

Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de extractos de *Bryophyllum pinnata*.

Lic Dailé Dolores Cabrera Rodríguez¹, MsC Yarima Sánchez García³, Lic Daramys Guerra Sánchez², MsC Ángel Luís Espinosa Reyes⁴, DrC. Manuel Almeida Saavedra³.

¹Departamento Biología Agrícola. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma, Km 17½ carretera a Manzanillo. Peralejo. Bayamo. Granma. Cuba, CP 85100.

²Departamento Forestal. Facultad de Ciencias Agrícolas.

³Centro de Estudios de Química Aplicada.

⁴Departamento de Ciencias Básicas.

E-mail: dcabrerar@udg.co.cu

Recibido; 16 / 03 / 2011

Aceptado: 4 / 04 / 2011

Resumen

En esta investigación se obtuvieron los extractos etéreo, alcohólico, acuoso, la tintura al 20% y su extracto seco a partir de las hojas de *Bryophyllum pinnata* (siempreviva). Se realizó el tamizaje fitoquímico de cada extracto determinándose que los metabolitos secundarios predominantes son las quinonas y los alcaloides. Se evaluó la actividad antibacteriana de la tintura al 20% y de su extracto seco frente a cepas de: *Escherichia coli* (ATCC 113-3), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14207) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 15008), mediante el método de difusión en agar, destacándose los resultados obtenidos frente al *Staphylococcus aureus*.

Palabras Claves: *Bryophyllum pinnata*, tamizaje fitoquímico, extractos vegetales, metabolitos secundarios, plantas medicinales.

Phytochemical screening and antibacterial activity of extracts of *Bryophyllum pinnata*.

Summary

In this investigation the ethereal, alcoholic and watery extracts were obtained, a 20% dye and its dry extract starting from the leaves of *Bryophyllum pinnata* (siempreviva). It was carried out the phytochemical screening of each extract being determined that the predominant secondary metabolites is the quinones and the alkaloids. The antibacterial activity was evaluated from the 20% dye and its dry extract in front of stumps of: *Escherichia coli* (ATCC 113-3), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14207) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 15008), by means of the diffusion method in agar, standing out the results obtained in front of the *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Bryophyllum pinnata*, phytochemical screening, extracts, secondary metabolites, medicinal plants.

Introducción

Desde tiempos remotos el hombre ha utilizado las plantas para satisfacer sus necesidades más elementales, como la alimentación, la salud y sus creencias religiosas. Estos conocimientos han llegado a través de los años a las nuevas generaciones por medio de la transmisión oral.

La milenaria experiencia sobre el uso de las plantas enseña que la efectividad no depende exclusivamente del producto; es decir, no solo de los principios activos según la Química, sino también, de su preparación y posibles combinaciones.

En la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, sin embargo la ciencia moderna analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las mismas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades para agruparlas por efectos similares, conocer los principios activos responsables de aliviar o curar enfermedades, aislarlos de las plantas, determinar su estructura química, sintetizarlos, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y, finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios¹.

La *Bryophyllum pinnata*, vulgarmente conocida como: siempreviva, inmortal, flor de aire, hoja del aire, hoja de bruja y prodigiosa, forma parte de la familia *Crassulaceae* y es originaria de Madagascar^{2,3}. Es un arbusto de gran resistencia, capaz de sobrevivir en condiciones adversas y en lugares inhóspitos. Posee reconocidas propiedades curativas, por lo que ha sido utilizada para el tratamiento de diversas enfermedades⁴.

En esta planta han sido comprobadas múltiples propiedades medicinales. Se han determinado propiedades antiinflamatorias, antihistamínicas, cicatrizantes, analgésicas y beneficiosas para el buen funcionamiento del sistema digestivo.

En forma externa, el jugo de las hojas se usa como ungüento contra hinchazones, tumores, abscesos, quemaduras, heridas de difícil tratamiento y también como colirio.

Entre los componentes activos presentes en esta planta se encuentran fenoles, flavonoides y ácidos como: acético, málico, cítrico, isocítrico, láctico, fumárico, oxálico y succínico. La planta presenta un alto contenido de calcio y cloro. Contiene además b-citosterol, mucílago, briofilina, polisacáridos, taninos, vitamina P y minerales como aluminio, hierro, magnesio, manganeso, cobre y silicio.

