

Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)

## VALIDACIÓN DEL USO TRADICIONAL DE PLANTAS MEDICINALES CULTIVADAS EN CUBA

Lic. Marta Guerra Ordóñez,<sup>1</sup> Lic. Dinorah Torres Idavoy<sup>2</sup> y Lic. Leticia Martínez Pol<sup>3</sup>

### Resumen

Se evaluó la actividad antimicrobiana y anti-giardiasis *in vitro* de extractos fluidos de *Artemisia absinthium* L., *Stachytarpheta jamaicensis* L. y *Teloxis ambrosioides* L., empleando los ensayos de diluciones en medio líquido y producción de formazán, respectivamente. Fue calculada la concentración mínima inhibitoria y mínima microbicida de microorganismos de interés clínico humano y el porcentaje de inhibición del crecimiento de *G. Lamblia*. Los extractos mostraron actividad antimicrobiana y anti-giardiasis, lo que guarda relación con su uso tradicional. No obstante, otros aspectos deben ser analizados con detenimiento para proponer el uso de estos extractos en el desarrollo de fitofármacos.

Decs: EXTRACTOS VEGETALES/uso terapéutico; PLANTAS MEDICINALES; MEDICINA HERBARIA; GIARDIA LAMBLIA/crecimiento & desarrollo; GIARDIA LAMBLIA/efectos de droga; ARTEMISIA/uso terapéutico; AGENTES ANTIPARASITARIOS/uso terapéutico; CUBA.

### Summary

The *in vitro* antimicrobial and anti-giardial activity of fluid extracts from *Artemisia absinthium* L., *Stachytarpheta jamaicensis* L. and *Teloxis ambrosioides* L. was evaluated by using the assays of dilutions in fluid medium and the production of formazan, respectively. The minimal inhibitory and microbicidal concentration of microorganisms of human and clinical interest and the percentage of growth inhibition of *G. lamblia* were estimated. The extracts showed antimicrobial and anti-giardial activity, which was related to their traditional use. However, other aspects should be analyzed in detail to propose the use of these extracts in the development of phytodrugs.

Subject headings: PLANT EXTRACTS/therapeutic use; PLANTS, MEDICINAL; MEDICINE, HERBAL; GIARDIA LAMBLIA/growth & development; GIARDIA LAMBLIA/drug effects; ARTEMISIA/therapeutic use; ANTIPARASITIC AGENTS/therapeutic use; CUBA.

Decocciones de Incienso ajeno (*A. Absinthium* L.; *Asteraceae* (*Compositae*), Verbena cimarrona (*Stachytarpheta jamaicensis* (L) Vahl.) y Apasote (*Chenopodium ambrosioides* Lin. (*Teloxys ambrosioides* (L.) W. A. Weber) son empleadas en la medicina tradicional cubana en trastornos digestivos, afecciones hepáticas, gastrointestinales; contra cólicos, diarreas, para combatir parásitos intestinales y como antiséptico; en su uso tópico para desinfectar heridas, entre otros usos.<sup>1</sup>

Como principios activos se reportan el aceite esencial *oleum absinthii* que encierra tuyaona, absentina, ácidos orgá-

nicos y taninos, flavonoides, saponósidos, esteroides, terpenoides, compuestos fenólicos, quinonas, ácido gamma butírico y cafeico y un heteróxido tóxico; la estaquitarfina. Compuestos como alcaloides, ácido clorogénico, dopamina, proteínas (enzimas), taninos y citrol y geraniol. También ascaridol; peróxido monoterpénico<sup>1-3</sup>. Muchos de estos productos secundarios, aislados de diversas plantas superiores han mostrado diferentes actividades *in vitro*.<sup>4-6</sup>

La riqueza de un país en plantas medicinales solo alcanza su verdadero valor cuando se da una correcta utilización de las mismas. En el presente trabajo se propuso evaluar la

<sup>1</sup> Máster en Ciencias. Investigadora Auxiliar.

<sup>2</sup> Investigadora Agregada.

<sup>3</sup> Licenciada en Microbiología.

actividad antimicrobiana y antiparasitaria de 3 especies cultivadas en Cuba, con vistas a validar su uso tradicional.

## Métodos

### PREPARACIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL

Se partió de material vegetal procedente de la Estación Experimental de Plantas Medicinales “Dr. Juan Tomás Roig”, provincia Habana. Los extractos se prepararon empleando el follaje de las plantas y como menstruo alcohol al 70 % P/V. Se utilizó el método de la repercolación con 4 extracciones, según lo descrito en NRSP-311 (Norma Ramal MINSAP 311. Procesos tecnológicos.

