

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS DE HOJA DE MUÉRDAGO *PSITTACANTUS CALYCVLATUS*

Juan Manuel Ortega Cervantes (1), Varinia López Ramírez¹, Rosa María Adame Alvarez² y Elizabeth Quintana Rodríguez (2)

¹ [Ingeniería bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Irapuato] | Dirección de correo electrónico: [juanm_ocervantes@hotmail.com]

² [Ingeniería Genética, Laboratorio de ecología de plantas, Irapuato, CINVESTAV] | Dirección de correo electrónico: [lizquir@hotmail.com]

Resumen

Psittacanthus calyculatus es una planta hemiparásita que suele crecer en árboles como mezquite, huizache, durazno o pinos, especialmente en las regiones centrales de México (Guanajuato y Michoacán). Se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos provenientes de hoja de muérdago obtenidos a partir de los solventes: hexano, acetato de etilo y metanol contra una cepa bacteriana Gram negativa (no identificada) y contra una cepa Gram positiva (*Bacillus subtilis*). Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo el método de Kirby Bauer y por el método de dilución de caldo. Los resultados obtenidos por el método de Kirby Bauer fueron positivos para extracto obtenido con el solvente acetato de etilo contra la cepa Gram negativa, obteniendo un porcentaje de inhibición del 65%. Mediante el método de dilución de caldo se mostró el mismo efecto con el extracto de acetato de etilo. Al llevarse a cabo la separación del extracto mediante cromatografía líquida de capa fina (TLC) se encontró que una banda presentaba la actividad antimicrobiana. Al identificarse esta fracción se encontró que la molécula responsable de la actividad antimicrobiana podría ser el ácido benzoico 3,4,5-trihidroxi. Sin embargo, es necesario llevar a cabo la comparación con el estándar comercial. *B.subtilis* no fue inhibido con ninguno de los extractos probados pero eso no descarta la posibilidad que pueda ser inhibida por el extracto de muérdago obtenido con otro sistema de solventes.

Abstract

Psittacanthus calyculatus is an hemiparasite plant that usually grows on trees as mezquite, huisache, peach or pine. Usually, the hemiparasite plant is found in the central regions of Mexico (Guanajuato and Michoacan). The antimicrobial activity extracts from mistletoe leaves obtained with the solvents hexane, ethyl acetate and metanol were evaluated against the strain Gram negative (no identified) and a Gram positive bacteria (*Bacillus subtilis*). We probed two different types of inhibition tests, the Kirby Bauer inhibition and broth dilution method. The results in the Kirby Bauer inhibition were positives with ethyl acetate extract against the strain Gram negative, the percentage of inhibition was 65%. Equal results were found for broth inhibition method. Extract responsible of the inhibition was analyzed by thin layer chromatography (TLC), showing a fraction with antimicrobail activity. Recovered fraction was analyzed to identify the molecule responsible for the antimicrobial activity and it was found as possible molecule benzoic acid 3,4,5 – trihydroxy. Gram positive strain *B.subtilis* was not inhibited with tested extracts probed in this work.

Palabras Clave

Muérdago; Ácido benzoico; Antimicrobiano; Extracto; Inhibición

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido utilizadas desde la antigüedad debido a su gran riqueza metabólica [1]. Siendo la industria farmacéutica ampliamente favorecida por la obtención de diversos compuestos provenientes de plantas. Entre ellos compuestos con actividad antimicrobiana. Un agente antimicrobiano debe cumplir tres condiciones: poseer actividad antimicrobiana, funcionar a bajas concentraciones y ser tolerado por el huésped [1]. *Psittacanthus calyculatus* (*Pc*), es una planta hemiparásita mejor conocida en las regiones rurales como injerto o muérdago mexicano, es considerada por muchos como una molesta plaga debido a que termina secando los árboles que parasita. No obstante, ha sido utilizado en la medicina tradicional mexicana como remedio para prevenir infecciones cutáneas [2]. El muérdago europeo (*Viscum album*) y el muérdago africano (*Tapinanthus dodoneifolius*) suelen ser utilizados para tratamientos contra células cancerígenas. Los extractos provenientes de *Tapinanthus dodoneifolius* han mostrado una amplia gama de actividad antimicrobiana contra patógenos de humanos Gram positivos y Gram negativos importantes [3]. Existen diversas investigaciones alrededor de la taxonomía y fisiología de *Pc*, que nos permiten comprender de una mejor manera las formas de parasitismo y propagación de esta planta. Algunos reportes han mostrado componentes obtenidos de los extractos metanólicos de *Pc*, entre estos se ha encontrado el ácido gálico. Sin embargo, pocos han sido los estudios acerca de sus propiedades como agente antimicrobiano. En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos de hoja de muérdago *Psittacanthus calyculatus* contra cepas bacterianas gram negativa, así como una gram positiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se colectaron hojas de muérdago provenientes del huésped *Prosopis leavigata* en el mes de octubre del 2014, seleccionando solamente a aquellas que