Al jugo de las hojas le son atribuidas propiedades antibacterianas y antifúngicas³, las cuales aún no han sido comprobadas. Atendiendo a todo lo anteriormente planteado en el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de extractos de hojas de *Bryophyllum pinnata* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Materiales y métodos

El material vegetal consistió en hojas de *Bryophyllum pinnata*, recolectadas en época de primavera. Su identificación fue confirmada en el Laboratorio de Botánica de la Universidad de Granma. El material vegetal fue secado a la sombra a temperatura

ambiente y extendido en bandejas perforadas, volteándose diariamente durante 7 días, luego se sometió a calentamiento de 60°C durante una hora en estufa con circulación de aire marca WSU 400 de fabricación alemana. Terminado este proceso de secado se procedió a la pulverización de las hojas hasta obtener un polvo grueso (1 mm de diámetro aproximadamente) que se empleó en la elaboración de los extractos.

Para la obtención de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso, se realizaron extracciones sucesivas con estos solventes en orden creciente de polaridad con la finalidad de lograr un mayor agotamiento de la sustancias en el material vegetal seco.

Se utilizaron 20 g del polvo grueso crudo por cada 200 ml de menstuo fresco. La extracción se realizó por maceración de la droga pulverizada, por un tiempo de 48 horas, según Norma Ramal de Salud Pública 311, la Norma Cubana de Salud Pública 313 y el Programa de Medicina Tradicional y Natural^{5,6,7}.

La obtención de la tintura al 20% se realizó según la Norma Ramal de Salud Pública 311⁵.

Los extractos secos fueron obtenidos a partir de la tintura al 20% por el siguiente procedimiento: 100 mL de tintura al 20% se pasaron a un balón previamente tarado y se rotaevaporaron al vacío hasta obtener una masa consistente, la cual fue secada en una estufa MLW de fabricación alemana, con circulación de aire a 40°C, finalmente el extracto fue triturado en un mortero y preservado en frasco ámbar.

El tamizaje fitoquímico se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales del Centro de Estudio de Química Aplicada de la Universidad de Granma mediante la adaptación de la metodología de trabajo reportada por Payo, Sandoval y Peña^{8, 9,10}. Se emplearon técnicas simples, rápidas y selectivas para la determinación cualitativa de cada familia de compuesto. Se le realizaron a cada extracto los ensayos específicos para los metabolitos secundarios que de acuerdo a su solubilidad podían haber sido extraídos con cada solvente^{11,12}.

Los ensayos realizados con los diferentes extractos fueron:

Extracto etéreo: alcaloides, coumarinas y ácidos grasos

Extracto etanólico: resinas, triterpenos y/o esteroides, saponinas, aminoácidos libres, alcaloides, coumarinas, carbohidratos reductores, fenoles y/o taninos, quinonas, flavonoides, antocianidinas.

Extracto acuoso: saponinas, carbohidratos reductores, flavonoides, fenoles y/o taninos, alcaloides, principios amargos, mucílagos.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizaron los extractos secos (400 µg/disco) y la tintura al 20%, se empleó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco (*Bauer-Kirby*) con algunas modificaciones. Este método fue adoptado por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) como norma de aceptación general

Se aplicaron 8 µl en discos de papel de filtro (pb, SA, Brasil) de 6 mm de diámetro para una concentración final de 400 µg/disco de extracto seco. Una vez cargados los discos con cada una de las soluciones se dejaron secar a 50°C por 15 min antes de dispensarlos en las placas inoculadas. Dada la viscosidad del DMSO y sus características físico-químicas no se logró la evaporación del solvente.

Como control negativo se emplearon discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro cargados con 8 µl de etanol al 70 % y DMSO para la tintura y el extracto seco respectivamente, que fueron los solventes empleados en la preparación de las soluciones a evaluar.

Las cepas utilizadas en el ensayo de actividad antibacteriana son 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 y se relacionan a continuación: *Escherichia coli* (ATCC 113-3), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC) y *Staphylococcus aureus* (ATCC).