Medicamentos de origen vegetal. Extractos fluidos y tinturas C. Habana. Ed. MINSAP, 1992). Las especificaciones fueron las siguientes: extracto fluido de *A. Absinthium* L. (10,4 % de sólidos totales (ST) y un contenido alcohólico (CA) de 62,7 %, *S. Jamaicensis* (8,80 % de ST y un CA de 65,46 %) y *T. Ambrosioides* L. (6,65 % y un CA de 55,48 %).

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIGIARDIÓSICA

Se empleó el aislamiento C-5 de *G. Lamblia* obtenido en el laboratorio de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” y como medio de cultivo TYI-S-33 suplementado con 10 % de suero bovino. La concentración de trofozoitos fue ajustada entre  $1-2 \times 10^6$  cel/mL.

Una vez en contacto el parásito con la muestra, se incubó 48 h a 37°C y se procedió a evaluar la actividad anti giardiósica mediante el ensayo de producción de formazán, de forma similar a la descrita<sup>7</sup> pero empleando la sal de tetrazolio MTT. Las células fueron despegadas, centrifugadas y resuspendidas en buffer fosfato salino (PBS) glucosado. Se transfirió 1 mL a tubos eppendorf y adicionaron 300 µL de una solución de MTT de 1 mg/mL. Se incubó 3 h, centrifugó y resuspendió en 100 µL de isopropanol. Fueron adicionados en una microplaca de fondo plano, 100 µL por pocillo realizándose la lectura a 540 nm en un lector ELISA. Finalmente, se calculó el por ciento de inhibición de crecimiento, los resultado expresan la media aritmética de 2 ensayos en los que cada dilución fue realizada por triplicado.

Como droga de referencia se empleó metronidazol materia prima.

### EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Para evaluar la actividad antimicrobiana se empleó una batería integrada por 7 microorganismos controles:

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 7001, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10033, *Proteus vulgaris* ATCC 13315 y *Candida albicans* ATCC10231. A partir de cada uno de ellos se prepararon suspensiones que se incubaron hasta alcanzar la fase de desarrollo logarítmica, ajustándoseles la concentración al patrón 0,5 de la escala de Mc. Farland.

Se empleó el método de las diluciones seriadas dobles en medio caldo triptona de soya o caldo saboraud dextrosa.<sup>8</sup> Los tubos que contenían las diluciones de las muestras se enfrentaron a los microorganismos controles, incubándose a 37 °C y 28 °C respectivamente y determinándose la concentración mínima inhibidora del crecimiento (MCI) transcurridas 24 h en el caso de las bacterias y 48 h en el caso de la levadura. En aquellos casos donde se observó inhibición se tomaron alícuotas y se sembraron en medios agarizados específicos, libres del agente antimicrobiano. La menor concentración de la muestra capaz de producir un daño letal sobre la célula microbiana fue definida como la concentración bactericida o fungicida mínima (MBC o MFC). El inóculo empleado fue de  $10^5$  ufc/mL.

Para ambas actividades fue necesario realizar paralelamente una serie blanco empleando etanol al 63 %, 65 y 55 %, respectivamente.

## Resultados

Las tablas 1 y 2 muestran los resultados obtenidos en la evaluación anti giardiósica y antimicrobiana de los extractos, respectivamente.

**TABLA 1.** Actividad anti giardiósica demostrada en plantas con uso tradicional

<i>Artemisia absinthium</i> L. EF 70 %	
Concentración (mg/mL)	% Inhibición crecimiento
0,4	64,59
0,2	50,71
0,04	33,36
<i>Stachytarpheta jamaicensis</i> L. EF 70 %	
Concentración (mg/mL)	% Inhibición crecimiento
0,35	21,6
0,18	2,5
<i>T. ambrosioides</i> L. EF 70 %	
Concentración (mg/mL)	% Inhibición crecimiento
0,3	52,8
0,13	29,9
0,03	8,2

\* Los resultados son la media aritmética de 2 experimentos, en los cuales cada dilución fue realizada por triplicado.

**TABLA 2.** Actividad antimicrobiana demostrada en plantas con uso tradicional

Especie vegetal Microorganismos controles	<i>A. absinthium</i> EF 70 %		<i>S. jamaicensis</i> EF 70 %		<i>T. ambrosioides</i> EF 70 %	
	CMI*	CMM*	CMI	CMM	CMI	CMM
<i>E. coli</i>	13	26	ND	-	7,30	29,93
<i>P. vulgaris</i>	13	13	NE	-	NE	-
<i>P. aeruginosa</i>	6,5	13	ND	-	7,30	29,93
<i>K. pneumoniae</i>	6,5	26	ND	-	ND	-
<i>S. aureus</i>	13	26	9,9	19,8	7,30	7,30
<i>B. subtilis</i>	13	13	4,95	9,9	7,30	7,30
<i>C. albicans</i>	26	26	ND	-	7,30	7,30

