

Actividad antimicrobiana *in vitro* de *Pteris vittata* L

In vitro antimicrobial activity of *Pteris vittata* L

MSc. Yudit Acosta Campusano,^I Dr. Orelvis Maximiliano Castellano Lugo,^{II}
Lic. José Antonio Roble Santisteban,^I Lic. Manuel Gondres Barreiro,^I
MSc. Javier Ángel Frías Tamayo,^I Dr. C. Eugenio Torres Rodríguez^{III}

^I Filial de Ciencias Médicas "Haydée Santamaría Cuadrado". Manzanillo, Granma, Cuba.

^{II} Unidad Municipal de Higiene y Epidemiología. Placetas, Villa Clara, Cuba.

^{III} Universidad de Granma. Bayamo, Granma, Cuba.

RESUMEN

Introducción: las hojas de *Pteris vittata* L (helecho) son utilizadas por la población para el tratamiento de la candidiasis y en enfermedades producidas por bacterias en la piel.

Objetivo: identificar preliminarmente las familias de metabolitos secundarios presentes en las hojas de la planta y evaluar su posible actividad antimicrobiana.

Métodos: se recolectaron las hojas de *Pteris vittata* L. El material vegetal fue lavado, desinfectado, secado y seguidamente se procedió a su pulverización.

Este polvo se utilizó en la elaboración de los diferentes extractos y tintura.

La tintura obtenida se concentró y se fraccionó sucesivamente con n-hexano, cloroformo y acetato de etilo. A estos extractos se les realizó el tamizaje fitoquímico, ensayos microbiológicos y cromatografía de capa fina.

Resultados: las pruebas *in vitro* efectuadas a los extractos obtenidos a partir de la tintura 20 %, demostraron que éstos presentan actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, destacándose los resultados obtenidos frente a *Candida sp* para los extractos de acetato de etilo y clorofórmico. En estas fracciones están presentes en mayor proporción alcaloides y quinonas, que podrían ser los responsables de esta actividad, lo cual se corrobora con la identificación de estos metabolitos secundarios mediante la cromatografía de capa fina y el tamizaje fitoquímico realizado.

Conclusiones: el estudio combinado mediante la cromatografía de capa fina y el tamizaje fitoquímico de los extractos hexánico, acetato de etilo y clorofórmico permite inferir que la actividad antimicrobiana puede deberse a la presencia de quinonas y alcaloides.

Palabras clave: tamizaje fitoquímico, *Pteris vittata*, extractos, cromatografía de capa fina, uso terapéutico.

ABSTRACT

Introduction: *Pteris vittata L. leaves (fern)* are used by people on the candidiasis treatment and some skin illnesses caused by bacteria.

Objective: to identify preliminarily the secondary metabolites present in the leaves of the plant and to evaluate their possible antimicrobial activity.

Methods: *Pteris vittata L. leaves* were collected. The plant material was washed, disinfected, dried and pulverized. The powder obtained was used to make the various extracts and the tincture. The latter was concentrated and successively fractionated with n-hexane, chloroform, and ethyl acetate. The extracts underwent phytochemical screening, microbiological assays and thin-layer chromatography.

Results: in vitro tests performed in the obtained extracts from the 20 % tincture proved that they have antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, emphasizing the accomplished results against *Candida* of the ethyl and chloroform acetate extracts. Alkaloids and quinones, which are found in large proportion in the extracts, would be responsible of the above- mentioned antibacterial activity. This was corroborated by the identification of these secondary metabolites through thin-layer chromatography and phytochemical screening.

Conclusions: the combined study through thin-layer chromatography and phytochemical screening of the ethyl and chloroform acetate extracts showed that the antimicrobial activity could be possible due to the alkaloids and quinones presence.

Keywords: phytochemical screening, *Pteris vittata*, extracts, thin-layer chromatography, therapeutic use.