no presentarán ningún tipo de daño. Las muestras fueron almacenadas a -4°C.

Las cepas bacterianas fueron proporcionadas por amablemente por la Doctora Varinia Ramírez López del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato. La cepa 23 son bacterias Gram negativas aún no caracterizadas e identificadas, y una cepa Gram positiva *Bacillus subtilis*. Se sembraron periódicamente en medio sólido LB e incubadas a una temperatura de 28°C.

Extracción Soxhlet

Para la extracción Soxhlet fueron molidas las hojas con nitrógeno líquido hasta formar un polvo fino de hoja. Posteriormente, la muestra se sometió a liofilización durante dos días. Para la extracción se utilizaron tres distintos solventes; metanol, acetato de etilo y hexano. Se llevó a cabo la extracción en un equipo Soxhlet con 6 unidades de extracción, a cada unidad se le agregó 100mL del solvente a utilizar y 5g de hoja liofilizada, la extracción se llevó a 68°C con una presión de 240mbar para cada solvente durante 1 hora. Una vez completado el proceso de extracción, los extractos fueron sometidos a evaporación en un rotavapor para concentrar el extracto, retirando la mayor cantidad posible de solvente. Los extractos obtenidos fueron refrigerados a -4°C y cubiertos para evitar su oxidación por luz.

Inhibiciones Kirby Bauer

Se elaboraron curvas de crecimiento para cada cepa bacteriana. Las cinéticas fueron elaboradas en medio Luria Bertani (LB) líquido, con un ajuste de densidad óptica de 0.5 y dejando un control libre de bacteria que fue tomado como blanco. Las mediciones de densidad óptica se llevaron a cabo en un espectrofotómetro GENESYS 6 con una longitud de onda de 600 nm. Las muestras estuvieron en agitación a 120rpm durante 24 horas a temperatura de 28°C, tomando lectura de la densidad óptica cada dos horas. Para la elaboración de los tapetes bacterianos se requirió un cultivo bacteriano en medio LB líquido ajustando a una concentración por medio de densidad óptica, de acuerdo a las curvas de crecimiento previamente realizadas. Para los ensayos de inhibición se esterilizaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro, se colocaron

sobre los tapetes bacterianos, colocando tres discos de papel filtro en tres filas a lo largo de la caja, colocando en la primer fila extractos obtenidos con hexano, acetato de etilo y metanol, en la segunda fila el primer disco de papel filtro fue tomado como control negativo, el segundo contenía gentamicina (8mg/mL) para bacterias Gram negativas o dicloxacilina (8mg/mL) para Gram positivas, en la última fila fueron colocados los controles los cuales fueron los solventes puros colocados en el mismo orden que la fila de los extractos. Se colocó en cada disco 10µL de los extractos y las placas fueron incubadas a temperatura de 28°C. Los halos de inhibición se midieron después de 24 y 96 horas de incubación, calculando el porcentaje de inhibición restando el diámetro de inhibición del extracto menos el diámetro de inhibición del solvente entre dos por cien.

Dilución de caldo

Se inocularon las cepas bacterianas en medio LB líquido con un ajuste de densidad óptica de 0.5. Se probaron diferentes concentraciones de los extractos, antibióticos y solventes para hacer las diluciones en el medio LB. Los tubos se incubaron a 28°C durante 16 horas a 120 rpm. Se tomó lectura de los tubos cada hora en un lector de placas con una longitud de onda de 600 nm. Se calculó la velocidad de crecimiento de cada curva mediante la modelación matemática de crecimiento microbiano.

