

Actividad antimicrobiana *in vitro* de *Cedrela adorata* L. (cedro)

In vitro antimicrobial activity of *Cedrela adorata* L. (cedar)

MSc. Sonia Pereira Cabrera, MSc. Dalia Vega Torres, Dr. C. Manuel Almeida Saavedra, Dra. C. Galina Morales Torres, MSc. Yosvel Viera Tamayo, MSc. Yarima Sánchez García

Universidad de Granma. Bayamo, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la corteza del fuste de *Cedrela adorata* L. (cedro) es utilizada por la población para el tratamiento del asma, como vermífuga, antibacteriana, febrífuga y en cocimiento para dolores cuando se sufren caídas o golpes.

Objetivo: identificar los metabolitos secundarios presentes en esta parte de la planta y evaluar su posible actividad antibacteriana.

Métodos: se recolectó la corteza del fuste de *Cedrela adorata*. 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, acetato de etilo y agua. 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 estos presentan actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* sp., *Salmonella enterica* y *Enterobacter aerogene*; destacándose los resultados obtenidos frente al *Staphylococcus aureus*, para el extracto hexánico de cedro. En estos extractos están presentes en mayor proporción alcaloides, triterpenos o esteroides, y quinonas, que son los responsables de esta actividad, lo cual se logró corroborar con la identificación de estos metabolitos secundarios mediante la cromatografía de capa fina y el tamizaje fitoquímico realizados.

Conclusiones: mediante la cromatografía de capa fina y el tamizaje fitoquímico de los extractos se identificaron alcaloides, triterpenos o esteroides, y quinonas, que pueden ser los responsables de la actividad antibacteriana.

Palabras clave: *Cedrela adorata*, tamizaje fitoquímico, extractos, cromatografía de capa fina, uso terapéutico.

ABSTRACT

Introduction: the stem bark of *Cedrela adorata* L. (cedar) is used by the population to treat asthma, as vermifuge, antibacterial and febrifuge, and in the form of decoction to relieve the pain caused by falls or bumps.

Objective: identify the secondary metabolites present in this part of the plant and evaluate their potential antibacterial activity.

Methods: stem bark from *Cedrela adorata* was 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, ethyl acetate and water. The extracts underwent phytochemical screening, microbiological assays and thin-layer chromatography.

Results: *in vitro* tests of the extracts obtained from the 20% tincture showed antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* sp., *Salmonella enterica* and *Enterobacter aerogen*. Antibacterial activity of the hexanic cedar extract against *Staphylococcus aureus* was noteworthy. Alkaloids, triterpenes or sterols, and quinones, which are found in a large proportion in the extracts, are responsible for the above-mentioned antibacterial activity. Identification of these secondary metabolites was confirmed through thin-layer chromatography and phytochemical screening.

Conclusions: the alkaloids, triterpenes or sterols, and quinones potentially responsible for antibacterial activity were identified through thin-layer chromatography and phytochemical screening.

Key words: *Cedrela adorata*, phytochemical screening, extracts, thin-layer chromatography, therapeutic use.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, la medicina herbaria es una de las formas más antigua conocida del cuidado médico y ha sido utilizada por todas las culturas.¹ Dado el rechazo mundial que están teniendo los productos sintéticos medicinales en la actualidad, por las reacciones adversas que provocan en los pacientes, lo cual unido a la contaminación ambiental que genera su fabricación, esto hace que los científicos y el personal médico acuda a los productos naturales obtenidos a partir de plantas medicinales, para enfrentar los retos que demanda el combate de las enfermedades principales que atacan a la población en los diferentes países.

En Cuba, esta rama de la medicina tradicional se ha comenzado a desarrollar, revalorizando el uso y la producción de las plantas medicinales. Los primeros pasos hacia la utilización de estas plantas y con el fin de contribuir a la industrialización se dieron a conocer por el insigne botánico Juan Tomás Roig.²

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 Meliáceas que han sido estudiadas en busca de alternativas naturales para tratar algunas enfermedades. Específicamente *Cedrela adorata* L. ha sido ampliamente utilizada por la población cubana en la cura de diferentes afecciones, por tanto, resulta de interés comprobar la acción antibacteriana *in vitro* de los distintos extractos obtenidos y realizar estudio por cromatografía de capa fina de las fracciones alcanzadas, dirigido al conocimiento de las principales familias de metabolitos secundarios presentes que sean de interés biológico.

MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal se adquirió en la época de primavera mediante la recolección al azar de la corteza del fuste de la *Cedrela adorata*, cultivada en los terrenos de la Granja "Antonio Maceo", del municipio Bayamo, provincia de Granma. Universidad de Granma. La planta fue identificada en el Departamento de Ingeniería Forestal de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma, se herborizó un ejemplar representativo y se depositó en esta dependencia con la identificación UDG C 005.

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 a diario durante 7 días; luego se sometió a temperatura de 60 °C durante 1 h en estufa (MWN, Alemana) con circulación de aire. Seguidamente se procedió a su pulverización, usando un molino de cuchilla. Se obtuvo un polvo grueso que fue utilizado en la elaboración de los diferentes extractos y tinturas.⁴

Preparación de extractos vegetales y fraccionamiento

Las tinturas al 20 % se obtuvieron por maceración de la droga pulverizada durante 7 días,⁴ empleando agitador mecánico o saranda (ILM tipo THYS 2, Alemana).

Las tinturas obtenidas de la corteza del fuste del cedro se concentraron en evaporador rotatorio hasta un volumen de 100 mL y se fraccionaron sucesivamente (30 x 30 mL) con n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y agua, 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 para la determinación de los diferentes metabolitos secundarios.

Evaluación de la actividad antibacteriana

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.⁶

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 cepas salvajes de *Salmonella enterica*, *Shigella* sp. y *Enterobacter aerogenes*, aisladas en el Centro de Higiene y Epidemiología de Manzanillo, Granma, de pacientes con afecciones gastrointestinales.

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 semi-preparativas 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).^{5,7}

Sistema de solventes utilizados:

A₁ (5:1), tolueno:acetato de etilo.

B₁ (2:1:1), B₂ (1:2:2), tolueno:acetato de etilo:metanol.

C₁ (9:1) cloroformo:metanol.

RESULTADOS

Para realizar la evaluación antibacteriana se utilizó una concentración final de 400 µg/disco (tabla 1). El control positivo presenta halos de inhibición entre 15 y 21 mm de diámetro, que según la tabla de clasificación de la susceptibilidad de los microorganismos, publicada por el CLSI, las cepas de *Escherichia coli* (ATCC), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC), *Salmonella* sp. y *Staphylococcus aureus* (ATCC) son susceptibles (S), mientras que las cepas de *Shigella* sp. tienen sensibilidad intermedia (I).

Tabla 1. Resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos

Extractos	Halos de inhibición (mm)					
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterobacter aerogene</i>	<i>Shigella sp.</i>	<i>Salmonella enterica</i>
Tintura 20 %			10			
Seco			9			
Hexánico	-	-	12 ^b		-	
Clorofórmico	7	-	7 ^b		-	-
Acetato de etilo			8 ^b			
Acuoso	-		6 ^b		-	6
Cloranfenicol	22	17	21 ^a	15	16	19

Letras diferentes demuestran diferencia significativa.

Tamizaje fitoquímico y cromatografía de capa fina de los extractos obtenidos a partir de la corteza del fuste de cedro

A la tintura obtenida de la corteza del fuste del cedro, se les realizaron extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente: n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y agua. A estas extracciones se les realizó el tamizaje fitoquímico con el objetivo de identificar aquellos metabolitos que tienen propiedad antibacteriana y para corroborar su presencia se empleó la cromatografía de capa fina, sin revelador químico a $\lambda = 365$ nm. Los resultados se muestran en la figura y en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de la corteza del fuste del cedro

Ensayo (metabolitos)	hexánico	cloroformo	acetato de etilo	acuoso
FeCl ₃ (fenoles/taninos)	+	+	+	+
Mayer (alcaloides)	++	+	+	-
Baljet (coumarinas)	+	+	+	+
Shinoda (flavonoides)	+	+	+	+
Wagner (alcaloides)	++	+	+++	-
Bortrager (quinonas)	+++	+	+	+
Liebermann-Burchard (triterpenos o esteroides)	++	+++	-	-