INTRODUCCIÓN

La medicina herbaria a lo largo de la historia, representa un conocimiento adquirido durante miles de años y que nuestros ancestros transmitieron, ya que forma parte del acervo cultural de la humanidad.¹ El rechazo mundial que tienen los productos sintéticos medicinales en la actualidad, por las reacciones adversas que provocan, ha hecho que los científicos y el personal médico acuda a estudiar las aplicaciones de los productos naturales obtenidos a partir de las plantas medicinales, para prevenir y tratar numerosas afecciones de salud de forma efectiva y segura en la población de los diferentes países.²

En Cuba, en los últimos años el uso de plantas medicinales como recurso terapéutico adquiere una relevancia fundamental por su probada efectividad e inocuidad, ya que se utiliza en la sustitución de las materias primas de importación para la elaboración de medicamentos en la industria farmacéutica y como arma terapéutica en los sistemas médicos y fitoterapéuticos tradicionales.³

La flora cubana posee un gran número de familias de plantas, algunas endémicas, que poseen propiedades medicinales reconocidas.³ Entre esas especies se encuentran las *Pteridaceas*, estudiada en busca de alternativas naturales para tratar algunas enfermedades. Específicamente *Pteris vittata L*, es ampliamente utilizada por la población cubana en la cura de diferentes afecciones, por tanto, resulta de interés comprobar la acción antimicrobiana *in vitro* de los distintos extractos elaborados y realizar estudio por cromatografía de capa fina de las fracciones obtenidas, dirigido al conocimiento de las principales familias de metabolitos secundarios presentes que sean de interés biológico, por lo que resulta necesario identificar preliminarmente las familias de metabolitos secundarios presentes en las hojas de la planta y evaluar su posible actividad antimicrobiana.

MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Pteris vittata L se recolectó en noviembre, en una acera caliza de la zona alta de la ciudad de Manzanillo, Granma con abundante vegetación y humedad. Fueron utilizadas las hojas de la planta. La droga fue herborizada e identificada en el Jardín de los Helechos en Santiago de Cuba por el Lic. Manuel José García Caluff y en el Laboratorio de Botánica de la Universidad de Granma, siguiendo la descripción botánica y su clasificación taxonómica.

El material se lavó y desinfectó con una solución de hipoclorito de sodio 2 %, se secó a la sombra a temperatura ambiente extendiéndose en bandejas perforadas, volteándose diariamente durante 7 días, luego se sometió a temperatura de 60 °C durante 1 hora en estufa con circulación de aire marca (*WSU 400*) de fabricación alemana. Terminado este proceso de secado se procedió a la pulverización de la droga, usando un molino de cuchilla, hasta obtener un polvo grueso (2 mm) que se empleó en la elaboración de los extractos y tintura.⁴

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES Y FRACCIONAMIENTO

Se utilizó como menstuo alcohol al 70 % se obtuvo la tintura al 20 % por maceración de la droga pulverizada durante 7 días⁴ empleando la zaranda (*ILM, THYS2*, Alemana). La tintura obtenida de las hojas del *Pteris vittata L* se concentró en evaporador rotatorio *IKA RV 10* basico hasta un volumen de 100 mL y se fraccionó sucesivamente (3x30 mL) con solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo y acetato de etilo, mediante el empleo de un embudo separador, luego cada una de estas fracciones fueron secadas.⁵

TAMIZAJE FITOQUÍMICO

Se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales del Centro de Estudio de Química Aplicada (CEQA) de la Universidad de Granma (UDG), Bayamo, Cuba, por la metodología reportada por Payo, Sandoval y Peña,⁶⁻⁸ para la determinación de los diferentes metabolitos secundarios.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco (*Bauer-Kirby*), el cual fue adoptado

por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, antes NCCLS) como norma de aceptación general.⁹

MICROORGANISMOS EVALUADOS

En el ensayo de la actividad antibacteriana se utilizaron cepas de referencia internacional, depositadas en el *American Type Culture Collection* (ATCC) y forman parte de una batería mínima de cepas que se emplean para este tipo de estudios, las cuales se relacionan a continuación: *Escherichia coli* (ATCC 113-3), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC14207) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 15008).