La inoculación en las placas de agar y la dispensación de los discos de antibióticos se realizó con un hisopo estéril y se llevó a la suspensión, se eliminó el exceso de líquido presionando y rotando el hisopo sobre las paredes del tubo por encima del nivel del líquido. Se estrió la superficie del medio agar Mueller-Hinton, contenido en placas petri (Anumbra, China) de 90 mm de diámetro, en tres direcciones con 60° de diferencia entre ellas para obtener una siembra uniforme en césped. Se dejó secar la placa de 3-5 min. Posteriormente se depositaron los discos de antibióticos en la placa petri, inoculada con la suspensión bacteriana, empleando una pinza (Bochem Stainless, Inglad) estéril. Los discos se colocaron a una distancia no menor de 10 mm del borde de la placa y una separación entre ellos no menor de 30 mm para evitar la superposición de los halos de inhibición. Las placas se incubaron a 35 ± 2°C por un período de 16-18 h en una incubadora (Sartorius, China). Como controles positivos se utilizaron amikacina y kanamicina

Los resultados se expresaron como el diámetro del halo de inhibición del crecimiento, expresado en mm.

Resultados y Discusión

Tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico, acuoso, seco y tintura 20 % de *Bryophyllum pinnata*.

Las propiedades farmacológicas de los extractos naturales obtenidos de plantas medicinales dependen de la composición de metabolitos secundarios y de la concentración de los mismos.

En la tabla 1, se muestran los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos y tinturas de hojas de *Bryophyllum pinnata*.

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo, etanólico y acuoso, la tintura al 20% y su extracto seco

Metabolito	Etéreo	Etanólico	Acuoso	Tintura (20%)	Extracto Seco
Saponinas	•	+	-	+	+
Flavonoides	•	+	-	-	+
Aminoácidos libres	•	+	•	+	+
Quinonas	•	+++	•	+++	-
Triterpenos y/o Esteroides	•	+	•	+	-
Coumarinas	+	+	•	+	+
Fenoles y/o Taninos	•	+	•	+	+
Resinas	•	-	•	-	-
Antocianidinas	•	+	•	+	+
Carbohidratos reductores	•	+	-	+	+
Mucílagos	•	-	+	•	•
Alcaloides	-	+++	-	+++	+
Ácidos grasos	+	•	•	•	•

Leyenda: (-) => Ausencia (+) => Presencia (++) y (+++) => Abundante (•) => No realizado

Como puede observarse existe una alta diversidad de familias de compuestos químicos en las hojas de esta planta. Cuando se realiza la extracción alcohólica se logra una mayor diversidad de compuestos en comparación con los extractos etéreo y acuoso, resultado que indica que este solvente es el más promisorio para extraer la mayoría de los metabolitos secundarios, lo cual concuerda con los resultados prácticos obtenidos por diferentes investigadores.

Se puede apreciar en el extracto etanólico y la tintura una abundante presencia de quinonas y alcaloides, metabolitos que podrían ser los responsables de las propiedades medicinales atribuidas a esta planta.

Se comprueba además, que no hay presencia de resinas. Un aspecto importante es que la composición de los metabolitos es prácticamente la misma en la tintura y el extracto seco, a excepción de las quinonas y de triterpenos y/o esteroides, que se encuentran en la tintura y no en el extracto seco, esto pudiera estar dado a la descomposición de estas sustancias durante la obtención del extracto seco.

Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto seco y la tintura al 20% de *Bryophyllum pinnata*

En la tabla 2 se muestran los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos secos y la tintura al 20% de hojas de *Bryophyllum pinnata* (Siempre viva) frente a 3 cepas bacterianas. Los controles positivos presentaron halos de inhibición entre 18-23 mm de diámetro para todas las cepas evaluadas excepto para la Kanamicina frente a *P. aeruginosa* donde el resultado que se obtiene es negativo, lo cual coincide con lo establecido en la tabla de clasificación de la susceptibilidad de los microorganismos, publicada por el CLSI¹³, donde se especifica que las tres cepas bacterianas evaluadas son susceptibles (**S**) a la Amikacina, para la Kanamicina se reporta que la *Escherichia coli* (ATCC 113-3) y el *Staphylococcus aureus* (ATCC) son susceptibles (**S**), mientras que la *Pseudomona aeruginosa* (ATCC) es resistente (**R**) a este antibiótico.

Puede observarse además, que el extracto seco a 400 µg/disco y la tintura al 20% mostraron actividad antibacteriana sólo frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC), con halos de inhibición de 7 y 9 mm de diámetro respectivamente. Estos resultados y la ausencia de halos de inhibición alrededor del disco conteniendo DMSO y etanol al 70 % (controles negativos), sugieren que las hojas de la *Bryophyllum pinnata* (Siempre viva) poseen metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.

Tabla 2. Resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana de la tintura al 20% y el extracto seco de *Bryophyllum pinnata*.