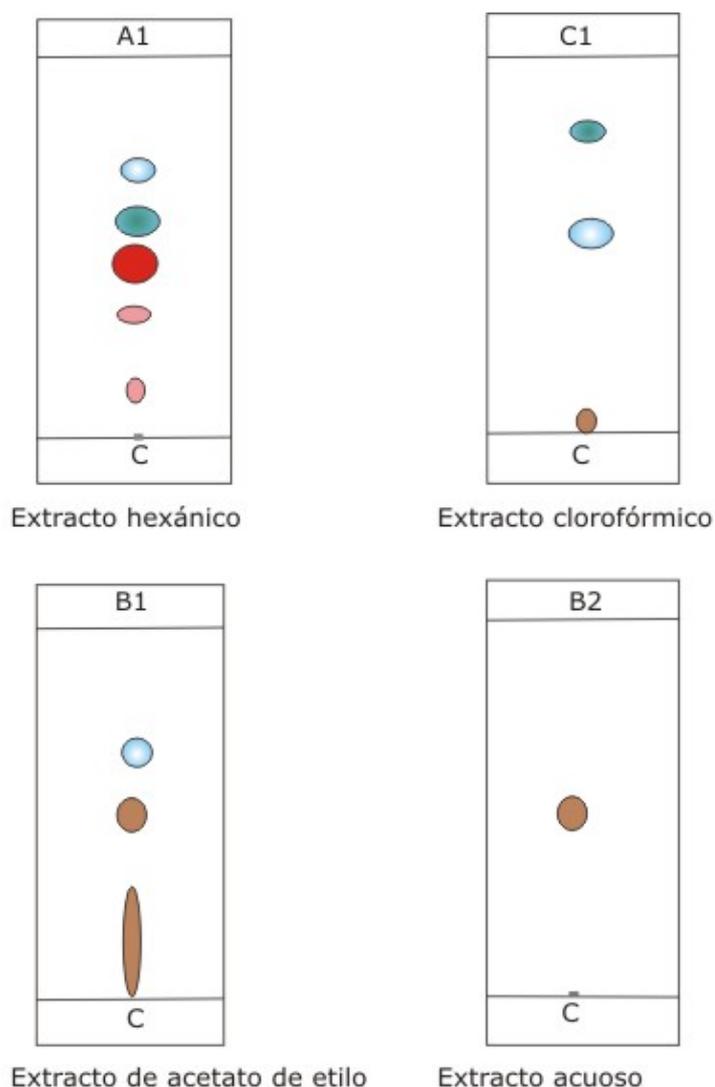


Fig. Cromatografía de capa fina.

Tabla 3. Cromatografía de capa fina de los extractos obtenidos de la corteza del fuste de cedro

Puntos	hexánico		clorofórmico		acetato de etilo		acuoso	
	Rf Sistema A1	UV $\lambda= 365$ nm	Rf Sistema C1	UV $\lambda= 365$ nm	Rf Sistema B1	UV $\lambda= 365$ nm	Rf Sistema B2	UV $\lambda= 365$ nm
1	0,10	Rosado	0,03	Marrón	-	Marrón	0,41	marrón
2	0,36	Rosado	0,29	Blanco-azulada	0,38	Marrón		
3	0,50	Rojo	0,48	Azul fluorescente	0,54	Blanco-azulada		
4	0,58	Fluorescente azul-verdosa						
5	0,71	Blanco-azulada						

DISCUSIÓN

En la tabla 1 se muestran los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana de los diferentes extractos obtenidos a partir de la corteza del fuste de cedro, frente a 6 cepas. Se puede observar que todos los extractos presentan actividad frente a determinados microorganismos, en algunos casos con halos de inhibición entre 6 y 8 mm. Los resultados más significativos son los obtenidos para la tintura, los extractos seco y hexánico que tienen una mayor actividad antibacteriana frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC); con halos de inhibición de 10, 9 y 12 mm de diámetro, respectivamente, que son superiores en comparación con el resto.

Se realizó una comparación de los halos de inhibición de estos extractos y el antibiótico comercial frente a *Staphylococcus aureus* 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,⁸⁻¹⁰ que emplearon concentraciones superiores a las nuestras.

Por lo antes expuesto, se puede plantear que los resultados de este trabajo son muy promisorios, por cuanto a concentraciones tan bajas como 0,4 mg/disco se obtienen halos de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

En la tabla 2 se puede observar que para el extracto hexánico los alcaloides, y triterpenos o esteroides, y quinonas, son más abundantes que los taninos, flavonoides y coumarinas.

En el extracto clorofórmico se observa que los alcaloides están en mayor concentración que los triterpenos o esteroides, taninos, flavonoides, coumarinas y quinonas.

En el extracto de acetato de etilo no hay presencia de triterpenos o esteroides, los alcaloides están en mayor concentración y los demás metabolitos en estudio están presentes en cantidades normales.

En el extracto acuoso, no hay presencia de alcaloides y triterpenos o esteroides, y están presentes taninos, flavonoides, coumarinas y quinonas, en cantidades normales.