También se emplearon tres cepas salvajes de *Salmonella entérica*, *Shigella sp* y *Enterobacter aerogenes*, aisladas de pacientes con afecciones gastrointestinales, en el Centro de Higiene y Epidemiología de Manzanillo, Granma. Se utilizaron cepas de *Candida sp* aisladas de pacientes con infecciones vaginales, en el centro anteriormente mencionado. La existencia o no de diferencias significativas entre los diámetros de los halos de inhibición en cada proceso se evaluó por medio de un análisis de varianza (ANOVA).

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (CCF)

Para la cromatografía en capa fina (CCF) se emplearon placas semipreparativas de sílica gel (20 x 20 cm, 2 mm de espesor, *Aldrich-Sigma*). El seguimiento de la separación de los compuestos se llevó a cabo a través de la observación de los perfiles cromatográficos bajo la luz ultravioleta ($\lambda=365$ nm) con una lámpara (WD 9403E, China).^{5,10} Los sistema de solventes utilizados fueron (v/v): A (9:1), tolueno:acetato de etilo, B (2:1), éter de petróleo:acetato de etilo, C (1:9), tolueno:acetato de etilo.

RESULTADOS

Para realizar la evaluación antimicrobiana se utilizó una concentración final de 400 µg/disco, tabla 1. Según la clasificación de la susceptibilidad de los microorganismos, publicada por el *CCLSI*, las cepas de *Escherichia coli* (ATCC), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) y *Staphylococcus aureus* (ATCC) son susceptibles (S) frente al cloranfenicol, mientras que las cepas de *Shigella*, *Enterobacter aerogenes* y *Salmonella* tienen sensibilidad intermedia (I).^{9,11} De igual forma se compara la actividad biológica de los extractos y el antimicótico comercial (fluconazol) que presenta un halo de inhibición de 19-20 mm en hongos como la *Candida sp*,¹¹ considerándose susceptible (S), mientras que los extractos clorofórmicos y de acetato de etilo presentan un halo de 10 mm, clasificándose como resistentes.

TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE LAS HOJAS.

La tintura obtenida de las hojas de helecho, se les realizaron extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo y acetato de etilo. A estos extractos se les realizó el tamizaje fitoquímico con el objetivo de identificar aquellas familias de metabolitos que tienen propiedad antimicrobiana y para corroborar su presencia se empleó la cromatografía de capa fina, sin revelador químico a $\lambda=365$ nm. Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

Tabla 1. Evaluación de la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos obtenidos a partir de la tintura al 20 % de *Pteris vittata L*

Extractos	Halos de inhibición(mm)						
	<i>E. coli</i> ATCC	<i>P. aerug</i> ATCC	<i>S.aureu</i> ATCC	<i>E. aerog</i> Salvaje.	<i>Shigella</i> Salvaje	<i>Salm.</i> Salvaje	<i>Candida</i> sp.
hexánico	-	-	7	-	-	-	-
clorofórmico	7	-	7	-	-	-	10
acetato de etilo	9	-	9	-	-	-	10
cloranfenicol (control +)	22	17	21	15	16	19	-
fluconazol (control +)	-	-	-	-	-	-	19-20

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de las hojas de *Pteris vittata L*

Ensayos (metabolitos)	hexánicc	clorofórmicc	acetato de etilic
<i>Bontrager</i> (quinonas)	+	++	++
FeCl ³ (fenoles/taninos)	-	-	-
<i>Shinoda</i> (flavonoides)	-	+	-
<i>Baljet</i> (coumarinas)	-	-	-
<i>Wagner</i> (alcaloides)	+	+	-
<i>Mayer</i> (alcaloides)	+	+	-

Tabla 3. Cromatografía de capa fina de los extractos obtenidos de las hojas de *Pteris vitataL*

Puntos	Hexánico		Clorofórmico		Acetato de etilo	
	RF Sistema A	UV $\lambda=365\text{nm}$	RF Sistema B	UV $\lambda=365\text{nm}$	RF Sistema C	UV $\lambda=365\text{nm}$
1	0,51	Amarilla	0,13	Verde	0,18	Rojo
2	0,70	Rosada	0,27	Amarillo	0,44	Rosado
3	0,89	Amarilla	0,60	Rosado	0,52	Rojo
4			0,71	Rosado	0,60	Rojo

DISCUSIÓN

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos obtenidos a partir de las hojas de helecho, frente a seis cepas bacterianas y una cepa de hongo levaduriforme, se puede observar que todos los extractos presentan actividad frente a determinados microorganismos, en algunos casos con halos de inhibición entre 7,9 y 10 mm. Los resultados más significativos en comparación con el resto fueron los obtenidos para el extracto de acetato de etilo que tiene una mayor actividad antibacteriana frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC) y *Escherichia coli* (ATCC) con halos de inhibición de 9 mm de diámetro.