CMI: concentración mínima inhibitoria

CMM: concentración mínima microbicida (bactericida o fungicida)

NE: no evaluada

ND: no detectada a las concentraciones evaluadas

\*: La CMI y CMM se expresan en mg/mL

#### *Artemisia absinthium L.*

Concentraciones del extracto superiores a 0,2 mg/mL produjeron más del 50 % de inhibición del crecimiento de *G. lamblia*, la mayor concentración de la droga empleada (0,4 mg/mL) produjo un 64,59 % de inhibición.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, los valores de MCI oscilaron en un rango desde 6,5 hasta 26 mg/mL. La acción del extracto fluido resultó ser microbicida sobre *P. vulgaris*, *B. subtilis* y *C. albicans*, esta última fue la más resistente.

#### *Stachytarpheta jamaicensis L.*

La mayor concentración del extracto empleada (0,35 mg/mL) produjo solo 21,6 % de inhibición de crecimiento de *G. lamblia*.

Los valores de MCI oscilaron entre 4,95 y 9,9 mg/mL, el extracto resultó activo solo sobre las especies Gram (+) empleadas (*B. subtilis* y *S. aureus*) y la acción bacteriostática.

#### *Teloxis ambrosioides L.*

La mayor concentración del extracto empleada (0,3 mg/mL) produjo más del 50 % de inhibición de crecimiento de *G. lamblia*. Los valores de MCI coincidieron para todas las especies microbianas las especies microbianas empleadas (7,30 mg/mL). La acción del extracto fue microbicida sobre las bacterias Gram (+) y la *C. albicans*. Así mismo bacteriostática sobre *E. Coli* y *P. aeruginosa*. El microorganismo más resistente resultó ser *K. Pneumoniae*.

## Discusión

Los resultados muestran una mejor actividad anti-giardíosis del extracto de *A. absinthium*, coincidiendo con un mayor contenido de aceite esencial. Extractos de esta especie inhibieron el crecimiento de *Naegleria fowleri* y *Giardia lamblia*.<sup>9,10</sup> una fracción de lactonas sesquiterpénicas (83 ug/mL) mostró una inhibición de 57 % empleando el método de conteo visual de parásitos.<sup>9</sup> lo que habla a favor de la actividad de este extracto. También se hizo evidente el potencial antimicrobiano, todos los microorganismos resultaron sensibles al extracto.

En muchos casos, la presencia de monoterpenos y sesquiterpenos en las distintas especies de *Artemisia* son la razón de su aplicación etnobotánica,<sup>11</sup> identificándose en *A. absinthium* diferentes compuestos en dependencia de su procedencia geográfica. En nuestra especie se reportan 4 lactonas sesquiterpénicas.<sup>1</sup> la caracterización química de este extracto mostró reacciones positivas a azúcares reductores, compuestos lactónicos, fenoles, aminas, quinonas triterpenos y esteroides, alcaloides, flavonoides, leucoantocianidinas y principios amargos.

Aunque se reporta que un consumo prolongado o una dosis muy alta de infusión o decocción provoca dependencia que se manifiesta por calambres, pérdida de conocimiento e incluso trastornos nerviosos irreversibles.<sup>12</sup> Estudios realizados recientemente revelan que el extracto evaluado no presenta toxicidad aguda oral (Comunicación personal Vega R., CIDEM), tampoco genotoxicidad (Comunicación personal Ramos A., CIDEM), lo que posibilitaría teniendo en cuenta estos resultados, su empleo en el desarrollo de fitofármacos.

Al referirse a *Stachytarpheta jamaicensis*, no contradice los resultados de actividad anti-giardíosis, el hecho de que

estudios preclínicos reporten actividad antidiarreica al disminuir la peristalsis intestinal. (Tramil 2. Investigaciones científicas y uso popular de plantas medicinales en el Caribe 1996:45-6). El tamizaje fitoquímico de la droga cruda mostró la presencia de azúcares reductores, saponinas, coumarinas, alcaloides, fenoles y taninos, entre otros relacionados con la actividad antiprotozoa de las plantas.<sup>5,6</sup>

Esta especie vegetal es reportada venosa en carneros.<sup>2</sup> Sin embargo, este extracto resultó no tóxico (Comunicación personal Vega R., CIDEM), tampoco mostró actividad genotóxica (Comunicación personal Ramos A., CIDEM); lo que posibilita teniendo en cuenta la farmacología demostrada disponer de una materia prima potencial para la elaboración de fitofármacos.

Aunque para los ensayos de actividad antiparasitaria se sugiere utilizar la muestra hasta en un 10 %, en este caso solo empleamos un 0,4 %, lo que habla a favor de la actividad anti-giardiasis de los extractos evaluados.

