

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS. SANCTI SPÍRITUS

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA IN VITRO DEL *Pinus caribaea* (PINO MACHO)

Lic. Miguel Rivero López,¹ Dr. Manuel Alvarez González,² Dra. Tania López Acosta³
y Téc. Juana González Cáceres⁴

RESUMEN

Con el objetivo de demostrar la actividad antifúngica *in vitro* frente a hongos filamentosos de los extractos acuoso y alcohólico de hojas de pino macho, se realiza un estudio por el método de difusión y se enfrentan éstos a diferentes especies de hongos como *Microsporium gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium canis* y *Trichophyton rubrum*, productores frecuentes de micosis superficiales en nuestra población. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante el test de Kruskal - Wallis, la prueba de rango de Mann Whitney, el test de Friedman y el test de rango Wilcoxon. Se concluye que el extracto acuoso y los extractos fluidos alcohólicos al 25 y 50 % no presentaron actividad antifúngica frente a estas especies de hongos y que los extractos fluidos alcohólicos al 75 y 100 % presentaron actividad antifúngica estadísticamente similar a la nistatina frente al *M. canis* y *T. rubrum*, aunque mostraron la misma actividad frente a todas las especies analizadas.

Descriptores DeCS: PLANTAS MEDICINALES; HONGOS; IN VITRO; MICOSIS FUNGOIDES

ABSTRACT

An study was carried out with the aim of to prove *in vitro* antifungal activity against filamentous fungi of alcoholic and aqueous extracts from leaves of *Pinus caribaea*, by method of diffusion versus different fungi, like *Microsporium gypseum*, *Trichophytum mentagrophytes*, *Microsporium canis*, and *Thrichophyton rubrum*, which are common producers of superficial mycosis in our population. Data were statistically analyzed by Kruskal-Wallis's test, Mann Whitney's rank test, Friedman's test, and Wilcoxon's rank test. Authors conclude that aqueous extract and alcoholic fluid extracts (25 and 50 %), haven't antifungal activity against these fungi and that alcoholic fluids extracts (75 and 100 % had an statistically similar activity to nystatin against *M. canis* and *T. rubrum*, although showed same activity.

Subject headings: MEDICINAL PLANTS; FUNGI; IN VITRO; FUNGOYD MYCOSIS

¹ Profesor Asistente.

² Doctor en Ciencias. Profesor Titular.

³ Profesor Instructor. Jefe del Departamento de Microbiología.

⁴ Técnica en Docencia.

La principal meta dentro del sector para el año 2000 es la Salud para Todos, por lo cual se ha establecido un plan para mejorar este indicador en la población,¹ que encierra la erradicación y prevención de gran cantidad de enfermedades, lo que implica la disponibilidad de los medicamentos a toda la población. Esto se ha dificultado por su costo elevado, lo que ha estimulado la búsqueda de alternativas en diferentes países, una de ellas es las plantas medicinales.

Nuestro país no está exento de dificultades materiales para obtener los medicamentos necesarios y se ha situado a la vanguardia en la búsqueda de estas alternativas, un ejemplo son los trabajos investigativos con las plantas medicinales donde se encuentran incluidos todos los factores que garantizan su estudio y la producción de preparados que, posteriormente, se adquieren por la población.

Para esta finalidad se han utilizado los conocimientos empíricos que posee la población acerca del uso de las plantas, lo que se ha demostrado científicamente.

Basado en esta forma de trabajo, decidimos el estudio del *Pinus caribaea* (pino macho) para demostrar la actividad antifúngica de sus extractos de hojas, al enfrentarlo *in vitro* a diferentes especies de hongos filamentosos del grupo de los dermatofitos, causantes frecuentes de micosis superficiales en nuestra población.

Una interrogante que se plantea como problema fundamental es ¿Poseen los extractos acuoso y fluido alcohólico de hojas del pino macho, actividad antifúngica frente a los hongos filamentosos?

Los objetivos de este trabajo son determinar la presencia de actividad antifúngica de los extractos acuoso y fluidos alcohólicos de hojas de pino macho y comparar el efecto inhibitorio relativo de estos extractos de hojas (acuoso y fluido alcohólico), así como a los diferentes microorganismo.

