

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de *Jatropha aethiopica* (Chaya).

Evaluation of the antimicrobial activity of the extracts of *Jatropa aethiopica* (Chaya) leaves.

Javian Ocaña Ramírez;¹ Isabel Madelayne Ramírez Rodríguez;² Leosvanis Fonseca Cabrales;³ Teresa Sánchez Palanco.⁴

¹ *Licenciado en Química. Asistente. Filial de Ciencias Médicas Haydeé Santamaría Cuadrado. Manzanillo. Granma.*

² *Licenciada en Bioanálisis Clínico. Instructor. Dirección Municipal de Salud. Manzanillo. Granma.*

³ *Licenciado en Biología. Asistente. Filial de Ciencias Médicas Haydeé Santamaría Cuadrado. Manzanillo. Granma.*

⁴ *Licenciada en Bioanálisis Clínico. Instructor. Filial de Ciencias Médicas Haydeé Santamaría Cuadrado. Manzanillo. Granma.*

Resumen

Se realizó un estudio de la composición química para evaluar la acción antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de hojas de *Jatropha aethiopica* (Chaya). La tintura al 20% presenta los parámetros de calidad que se especifican en las Normas Cubanas. Se realizaron extracciones sucesivas partiendo de la tintura con solventes de polaridad creciente (n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y agua) para identificar los metabolitos secundarios presentes. En los ensayos microbiológicos "in vitro" presentaron actividad antibacteriana los extractos hexánico, clorofórmico y de acetato de etilo y actividad antifúngica el extracto de acetato de etilo, elaborados a partir de la tintura, frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Candida sp*. Todos los resultados biológicos fueron comparados con antibióticos modelos corroborándose la eficacia positiva de los extractos evaluados.

Descriptores DeCS: JATROPHA; FITOTERAPIA

Abstract

A study of the chemical composition was performed to evaluate the antimicrobial action of the extracts obtained from the leaves of *Jatropha aethiopica* (Chaya). 20% Tincture presented quality parameters specified in the Cuban standards. There were developed successive extractions starting from the tincture with solvents of increasing polarity (hexane, chloroform, water and ethyl acetate) to identify the secondary metabolites that are

presented. Microbiological tests "in vitro" presented antibacterial hexanic activity, chloroformic extracts and antifungal activity of ethyl acetate extract, produced from the dye against strains of *Staphylococcus aureus*, *e. coli* and *Candida* sp. All biological results were compared with antibiotics models corroborating the positive effectiveness of the evaluated extracts.

Subject heading: JATROPHA; PHYTOTHERAPY

Introducción

El uso de plantas medicinales es parte de la historia de la humanidad y del acervo cultural de cada pueblo. En años recientes se han descubierto aplicaciones insospechadas para muchas plantas y sustancias derivadas de estas. También han surgido nuevas formas de preparación y de disponibilidad.¹

En nuestro país el uso de plantas medicinales como recurso terapéutico ha adquirido en los últimos años una relevancia fundamental, por su probada efectividad e inocuidad constituyen la base para la elaboración de sistemas de medicina alternativa, como fuente de materia prima para la industria farmacéutica, en la sustitución de importación de medicamentos y como arma terapéutica en los sistemas médicos y fitoterapéuticos tradicionales.^{2, 3}

Específicamente la *Jatropha aethiopica*, conocida vulgarmente como Chaya, ha sido empleada ampliamente por la población en la cura de diferentes afecciones, por lo que popularmente se le atribuyen propiedades medicinales, entre ellas: antibacteriana, antiinflamatoria, antihipoglicemiante, antihipertensiva, anticancerígena, antianémica y antiasmática entre otras.⁴ Es importante que estas propiedades biológicas se validen científicamente y se logre propiciar un incentivo adicional para su multiplicación y propagación; de esta manera, la planta podría ser aprovechada no solo de forma popular a partir del conocimiento tradicional comprobado, sino también en los servicios de salud especializados.

Por todo lo anteriormente planteado, este trabajo se propone como:

Objetivo General:

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de las hojas de *Jatropha aethiopica* (Chaya).

Objetivos Específicos:

- 1.- Identificar los metabolitos secundarios de los extractos de las hojas de *Jatropha aethiopica* (Chaya), mediante el desarrollo de un tamizaje fitoquímico.
- 2.- Realizar las evaluaciones microbiológicas a los extractos obtenidos.
- 3.- Realizar estudios cromatográficos y de tamizaje fitoquímico a los extractos con actividad biológica.