Se realizó una comparación de los halos de inhibición de estos extractos y el antibiótico comercial frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (ATCC) y se pudo demostrar que para $p < 0,05$ existen diferencias significativas. Esta diferencia existente entre los extractos de la planta en estudio y el antibiótico comercial podría atribuirse a la baja concentración de los constituyentes químicos presentes en el vegetal con actividad antimicrobiana, o quizá a la acción antagónica que ejercen sobre ellos otro grupo de compuestos y los discos comerciales contienen el principio activo con altos niveles de pureza. Los resultados para estas plantas son similares a los reportados por otros autores,¹² que emplearon concentraciones superiores a las usadas en esta investigación.

Se puede plantear que los resultados de este trabajo son muy promisorios, por cuanto a concentraciones tan bajas como 0,4 μg /disco se obtienen halos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (ATCC).

De igual forma se compara la actividad biológica de los extractos y el antimicótico comercial (fluconazol) que presenta un halo de inhibición de 19-20 mm en hongos como la *Candida sp.*,¹¹ considerándose susceptible (S), mientras que los extractos clorofórmicos y de acetato de etilo presentan un halo de 10 mm, clasificándose como resistentes. Los resultados obtenidos no son desalentadores por cuanto hay que tener en cuenta las posibles diferencias de concentraciones de los principios activos entre los discos de antibióticos, antimicóticos comerciales y los que contienen los extractos vegetales, pues los discos empleados con estos fármacos tienen una concentración adecuada, mecanismos de acción específicos y estructuras químicas dilucidadas.^{12,13}

En el extracto hexánico en las hojas hay presencia de familias de quinonas y alcaloides y en el extracto clorofórmico se detecta la presencia de familias de flavonoides y alcaloides con abundancia de quinonas, mientras que en el extracto de acetato de etilo abundan las quinonas. Los metabolitos secundarios identificados en abundancia en los diferentes extractos de las hojas fueron las familias de quinonas y alcaloides, los que podrían ser responsables directos de la actividad antimicrobiana de *Pteris vittata* L, frente a *S. aureus*, *E. coli* y *Candida sp.*

Para el extracto hexánico se detectan tres manchas, dos amarillas y una rosada. Las manchas amarillas y rosadas podrían corresponder a quinonas,¹⁴ las fluorescentes azules o amarillas a alcaloides.^{5,14}

La acción antibacteriana en esta fracción de las hojas no fue significativa, lo que podría atribuirse a la cantidad insuficiente de metabolitos secundarios extraídos por este solvente.

El extracto clorofórmico muestra cuatro manchas, las mayoritarias son las rosadas pertenecientes a las quinonas,^{5,14} una amarilla y una verde posibles (quinonas, flavonoides o alcaloides).^{5,15} La actividad antimicrobiana en la fracción de las hojas podría estar determinada por las familias de quinonas, flavonoides y alcaloides.^{5,14,15}

Para el extracto de acetato de etilo se observaron cuatro manchas (tres de color rojo y una rosada), que representan las quinonas.^{5,14} La actividad antimicrobiana reportada para los metabolitos secundarios este extracto de las hojas se corresponden con las quinonas.¹⁶ De igual forma los principios activos identificados en abundancia en los diferentes extractos de las hojas fueron las familias de las quinonas (rojas, amarillas, rosadas).¹⁴

Es posible que sean los implicados directos en la actividad de *Pteris vittata* L, manifestada frente a *S. aureus* y *E. coli*. Estos resultados coinciden con los reportados en otras investigaciones en donde se comprueba la acción antibacteriana de estos metabolitos.¹² No obstante, no fue posible establecer una clara relación entre el halo de inhibición obtenido en las diferentes fracciones y un tipo de constituyente en particular.

