^b	1.7 ±0.1	1.6 ±0	1.6 ±0	-	2.0 ±0.2 ^b	1.8 ±0.1	1.7 ±0	1.7 ±0	-	3.3 ±0.6	3.4 ±0	6.1 ±0.4 ^a	---	---
Ca	8.4 ±0.5 ^{a*}	3.8 ±0.2 ^b	2.9 ±0.1 ^b	2.6 ±0 ^b	>500	8.0 ±0.1 ^a	3.1 ±0.2	2.8 ±0.1	2.5 ±0	>500	---	---	2.5 ±0 ^b	2.7 ±0.3 ^b	2.6 ±0.5 ^b

Tabla 3. Promedio de los halos de inhibición (cm) de las concentraciones (%) y los controles positivos: (Gen) gentamicina; (Eri) eritromicina; (Clo) cloranfenicol; (Flu) fluconazol; (Ket) ketoconazol. Concentración mínima inhibitoria (CMI) µg/ml de los aceites esenciales de *L. alba*; * Datos con letra diferente indican diferencias significativa en cada microorganismo. P < 0,05.

A diferencia de los extractos, los aceites esenciales de *L. alba* fueron activos contra todos los microorganismos ensayados, mostrando una zona de inhibición superior o similar a la de los controles positivos, en mayor medida contra *C. albicans* seguido de *S. aureus*, siendo el efecto contra *E. coli* el menor de todos (tabla 3). La mayor actividad antimicrobiana más que antibacteriana fue también reportada por Oliveira et al., (2006) [13]. Respecto a las especies bacterianas, de igual forma Pino et al., (1996) encontraron mayor sensibilidad al aceite esencial de *L. alba* colectada en Cuba, por parte de bacterias Gram positivas [14]. Esta diferencia entre las respuestas de las bacterias a los tratamientos, podría deberse a la composición de la pared celular, que presentan Gram positivas y Gram negativas según Pessini et al., (2003) [15].

En cuanto a las concentraciones evaluadas para los aceites de *L. alba*, se determinó que la actividad es dependiente de la concentración ($r = 0,98$). Al compararse el efecto anticandida de los aceites de *L. alba*, con respecto a los controles positivos es evidente que la eficacia de la concentración más baja en disco (12.5%), se aproxima a la acción mostrada por los controles positivos, dado que no se presentan diferencias significativas respecto a éstos. Esta similitud representa una posible alternativa para el control de la candidiasis bajo estudios detallados que permitan determinar la dosificación del aceite disminuyendo los posibles efectos colaterales que pueda presentar. Además, se evidenció que no hay diferencias significativas de la actividad de

estos según el sitio de recolección, lo que sugiere que posiblemente no existen diferencias sustanciales en cuanto a la composición de los fitoquímicos bioactivos a pesar de encontrarse diferentes quimiotipos de *L. alba* (en estudio).

Diversas investigaciones han sido realizadas para evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes aceites esenciales y muchos de sus componentes, especialmente mono y sesquiterpenos. El efecto inhibitorio de varios terpenoides sobre el consumo de oxígeno de los microorganismos y la fosforilación oxidativa ha sido demostrada. En particular alcoholes fenólicos y no fenólicos (de origen terpenoide) exhibieron fuertes efectos inhibitorios seguidos por aldehídos y cetonas [16].

La menor concentración a la cual se registró una marcada inhibición del crecimiento microbiano, fue de 500 µg/ml para *S. aureus*; la acción a esta concentración fue bacteriostática al registrarse crecimiento en medio sólido, lo que permite decir que la CMI es mayor a dicha concentración. Para el caso de la levadura, la CMI no se encuentra en el rango evaluado (1 – 500 µg / ml).

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados sugieren un potencial terapéutico de los aceites esenciales de *L. alba* debido a su actividad frente a los diferentes MO; por lo que se deberían realizar estudios de las condiciones agronómicas y de rendimiento y calidad del aceite esencial.

Se sugieren estudios in Vivo de la aplicación de los aceites esenciales para tratar la candidiasis así como desarrollar estudios del mecanismo de acción en cuánto al agente causal de esta patología.

Se recomienda ensayar solventes de menor polaridad para evaluar la actividad antimicrobiana de *J. pectoralis*.

5. BIBLIOGRAFIA

[1] Rangel D., García I., Velasco J., Buitrago D., Velasco E. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers *Revista De La Facultad De Farmacia* Vol. 42, 2001

[2] Martínez, M.J., Betancourt, J., Alonso-González, N., Jauregui, A., Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 52, 1996.

[3] Cáceres; Samoya. "Tamizaje de la actividad antibacteriana de plantas usadas en Guatemala para el tratamiento de afecciones gastrointestinales", Cuadernos de investigación N° 6-89, Guatemala DIGI/USAC. 1989

[4] Gutiérrez, M.A.; Duque, A. Estudio básico de mercado de ocho plantas medicinales de interés latinoamericano. Proyecto OEA-AICD / AE-089/02.

[5] Tavares E.S.; Julião L.S.; Lopes, D.; Bizzo, H.R.; Lage, C.L.S.; Leitão, S.G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba*(Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 15(1), 2005

[6] Lino C.S; Taveira M.L; Viana G.S;* Matos F.J. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. *Phytotherapy Research* Volume 11, Issue 3 , 1998.

[7] Leal, L.K.; Ferreira, A.A.; Becerra, GA, Matos, F.J.; Viana, G.S. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *J. Ethnopharmacol.* 70(2), 2000.

[8] Stashenko, E.E.; Jaramillo, B.E.; Martínez, J. R. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 27(105). 2003.

[9] SANABRIA, G, Antonio. Análisis fitoquímico preliminar: metodología y su aplicación en la evaluación

de cuarenta plantas de la familia Compositae. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Santafé de Bogota. 1983.

[10] DOMINGUEZ, Xorge. A. Métodos de investigación fitoquímica. Centro regional de ayuda técnica: México/Buenos Aires. 1973.

[11] Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. G., Nakamura, C. V. y Dias, B. P. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 97(7): Rio de Janeiro, 2002.

[12] Teixeira, M. C., Figueira, G. M., Sartoratto, A., Garcia, V. L. y Delarmelina, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 97, 2005

[13] Oliveira D.R; Leitao G.G; Santos S.S; Bizzo D.P; Alviano C.S; Alviano D.S. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximin'a, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006.

[14] Pino, J:A.; Ortega, A.G.; Rosado, A.; Rodríguez, M.; Baluja, R. Composición y propiedades antibacterianas del aceite esencial de *Lippia alba* (Mill.) n. e. Brown. *Rev Cubana Farm.* 30(1), ISSN 0034-7515 1996.

[15] Pessini, G. L., Dias, B. P., Nakamura, C. V. y Garcia, D. A., y. Antibacterial Activity of Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallascens* (C. DC.) Yunck *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Vol. 98(8): Rio de Janeiro 2003.

[16] Griffin, S.G., Wyllie, G., Markham, J.L., Leach, D.N. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. *Flavour and Fragrance Journal* 14, 1999.