Métodos

El material vegetal se recolectó en el mes de Diciembre de 2009 en la zona este de la Ciudad de Manzanillo, Provincia de Granma, hora: 10: 00 AM -11: 00AM. La planta fue identificada por el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Granma, según la Norma Ramal de Salud Pública 311 (1998). La parte empleada de la misma fueron las hojas.

El material se lavó con una solución de hipoclorito de sodio al 2 %, secado a la sombra a temperatura ambiente extendiéndose en bandejas perforadas volteándose diariamente durante 7 días, luego se sometió a temperatura de 60 °C durante 1h en estufa (MWN, Alemania) con circulación de aire. Seguidamente se procedió a la pulverización, usando un molino de cuchilla. Se obtuvo un polvo grueso que fue utilizado en la elaboración de los diferentes extractos.

Formulaciones

Extractos (etéreo, etanólico y acuoso)

Para la obtención de los extractos etéreo, etanólico y acuoso, se pesaron 10 g de la muestra en balanza técnica (BS 2202S SARTORIUS, China). Se realizaron extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente (éter de petróleo, etanol y agua) con la finalidad de lograr un mayor agotamiento

de la droga del material vegetal seco.

Tintura al 20 %

La tintura fue obtenida a partir del material vegetal, seco, molido y tamizado a 0.5 mm de diámetro, utilizando como menstruo Alcohol al 70 %. Se utilizaron 100 g de la droga cruda para obtener 500 mL de tintura al 20 %. La tintura se obtuvo por maceración de la droga pulverizada, por un tiempo de 7 días, según Norma Ramal 311 (1998), empleando agitador mecánico o saranda (ILM, THYS 2, Alemania).

Extracto seco

El extracto seco fue obtenido a partir de la tintura al 20% por rotoevaporación del solvente a 50 °C en un Rotoevaporador (KIKA, werke, Alemania), hasta obtener una masa consistente, la cual fue secada en una estufa, con circulación de aire a 40 °C, finalmente los extractos fueron triturados en un mortero y preservados en frasco ámbar.

Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico se realizó por la metodología reportada por Payo ³ empleándose pruebas o técnicas simples, rápidas y selectivas para la determinación de los compuestos; se le realizaron a cada extracto los ensayos específicos para los metabolitos secundarios que de acuerdo a su solubilidad podían haber sido extraídos en cada solvente.

Extracciones

La tintura obtenida de las hojas del *Pteris vittata L* se concentró hasta un

volumen de 100 mL y se fraccionó sucesivamente (30 X 30 mL) con solventes de polaridad creciente: n- hexano, cloroformo, acetato de etilo y agua. Luego a cada una de estas fracciones se le realizó tamizaje fitoquímico y pruebas microbiológicas.

Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos secos de las hojas de *Jatropha aethiopica* se empleó el método de difusión en agar por diseminación superficial en disco (*Bauer-Kirby*). Este método fue publicado por la *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) y adoptada por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (**CLSI**, antes **NCCLS**) como norma de aceptación general.⁵

Microorganismos evaluados

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 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).²

Para el ensayo de actividad antifúngica se empleó una cepa salvaje de *Candida sp*, aislada en el Centro de Higiene y Epidemiología de Manzanillo, Granma, de pacientes que presentan micosis por candidiasis.

Resultados

Al analizar los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico realizado a las hojas de la planta, se comprobó la diversidad de metabolitos secundarios presentes en la misma, entre ellos: alcaloides, quinonas, coumarinas, saponinas, azúcares reductores, triterpenos y/o esteroides, fenoles y taninos, ácidos grasos, aminoácidos libres, flavonoides y antocianidinas, los que justifican la utilidad de dicha planta en el tratamiento de diversas afecciones (tabla 1).

En el resultado del tamizaje fitoquímico realizado a la tintura al 20 % y el extracto seco, de las hojas de la planta en estudio, se puede observar una alta variedad de metabolitos secundarios, destacándose un alto contenido de alcaloides, coumarinas y quinonas, los demás metabolitos se encuentran en menor proporción, y no hay presencia de resinas (tabla 2).

La tabla 3 resume los resultados obtenidos de la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta, frente a 3 cepas de microorganismos: 1 Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) y 2 Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*), y un Hongo (*Candida*).