Cromatografía de capa fina

Para la cromatografía de capa fina se seleccionó solamente aquel extracto que mostrará mayor actividad antimicrobiana. El extracto fue sometido a centrifugación durante 2 minutos a 10,000 rpm, para retirar el material vegetal. Se colocó una línea del extracto en placas de sílice gel G con ayuda de una regla de medida para placas de sílice gel y una jeringa capilar. El sistema de solventes utilizado fue (2:1) de hexano y acetato de etilo, siendo homogeneizados y vertidos en una cámara de cromatografía de capa fina. Una vez vertidos los solventes se colocó la placa de sílice gel con la línea del extracto dirigida a los solventes por 30 minutos para que las fases del extracto pudieran separarse. Una vez separadas las fases se vertió sobre la placa medio LB sólido inoculado

previamente con la bacteria y se incubó a 28° durante 24 horas. Se asperjó una solución de tetra sodio rojo como indicador de crecimiento bacteriano. Se cortó la banda de sílice donde se mostró inhibición, se disolvió la sílice con acetato de etilo grapo HPLC y se filtró obteniendo solamente la banda deseada. La muestra fue evaporada para retirar el solvente. Posteriormente, la muestra fue derivatizada con N,O-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) y piridina. La reacción se calentó a 80°C durante 30 minutos. La muestra tratada fue sometida a cromatografía de gases acoplado a masas para identificar la posible molécula con actividad antimicrobiana.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inhibición Kirby Bauer

Se encontró por el método de Kirby Bauer que el extracto con mayor porcentaje inhibición fue el extracto obtenido con acetato de etilo para la cepa Gram negativa (IMAGEN 1). Sin embargo, los extractos de hexano y acetato de etilo no presentaron alta actividad antimicrobiana. La cepa bacteriana de *Bacillus subtilis* no presentó inhibición por ninguno de los extractos. Posiblemente, utilizando otro sistema de solventes podríamos encontrar actividad antimicrobiana. Se ha reportado que los extractos acetónicos provenientes de *Tapinanthus dodoneifolius* muestran actividad antimicrobiana contra bacterias patógena de humanos como *S. aureus* [3].

Cepa	Porcentaje de inhibición					
	EH	EA	EM	G	C	D
23	0	65	0	10	0	X
<i>B. subtilis</i>	0	0	0	X	X	10 0

Tabla 1: Porcentaje de inhibición.

E: Extracto, H: hexano, A: Acetato de etilo, M: Metanol.

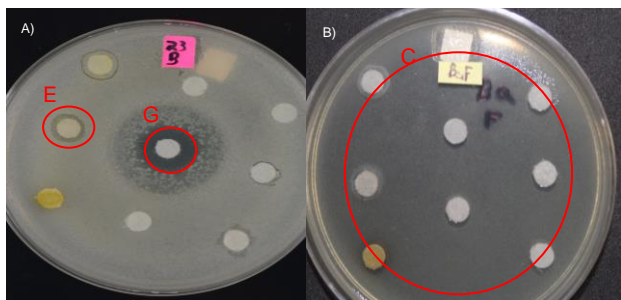


IMAGEN 1: A) Inhibición de la cepa 23. B) Inhibición de la cepa *B. subtilis*. La letra E es el halo de inhibición marcado por el extracto obtenido con acetato de etilo, la letra G muestra la inhibición marcado por la gentamicina, la letra C muestra la inhibición por el antibiótico dicloxacilina.

Dilución de caldo

En las diluciones de caldo, se encontró nuevamente para la cepa 23 que el extracto obtenido con acetato de etilo mostro actividad antimicrobiana (Figura 2). Se obtuvo una velocidad de crecimiento para el control de 0.1351 1/h mientras que la del extracto de acetato de etilo fue de 0.0184 1/h (IMAGEN 2 A). La bacteria Gram positiva no fue inhibida por ningún extracto.