Se reporta que las quinonas también tienen actividad antifúngica y es posiblemente la implicada en el halo de inhibición frente a *Candida sp*. Los ensayos *in vitro* de la actividad antifúngica frente a hongos no están suficientemente estandarizados de manera que resulta difícil comparar resultados o relacionar la actividad *in vitro* con la que se detecta *in vivo*. Esta situación conlleva a que en la mayoría de los casos la elección de un antimicótico se haga en función de la especie que esta produciendo la infección, basándose en criterios empírico.^{11,12}

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parga F. Enfermería en la Medicina Natural y Tradicional. La Habana: Ed. Ciencias Médicas; 2005. p.101.
2. MINSAP. Plantas Medicinales. FITOMED II. La Habana: Ed. Ciencias Médicas; 1993. p.117.
3. Peña A, Torres E. Monografía de Productos Naturales. Granma: Universidad de Granma; 2006. p.2-6.
4. Ministerio de Salud Pública. Cuba. Medicamentos de origen vegetal: extractos fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos. NRSP No. 311. La Habana: MINSAP; 1998.
5. Lenis V, Benitez R, Salamanca E, Chito D. Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Bostrychia calliptera*. Scientia technia. 2017;XIII(33):97-102. [citado 20 Nov 2009]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/849/84903323.pdf>
6. Payo A, Oquendo M, Oviedo R. Tamizaje fitoquímico preliminar de plantas que crecen en Sierra de Nipe, Holguín. Revista Cubana de Farmacia. 1996;30(2):120-31.
7. Sandoval D, López D, Oquendo Suarez. Estudio fitoquímico preliminar de detección de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en Cuba. Revista Cubana de Farmacia. 1990;24(2):288-96.
8. Peña RG. Algunas consideraciones sobre el empleo de productos naturales en la medicina natural y tradicional. Monografía. Bayamo: Universidad de Granma; 2002. p. 2-6.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk Diffusion Supplemental Tables. M100-S17 (M2). CLSI: Wayne Pa; 2007.
10. El uso de plantas medicinales en Guatemala, caracterizar los metabolitos secundarios. Fluorescencia naranja en la cromatografía de capa fina [citado 1 Abr 2010]. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2690.pdf

11. Rodero L, Córdoba S, Vivot W, Campo M, Corfield P, Olguín C, et al. Método de difusión con discos para la determinación de sensibilidad a fluconazol en aislamientos de *Candida spp.* Revista argentina de microbiología [serial on the Internet]. 2006 [citado: 1 Dic 2014]; 38: Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v38n3/v38n3a12.pdf>
12. Duraipandiyar V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. BMC Complementary and Alternative Medicine [on-line], 2010 October 17 [citado 1 Abr 2010]; 6:35. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/6/35/prepub>
13. Fuertes C, Roque M, Tristan M. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* con actividad antibacteriana y antifúngica. Rev Ciencia e Investigación. 1998 [citado 20 Nov 2009];18(2). Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/.../flavonoides.htm>
14. Revelamiento fitoquímico de especies vegetales utilizadas en la medicina popular. Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales. Facultad de Química, Ecuador. 2001 [citado 20 Nov 2009]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/.../7/T-ESPE-025143-7.pdf>
15. Rios MY, Aguilar-Guadarrama AB. Alcaloides indólicos, terpenos, esteroides y flavonoides de las hojas de *Hamelia patens* Jacquin (Rubiaceae). Rev Cubana Plant Med. 2006 Abr [citado 31 May 2013];11(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000100006&lng=es
16. Abad RG. Monografía de Metabolismo secundario en las plantas. Bayamo: Universidad Granma; 2004, p.3-5.

Recibido: 1 de diciembre de 2014.

Aprobado: 23 de mayo de 2015.

Yudit Acosta Campusano . Filial de Ciencias Médicas "Haydée Santamaría Cuadrado". Manzanillo, Granma, Cuba. Correo electrónico: yudit@ftec.grm.sld.cu