En la tabla 4 se presentan los resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hexánico, clorofórmico y de acetato de etilo.

Las figuras 1, 2 y 3 muestran los resultados de la Cromatografía de Capa Fina, extracto hexánico, clorofórmico y de acetato de etilo de las hojas de *Jatropha aethiopica* respectivamente.

En el extracto hexánico se observa variabilidad de metabolitos secundarios tales como: quinonas, flavonoides, coumarinas y alcaloides.

Para la separación e identificación de metabolitos secundarios se empleó la Cromatografía de Capa Fina, (**Figura 1**) detectándose con luz UV a 365 nm sin revelador químico 6 manchas: 3 de color amarillo que pueden ser (quinonas, flavonoides y alcaloides), 2 de color rosado (quinonas) y una de color azul fosforescente (coumarinas y flavonoides).

Mediante la Cromatografía de Capa Fina, empleada para la separación e identificación de metabolitos secundarios, se observaron en la placa con luz UV a 365 nm sin revelador químico 4 manchas: 3 de color rojo que puede ser (quinonas y coumarinas) y una de color verde fosforescente (coumarinas) (**Figura 2**).

Para la separación e identificación de metabolitos secundarios (**Figura 3**) se observaron en la placa con luz UV a 365 nm sin revelador químico 2 manchas de color rojo que pueden ser (quinonas y coumarinas).

Discusión

La alta variabilidad de metabolitos secundarios se identificó fundamentalmente en el extracto etanólico, lo cual se corresponde con lo reportado para este solvente, que es el más empleado en los estudios de tamizaje fitoquímico de plantas medicinales. Se destacan en las hojas de la planta la presencia de alcaloides y quinonas, metabolitos reportados como responsables de diferentes actividades biológicas en las plantas como la antimicrobiana.

Un aspecto importante a destacar es que la composición de metabolitos secundarios se mantiene semejante tanto en la tintura al 20 % como en el extracto seco. Por tanto las acciones farmacológicas deben mantenerse de forma inalterable, ya que es conocida la dependencia que existe entre composición química y propiedades biológicas.⁶

Para realizar la evaluación antimicrobiana *in vitro* de los extractos obtenidos a partir de la tintura al 20 % con solventes de polaridad creciente y el extracto seco de tintura, que muestran actividad antimicrobiana, se utilizó

una concentración final de 0.4 mg/disco evidenciándose actividad inhibitoria de los extractos hexánicos, clorofórmicos, de acetato de etilo y extracto seco de la planta frente a *Staphylococcus aureus*, con halos de inhibición entre 8 - 12 mm de diámetro y frente a *Escherichia coli* con halos de inhibición entre 8 - 10 mm de diámetro respectivamente. Además el extracto de acetato de etilo mostró actividad inhibitoria frente a *Candida sp* evidenciando un halo de inhibición de 9 mm.⁴

Los resultados más significativos son del extracto clorofórmico y el seco frente a *Staphylococcus aureus*, y del extracto de acetato de etilo frente a *Escherichia coli* y *Candida sp*, pues fue donde más respuesta inhibitoria se evidenció.

Al comparar la bioactividad de los extractos de la planta y el control + (Ciprofloxacin y Fluconazol, antibióticos comerciales) se pudo demostrar que existen diferencias, las cuales podrían estar atribuidas a la baja concentración de los constituyentes químicos presentes en el extracto vegetal con actividad antimicrobiana o quizás a la acción antagónica que ejercen sobre ellos otro grupo de compuestos.³

A los extractos hexánico, clorofórmico y de acetato de etilo, los cuales mostraron actividad antimicrobiana, se les realizó el tamizaje fitoquímico de

aquellos metabolitos que según los reportes bibliográficos tienen propiedad antimicrobiana (quinonas, alcaloides, flavonoides, coumarinas, fenoles y/o taninos).

Con el objetivo de separar los metabolitos secundarios por familias de compuestos de acuerdo a la polaridad de los mismos se empleó la Cromatografía de Capa Fina, usando como revelador luz UV a 365 nm.¹

Al comparar los resultados obtenidos por el método de separación cromatográfico y el tamizaje fitoquímico, se puede plantear que los metabolitos secundarios responsables de la actividad antimicrobiana en el extracto pueden ser: quinonas, alcaloides, coumarinas y flavonoides.⁴

En el resultado del tamizaje fitoquímico del extracto clorofórmico de la planta, se puede observar que predominan familias de metabolitos secundarios como: quinonas y coumarinas, estando en mayor abundancia las coumarinas.