BREVE RECUENTO

El empleo terapéutico de las plantas en los pueblos constituye una parte importante de la cultura universal que ha acumulado la humanidad; sin embargo, el proceso de selección biológica de las plantas recogidas al azar y el examen fitoquímico de las plantas con el objetivo de identificar nuevos compuestos químicos no han dado resultado, no obstante, 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.²

En estos años, el estudio de las plantas medicinales ha ganado en importancia, la actividad antimicrobiana

de los extractos de plantas y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como una fuente de agentes antiinfectivos.³

Muchos países se han involucrado en la obtención de medicamentos a partir de las plantas; Bulgaria ha estudiado la actividad antiinfecciosa de los polifenoles extraídos de sus plantas medicinales,⁴ los países del Tercer Mundo poseen los primeros lugares en estos programas de estudio, para garantizar la obtención de preparados asequibles a toda la población.⁵⁻⁹

La actividad antifúngica de las plantas ha sido muy estudiada por la resistencia de los gérmenes de las micosis a los distintos tratamientos, sobre todas las micosis superficiales producidas por las diferentes especies de dermatofitos.^{5,10-12}

El *Pinus caribaea* (pino macho) es una planta abundante en otras regiones del mundo, cuyas hojas son de 2 clases: las primeras, lineales o escamiformes y caducas; las secundarias, aciculares que forman el follaje ordinario, son estrechas, lineales y salen de las axilas de las primarias en fascículas de 2 ó 3 subtendidas por la escama de la yema, algunas de las cuales están unidas para formar una vaina; las hojas son verde oscuro, brillantes, de 17 a 30 cm de largo.¹³ A esta planta se le han descrito usos en la hemorragia posparto, curar la impotencia, estimular la actividad inmunológica, como antibacterina, antitumoral, antiviral y estimulante de las células granulocítica.¹⁴

El uso popular de esta planta no está evaluado científicamente, como antifúngico en las micosis superficiales, por esta razón, nos decidimos a realizar un estudio de los extractos de sus hojas frente a dermatofitos comunes en nuestra población, con el propósito de demostrar la validez de este uso.

VARIABLES

Porcentaje de inhibición relativa (PIR): Asumiendo que el máximo efecto inhibitorio es el producto por el control positivo (CP), se determina el porcentaje de efecto de inhibición del crecimiento del microorganismo de cada extracto, relativo al CP. Para el cálculo se procede de la manera siguiente:

$$PIR = \frac{\bar{X} \text{ diám halo inhib del extracto}}{\bar{X} \text{ diám halo inhib control positivo}} \times 100$$

MÉTODOS

Se realiza un estudio experimental en el Laboratorio de Microbiología del Hospital Ginecoobstétrico Provincial Docente de Sancti Spíritus, para determinar la presencia de actividad

antifúngica de los extractos acuoso y fluido alcohólico de hojas de pino macho.

Recolección del material vegetal. El material vegetal previamente identificado y comparado con la muestra de referencia No. 2012 del herbario del Jardín Botánico de Sancti Spiritus, fue recolectado en la zona del Cacahual donde existe una población completamente desarrollada, lo que demuestra la idoneidad de la zona para el desarrollo de esta planta. Las hojas fueron recogidas en horas tempranas de la mañana para evitar la evaporación del metabolito aceite esencial.

Secado. Las hojas fueron secadas a la sombra durante 13 días.

Extracto. Los extractos fueron suministrados por el Laboratorio de Control de la Calidad de la Empresa Provincial de Suministros Médicos en la forma siguiente: extracto acuoso (obtenido por decocción al 20 %) y extracto fluido alcohólico diluido al 25, 50, 75 y 100 % con etanol al 70 % como menstruo.

Controles. Positivo: nistatina 4 mg/mL; negativo: alcohol, 70 %. Para ambos, agua destilada.

Especies microbianas. *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* y *Trichophyton rubrum*. Estas especies microbianas fueron aisladas y purificadas en el Laboratorio de Micología del Hospital "Calixto García" de Ciudad de La Habana.

Solución salina para homogeneizar hongos. Agua destilada, NaCl y Tween 80. Se homogenizan los hongos

de 1 mL por placa. Se utiliza el patrón No. 9 de la escala Mc Farlan para utilizar una concentración equivalente.

Medio de cultivo. Se utiliza el medio Saboureaud-dextrosa de la Merck.