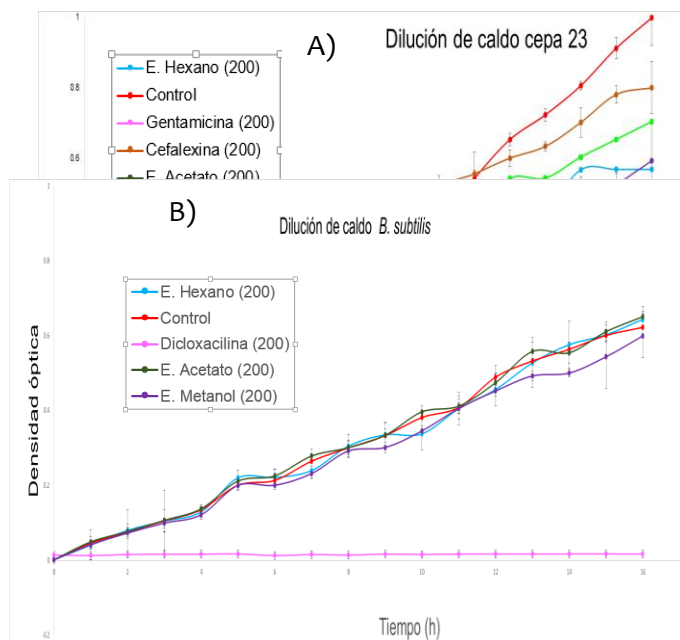


IMAGEN 2: A) Curvas de inhibición con diferentes tratamientos para la cepa 23. B) Curvas de inhibición con diferentes tratamientos para *B. subtilis*.

Cromatografía de capa fina

Al separarse las fases se observó inhibición bacteriana en la primer banda o línea de aplicación del extracto (Rf0), por lo que se dedujo que los compuestos que producen la inhibición son de naturaleza polar. La banda con actividad antimicrobiana analizada por cromatografía de gases mediante el uso de la biblioteca NIST dio como resultado el ácido benzoico 3,4,5 –trihidroxi. Cabe resaltar, que es necesario confirmar este resultado mediante la comparación con un estándar comercial. Sin embargo, este compuesto ha sido previamente reportado para *Pssithacanthus calyculatus* por Moustapha en el 2011, donde fue obtenido a partir de extractos etanólicos de hojas [4].

CONCLUSIONES

El extracto con mayor actividad antimicrobiana fue el obtenido a partir de acetato de etilo. La actividad antimicrobiana se mostró solamente para la bacteria Gram negativa, no así para la Gram positiva. Al llevarse a cabo la cromatografía de capa fina se encontró una banda con actividad antimicrobiana. Al identificarse se obtuvo como mayor molécula probable al ácido benzoico 3,4,5 –trihidroxi. El cual ha sido previamente reportado por estar presente en las hojas del muérdago mexicano.

REFERENCIAS

1. Paredes, F. and J.J. Roca, *Acción de los antibióticos: perspectiva de la medicación antimicrobiana*. Offarm: Farmacia y Sociedad, 2004. **23**(3): p. 116-124.
2. Collazo, I.V. and B. Geils, . *Psittacanthus in Mexico*. Notes: We recommend that you also print this page and attach it to the printout of the article, to retain the full citation information. This article was written and prepared by US Government employees on official time, and is therefore in the public domain. You may send email to rschneider@ fs. fed. us to request a hard copy of this publication. (Please specify exactly which publication you are requesting and your mailing address.) [Get Acrobat] Get the latest version of the Adobe Acrobat reader or Acrobat Reader for Windows

with Search and Accessibility Citation Collazo, I. Vázquez; Geils, BW 2002. Chapter 2. Psittacanthus in Mexico. In: Geils, Brian W.; Cibrián Tovar, Jose; Moody, Benjamin, tech. coords. Mistletoes of North American Conifers. Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-98. Ogden, UT: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, 2002.

3. Deeni, Y. and N. Sadiq, *Antimicrobial properties and phytochemical constituents of the leaves of African mistletoe (Tapinanthus dodoneifolius (DC) Danser) (Loranthaceae): an ethnomedicinal plant of Hausaland, Northern Nigeria*. Journal of ethnopharmacology, 2002. **83**(3): p. 235-240.

4. Moustapha, B., et al., *Chemical constituents of the Mexican mistletoe (Psittacanthus calyculatus)*. Molecules, 2011. **16**(11): p. 9397-9403.