Como se ha podido observar, los metabolitos responsables de la actividad antibacteriana son los alcaloides, triterpenos o esteroides, y quinonas; los cuales se concentran en el extracto hexánico y son de baja polaridad.

Es de destacar que los compuestos químicos pertenecientes a la familia de los triterpenos o esteroides, y alcaloides, son los más abundantes en los extractos de la planta estudiada, por lo que es posible que estas familias de compuestos químicos sean las principales responsables de la actividad antiestafilocócica.

Como se puede observar en la tabla 3 y la figura. Para el extracto hexánico se detectan 5 manchas, 2 rosadas y 1 roja (quinonas),^{5,11} 1 fluorescente blanco-azulada (taninos, alcaloides y triterpenos o esteroides)^{5,12} y una fluorescente azul-verdosa que puede ser flavonoides y coumarinas;^{5,11} es posible que la actividad antibacteriana de este extracto esté determinada por las quinonas. El extracto clorofórmico muestra 3 manchas, una fluorescente blanco azulada (taninos, alcaloides y triterpenos o esteroides),^{12,13} una marrón (quinonas y coumarinas)^{5,13} y una fluorescente azul-verdosa que puede ser flavonoides y coumarinas.^{5,13} En este extracto la actividad antibacteriana es pequeña y puede estar determinada por los triterpenos o esteroides, que son los que se encuentran en mayor proporción. Para el extracto acetato de etilo se detectaron 3 manchas, una fluorescente blanco-azulada (taninos y alcaloides),^{5,12} y 2 marrón que pueden ser quinonas y coumarinas.^{5,13} En este extracto la actividad antibacteriana es pequeña y está determinada por las quinonas, y para el extracto acuoso solo se observa una mancha de color marrón (quinonas y coumarinas).^{7,12}

Como se ha podido observar, los metabolitos responsables de la actividad antibacteriana se concentran en el extracto hexánico, que son las quinonas, los alcaloides, y triterpenos o esteroides.

Los resultados de los ensayos antimicrobianos del extracto hexánico del cedro, se deben probablemente a la presencia de principios activos con propiedades farmacológicas semejantes, o a un sinergismo de los constituyentes.

Los resultados coinciden con los reportados en otras investigaciones en donde se ha comprobado la acción antibacteriana de estos metabolitos.¹¹⁻¹³ No obstante, no fue posible establecer una clara relación entre el halo de inhibición y un tipo de constituyente en particular.

Todos estos resultados constituyen hasta la fecha el primer reporte fitoquímico de estas especies y de la actividad antibacteriana *in vitro*.

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. Cuba. Ministerio de Salud Pública. NRSP No. 311. Medicamentos de origen vegetal: extractos fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos. 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): UTP. ISSN 0122-1701. Colombia). p. 97-102. [citado 20 Nov 2009]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/849/84903323.pdf>
6. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Disk Diffusion Supplemental Tables. M100-S17 (M2). CLSI: Wayne Pa; 2007.

7. 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
8. Bhandari D, Nath G, Ray A. Antimicrobial activity of crude extracts from *Berberis asiatica* stem bark. *Pharmaceutical Biology*. 2000;38(4):254-7.
9. Mothana R, Lindequist U, Gruenert R, Bednarski P. Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. *BMC Complementary and Alternative Medicine* [*On-line*], Abril 2009 [citado 1 Abr 2010];9:7. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/9/7>
10. 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*], 2006 October17 [citado 1 Abr 2010];6:35. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/6/35/prepub>
11. Fuertes C, Roque M, Tristan M. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* con actividad antibacteriana y antifúngica. *Rev Ciencia e Investigación* [*on-line*].1998 [citado 20 Nov 2009];18(2). Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/.../flavonoides.htm>
12. Revelamiento fitoquímico de especies vegetales utilizadas en la medicina popular. Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales. Facultad de Química. 2001 [citado 20 Nov 2009]. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/.../7/T-ESPE-025143-7.pdf>
13. Rios MY, Aguilar-Guadarrama AB. Alcaloides indólicos, terpenos, esteroides y flavonoides de las hojas de *Hamelia patens* Jacquin (Rubiaceae). *Rev Cubana Plant Med* [revista en la Internet]. 2006 Abr [citado 31 May 2013];11(1). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962006000100006&lng=es

Recibido: 28 de marzo de 2012.
Aprobado: 30 de mayo de 2013.

Sonia Pereira Cabrera. Centro de Estudio de Química Aplicada. Facultad de Ciencias Técnicas. Universidad de Granma. Bayamo, Cuba. Correo electrónico: spereirac@udg.co.cu