Quedó demostrada la actividad anti-giardiasis del extracto fluido con etanol al 70 % de *T. ambrosioides*, así mismo su potencial antimicrobiano. El tamizaje fitoquímico de la droga cruda mostró entre sus metabolitos triterpenos, fenoles y flavonoides, relacionados entre otros, con la actividad antiprotozoa de las plantas.<sup>5,6</sup> Se ha demostrado que el aceite volátil es eficaz contra aquilostomas y amebas intestinales<sup>13</sup> y que posee efecto antibacteriano y antifúngico.<sup>14</sup>

Pero no basta con que se halla comprobado el uso tradicional de una planta.

Otros aspectos deben ser analizados con detenimiento para proponer su uso en el uso de fitofármacos. Este extracto provocó en efecto tóxico en ratones, con una DL<sub>50</sub> igual a 975,49 mg/kg peso. (Comunicación personal Vega R., CIDEM). Así mismo los estudios tóxico genéticos demostraron una acción mutágena en el ensayo *in vitro* de AMES, no ocurriendo así *in vivo* (ensayo de micronúcleos) (Comunicación personal Vizoso A., CIDEM)

Se plantea que el aceite esencial de esta planta contiene ascaridol; peróxido monoterpénico; componente mayoritario y tóxico, por lo que está contraindicado en niños, embarazadas y pacientes con daños en la función hepática y en riñón. Produce náuseas, vómitos, depresión del sistema nervioso, trastornos visuales, lesiones hepáticas y renales, problemas cardíacos y respiratorios.<sup>3</sup> A altas dosis puede causar la muerte. Se reporta efecto antihelmíntico, antimalárico y carcinógeno (rata).<sup>15</sup>

## Conclusiones

Los extractos fluidos con etanol al 70 % de *A. absinthium* L., *S. jamaicensis* y *T. ambrosioides* mostraron tanto activi-

dad anti-giardiasis como antimicrobiana, lo que justifica su uso tradicional. No obstante, no siempre ello constituye una posibilidad real de su empleo en el desarrollo de fitofármacos.

## Agradecimientos

Agradecemos a Tania Brito Peña por la labor técnica desarrollada y a los especialistas que permitieron con su comunicación personal, una mejor discusión de estos resultados.

## Referencias bibliográficas

1. Roig JT. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. 2 ed. La Habana:Editorial Científico-Técnica, 1988:1125.
2. Cuba. Ministerio de Salud Pública. Fitomed II. Plantas medicinales. La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 1995:22.
3. Martindale AJ. The Extra Pharmacopeia. 29 ed. Londres: 1982.
4. Onawunmi GO, Yisak WA, Ogunlana EO. Antibacterial constituents in the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC). *Staft. J Ethnopharmacol* 1984;(12):279-86.
5. Wrigh CW, Phillipson JD. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother Res* 1990;4(4):127-37.
6. Phillipson JD, Wright CW. Antiprotozoal agents from plant sources. *Planta Med* 1991;(Supplement 1):57.
7. Wright CW, Melwani SI, Phillipson J, Warhurst DC. Determination of anti-giardial activity *in vitro* by means of soluble formazan production. *Transac R Soc Trop Med Hyg* 1992;86:517-9.
8. Vanden DB, Vlietinck AJ. Screening for antibacterial and antiviral agents from higher plants. *Methods Plant Biochem* 1991;6:47-69.
9. Torres D, Pérez Bossa M, Mendiola J, Hernández H. Sensibilidad de *Giardia lamblia* a extractos de *Artemisia abrotanum* y *A. absinthium*. *Rev Cubana Med Trop* 1993;45(3):170-2.
10. Mendiola J, Bossa M, Pérez N, Hernández H, Torres D. Extracts of *Artemisia abrotanum* and *Artemisia absinthium* inhibit growth of *Naegleria fowleri* *in vitro*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1991;85:78-81.
11. Mucciarelli M, Caramiello R, Maffei M, Chialva F. Essential oils from some *Artemisia* species growing spontaneously in North-West Italy. *Flavour Fragrance J* 1995;10:25-32.
12. Jan V, Jirí S. El gran libro de las plantas medicinales. 2 ed. Praga:SUSAETA, 1989:319.
13. Claus EP, Tyler E. Farmacognosia. La Habana: Editorial Ciencia y Técnica, 1970:533.
14. Farmacopea Caribeña. 1 ed. Sto. Domingo: Enda-Caribe, 1996:255.
15. Kapalin B. Carcinogenicity of Source from Medicinal Plants herbs in rats. *J Nat Cancer Inst* 1978;60:683-8.

Recibido: 26 de diciembre del 2000. Aprobado: 15 de enero del 2001. M.sc. *Marta Guerra Ordóñez*. Ave. 26 No. 1605 e/ Boyeros y Puentes Grandes. Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.