Ensayo. Se prepara el medio de cultivo y se mantiene en baño María a 45 °C, se inocula la solución homogeneizada de hongo y se vierte en placas grandes, 15 mL por placa. Una vez solidificado el medio, se realizan perforaciones de 10 mm de diámetro donde se inoculan 100 L de extractos y controles; posteriormente se incuban a 25 °C durante 7 días. Este ensayo se repite 3 veces.

Lectura. Se mide el diámetro en centímetros de la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo. Se realizan 2 mediciones desde la línea que define el halo de inhibición de un lado al otro del centro y se toma como resultado el valor promedio de estas mediciones; posteriormente se calcula el porcentaje de inhibición relativo.

RESULTADOS

Los datos obtenidos se muestran en las tablas 1 y 2 y se les realizan las pruebas estadísticas necesaria para su confirmación.

TABLA 1. Media de la zona de inhibición (cm) de los extractos frente a las diferentes especies de hongos en los 3 ensayos

Hongos	Nistatina	100 %	75 %	Test de	
<i>M. gypseum</i>	2,3	1,6	1,2	Friedman X ² =6 p=0,0498	x 100
	2,3	1,8	1,1		
	2,3	1,5	1,1		
<i>T. mentagrophytes</i>	2,4	1,5	1,2	X ² =6 p=0,0498	x 100
	2,1	1,8	1,2		
	2,5	1,8	1,3		
<i>M. canis</i>	2,0	2,0	1,5	X ² =5,1667 p=0,0755	
	2,3	2,0	1,7		
	2,3	2,0	1,8		
<i>T. rubrum</i>	3,0	3,0	1,6	X ² =5,1667 p=0,0755	
	3,0	2,8	1,8		
	3,0	2,7	1,8		
Kruskal-Wallis	X ² =7,7 p=0,53	X ² =9,7 p=0,0213	X ² =9,3 p=0,025.		
Test de Friedman	X ² =22,17 p=0,00.				

Fuente: Registro de Investigación. Facultad de Ciencias Médicas de Sancti Spiritus, 1995.

TABLA 2. Porcentaje de inhibición relativo de los extractos vs control frente a las distintas especies de hongos

Hongos	100 % alcohólico	75 % alcohólico
<i>M. gypseum</i>	69,6	47,8
<i>T. mentagrophytes</i>	73,9	52,1
<i>M. canis</i>	90,9	77,2
<i>T. rubrum</i>	93,3	56,6

Fuente: Registro de Investigación. Facultad de Ciencias Médicas de Sancti Spíritus.

ANÁLISIS Y COMENTARIOS

En primer lugar se estudiaron las diferencias entre grupos mediante el *test* de Kruskal-Wallis y se observaron diferencias significativas en el 100 y 75 % alcohólico respecto a la nistatina, cuyo comportamiento fue diferente a los productos naturales. Al aplicar la prueba de rango Mann Whitney, observamos que los productos se comportan de manera similar frente al *M. gypseum* y *T. mentagrophytes* y diferentes ante *M. canis* y *T. rubrum*, independientemente cada uno de los extractos, lo cual se observa en la tabla 1 como mejor comportamiento de los productos frente a estos hongos.

Al aplicar el *test* de Friedman para estudiar el comportamiento de los 3 productos frente a cada hongo en particular, notamos la presencia de diferencias significativas frente a *M. gypseum* y *T. mentagrophytes*; frente a *M. canis* y *T. rubrum*, el comportamiento de los productos no mostró diferencias estadísticas. El *test* de Friedman, de forma general, muestra que existen diferencias significativas entre los 3 productos (nistatina, 100 y 75 % alcohólicos), por lo que cada uno se comporta diferente a los demás, esto se evidencia al aplicar el *test* de rango de Wilcoxon. Estos resultados son esperados, pues la nistatina es un producto químicamente puro con cualidades antifúngicas y con el cual se comparan extractos de hojas de pino macho. Este es un producto natural donde el compuesto activo con actividad antifúngica se encuentra diluido, mezclado con gran cantidad de otras sustancias que componen el producto en estudio, por lo que su acción debe ser menor que la de la nistatina.