Muestras	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
	<i>S. aureus</i> (ATCC)	<i>P.aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 113-3)
Extracto seco (400 µg/disco)	7	-	-
Tintura 20%	9	-	-
Amikacina	18	18	23
Kanamicina	18	-	23
Etanol 70 %	-	-	-
DMSO	-	-	-

Se pudo constatar una pequeña diferencia entre los valores de los halos de inhibición del extracto seco y la tintura al 20 %, esto pudiera ser debido a que la tintura al 20 % presenta en su composición quinonas, las cuales están ausentes en el extracto seco, por lo cual la tintura contiene una mayor concentración de los metabolitos con actividad antibacteriana.

Los resultados obtenidos son importantes por cuanto hay que tener en cuenta la diferencia de concentraciones de los principios activos entre los discos de antibióticos comerciales y los que contienen los extractos secos y la tintura al 20 %. En este sentido, los discos comerciales contienen el principio activo con altos niveles de pureza en tanto que

para los discos de papel de filtro que contienen los extractos vegetales las concentraciones empleadas se refieren a la masa de sustancias solubles en el solvente empleado. Para lograr mejores resultados, se debe trabajar en el aislamiento y purificación de los principios activos y probar su verdadero potencial antibacteriano.

En un estudio realizado por Kaur y Arora, Guerra^{14, 15}, con tres especies vegetales (*Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* y *Trachyspermum ammi*) determinaron y aislaron los componentes fitoquímicos de estas plantas y realizaron la evaluación de la actividad antibacteriana de ellos frente a *Staphylococcus aureus* y otras cepas de interés clínico. Estos autores demostraron que las saponinas, fenoles y/o taninos, glucósidos cardiotónicos y alcaloides eran responsables en alguna medida de las propiedades antibacterianas de los extractos de las plantas evaluadas. Estos autores demostraron que frente a *Staphylococcus aureus* sólo las saponinas fueron efectivas. En este sentido es probable que en esta investigación se diera un fenómeno similar aunque se sabe que las familias químicas están representadas por compuestos disímiles en familias botánicas diferentes e incluso en especies diferentes de un mismo género.

Referencias Bibliográficas

1. Granda M., Fuentes V., Acosta L., Cabrera I. 1988. Sustancias biológicamente activas. En: Plantas medicinales I. La Habana: CIDA; V,4 -7.
2. Roig, JT.1988. Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba, Editorial Científico-Técnica, La Habana, 839.
3. http://www.linneo.net/plut/B/bryophylum_pinnata/bryophylum_pinnata.htm Consultado el 05/06/10.
4. http://es.wikipedia.org/wiki/Kalanchoe_pinnata#Propiedades Consultado el 05/06/10.
5. Norma Ramal de Salud Pública 311 (1998). Medicamentos de origen vegetal: extractos fluidos y tinturas. Procesos tecnológicos. La Habana, Cuba.
6. Norma Cubana Salud Pública 313 (1998). Métodos de ensayos a partir de drogas crudas. Salud Pública. La Habana, Cuba.
7. Programa Nacional de Medicina Tradicional y Natural (1999). Ministerio de Salud Pública. La Habana, Cuba.
8. Payo A., Oquendo M., Oviedo R. 1996. Tamizaje fitoquímico preliminar de plantas que crecen en Sierra de Nipe, Holguín. Revista Cubana de Farmacia: 30 (2): 120-31.
9. Sandoval D., López D., Oquendo. 1990. Estudio fitoquímico preliminar de detección de alcaloides y saponinas en plantas que crecen en Cuba. Revista Cubana de Farmacia: 24 (2):288-96.
10. Peña, R. A. 2002. Algunas consideraciones sobre el empleo de productos naturales en la medicina natural y tradicional. Monografía. Bayamo: 2-6.
11. Barrese y Hernández M E. 2002: Tamizaje fitoquímico de la droga cruda y extracto fluido de la guacamaya francesa. Revista Cubana Plantas Medicinales: 7(3):129-30
12. [Barreses Y., Hernández M E y García O.](#) 2005: Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata* L. Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos: Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo>
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). M100-S17 (M2). Disk Diffusion Supplemental Tables, *CLSI*, Wayne Pa.
14. Kaur GJ y Arora DS (2009). Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. BMC Complementary and Alternative Medicine 9: 30.
15. Guerra M.1995. Guacamaya francesa: evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro*. Informe de Investigación. CIDEM, La Habana.