No obstante, al analizar la tabla 2, se muestran los porcentajes de inhibición relativos de los extractos frente al control, observamos que éstos muestran una importante capacidad antifúngica. El extracto al 100 % alcohólico se comporta frente a *M. canis* y *T. rubrum* casi al mismo nivel que la nistatina, comprobado por el

test en la tabla 1, donde se demostró estadísticamente que en esos casos los 3 productos se comportaron de igual forma, lo cual es muy alentador para su uso contra las micosis provocadas por estos hongos.

El extracto acuoso y las diluciones del extracto fluido alcohólico al 25 y 50 %, así como los controles acuoso y alcohólico no presentaron actividad antifúngica.

CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de hojas de pino macho no presentó actividad antifúngica, así como los extractos fluidos alcohólicos al 25 y 50 %, frente a los hongos utilizados en el ensayo.
2. Los extractos fluidos alcohólicos de hojas al 100 y 75 % presentaron actividad antifúngica similar a la nistatina frente al *M. canis* y *T. rubrum*.
3. El extracto fluido alcohólico de hojas de pino macho al 100 % se comportó con mayor actividad que los restantes extractos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Canales FH, De Alvarado EL, Pineda EB. Metodología de la investigación: Manual para el desarrollo del personal de la salud. México:OPS. PASCCAD, 1989:24-90.
2. Farnsworth NR, et al. Las plantas medicinales en la terapéutica. Bol Sanit Panam 1989;107(4):314-29.
3. Rojas A, et al. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. J Nat Etnopharmacol 1992;35:275-83.
4. Lozoya X, Navarro VM, Zurita M. *Solanum chrysotrichum* a plant used in Mexico for the treatment of skin micosis. J Nat Etnopharmacol 1992;36(2):127-32.
5. Palacios C, et al. Cicatricial, antibacterial and antimycotic effects of Tepescohuite in experimental animals. Rev Invest Clin 1991;43(3):205-10.
6. Domínguez XA, et al. Isolation and identification of xochiloldione and isoxochitololone from *Cnidoscopus urens*. J Nat Product 1992;55(2):221-4.
7. Barbosa - Filho JH, et al. Chemical and pharmacological investigation of *Solanum species* of Brazil. A search for solanodine and other potentially useful therapeutic agents. Mem Inst Oswaldo Cruz 1991;86(suppl 2):189-91.
8. Paulo M de Q, et al. Antimicrobial activity of benzylisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanni*. Etnopharmacol 1992;36(1):39-41.
9. Garg SC, Siddiqui N. Antifungal activity of some essential oil isolate. Pharmazie 1992;47(6):467-8.
10. Cáceres A, López BR, Girón MA, Logemann H. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infection. 1. Screening for the antimicrobial activity of 44 plants extracts. J Etnopharmacol 1991;31(3):263-76.
11. Bader G, Kulnaneck Y, Ziegler - Bohme H. The antifungal action of poligalacic acid glycosides. Pharmazie 1990;45(8):618-20.

12. Roig y Mesa JT. Plantas aromáticas y venenosas de Cuba. Ed. Revolucionaria. La Habana: Instituto Cubano del Libro, 1962.
13. NAPRALERT: Profile for *Pinus caribaea* (3 par query for nap, 1 - 3 - 94). Univ of Illinois, 1994.

Recibido: 25 de febrero de 1997. Aprobado: 26 de febrero de 1997.
Lic. Miguel Rivero López. Facultad de Ciencias Médicas de Sancti Spíritus, Cuba.

APUNTES APUNTES APUNTES APUNTES APUNTES APUNTES

U

tilizando un rayo láser que ilumina a los espermatozoides previamente e marcados en su ADN con un colorante que se vuelve fosforescente, se pueden identificar y separar los espermatozoides con un cromosoma Y de los que llevan un cromosoma X. Esta técnica se está utilizando en un centro de fertilización *in vitro* estadounidense, para ayudar a elegir el sexo de los bebés. Como el cromosoma femenino (X) es de mayor tamaño, resplandece más brillantemente y un ordenador capaz de detectar esa diferencia transmite una carga eléctrica positiva a los espermatozoides X y una negativa a los Y; con este proceder es posible dirigir el esperma por diferentes tubos de ensayo debidamente coloreados: rosado para las niñas y azules para los varones. Así, si la madre desea una niña, sus óvulos se mezclarían con espermatozoides rosas y si quisiera un varón, la mezcla se haría con los azules. Una vez fertilizado el óvulo se procede a su implantación en el útero materno.