Según los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico y la separación cromatográfica se puede concluir que las quinonas y las coumarinas pueden ser las responsables de la actividad antimicrobiana en el extracto clorofórmico de *Jatropha aethiopica*.

El análisis fitoquímico del extracto de acetato de etilo permitió conocer la presencia, en las hojas de la planta, de principios activos como: quinonas y coumarinas.

De acuerdo a los resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico y la separación cromatográfica podemos concluir que las quinonas y las coumarinas pueden ser las responsables de la actividad antimicrobiana en el extracto.³

Conclusiones

Los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Jatropha aethiopica* son: alcaloides, coumarinas, quinonas, saponinas, azúcares reductores, triterpenos y/o esteroides, fenoles y taninos, ácidos grasos, aminoácidos libres, flavonoides y antocianidinas, los extractos hexánico, clorofórmico, y de acetato de etilo de las hojas de *Jatropha aethiopica* mostraron actividad antibacteriana destacada frente al *Staphylococcus aureus* (ATCC) y *Escherichia coli* (ATCC). Además el extracto de acetato de etilo mostró actividad antifúngica frente a *Candida sp* y los metabolitos secundarios, detectados mediante la Cromatografía de Capa Fina y el tamizaje fitoquímico que pueden ser los responsables de la actividad antimicrobiana, en los extractos hexánicos, clorofórmicos, y de acetato de etilo fueron: quinonas y

coumarinas.

Recomendaciones

- 1.- Determinar la mínima concentración inhibitoria (MCI) y la mínima concentración bactericida (MCB) de los extractos de las hojas de *Jatropha aethiopica* para la cepa de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- 2.- Evaluar las formulaciones farmacéuticas de las hojas de *Jatropha aethiopica* contra enfermedades producidas por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida*.
- 3.- Realizar estudios de toxicidad a los extractos de la planta estudiada.

Referencias Bibliográficas

1. Areces AE. Medicina verde regalo de la naturaleza. Rev Bohemia 2000; 38(82): 49.
2. Planta Medicinal. Wikipedia. [Internet] s/a [citado 21 febrero 2011]. Disponible en: http://es.wikipedia.org/wiki/Planta_medicinal
3. Payo A, Oquendo M, Oviedo R. Tamizaje fitoquímico preliminar de plantas que crecen en Holguín. Rev Cubana Farm [Internet] 1997 [citado 21 febrero 2011]; 30(2): [aprox. 9p.]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol30_2_96/far06296.htm
4. Lenis LA, Benítez R, Peña Salamanca E, Chito Trujillo DM. Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del alga marina *Bostrychia Calliptera*. Scientia et Technia [Internet] 2007 [citado 21 febrero 2011]; 13(33): [aprox. 5p.]. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=84903323>

5. Vandebossche I, Vaneechouthe M, Vandevenne M, De Baere T, Verschraegen G. Susceptibility Testing of Fluconazole by NCCLS Broth Macrodilution method, E-Test, and Disk Difusión for Application in the Routine Laboratory. *J Clin Microbiol* [Internet] 2002 [citado 21 febrero 2011]; 40(3): [aprox. 4p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC120224/>
6. Fuertes Ruitón CM, Roque Alcaraz M, Tristan Vidalón M. Flavonoides y alcanoides de *Lupinus Ballianus* C.P. Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. *Ciencia e Investigación* [Internet] 1998 [citado 21 febrero 2011]; 1(2): [aprox. 4p.]. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/ciencia/v01_n2/flavonoides.htm

Anexos

Tabla 1. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos etéreo, etanólico y acuoso de las hojas de *Jatropha aethiopica*.

Ensayos (metabolitos)	Extracto etéreo	Extracto etanólico	Extracto acuoso
Sudán III (ácidos grasos)	+		
Mayer (alcaloides)	-	++	++
Baljet (coumarinas)	+	+	
Espuma (saponinas)		+	+
Shinoda (flavonoides)		+	-
FeCl ₃ (fenoles y taninos)		+	+
Mucílagos			-
Fehling (azúcares reductores)		+	+
Borntrager (quinonas)		+++	
Resinas		-	
Liebermann-Burchard (triterpenos y/o esteroides)		+	
Ninhidrina (aminoácidos libres)		+	
Antocianidinas		+	
Principio amargo y astringente			-

Leyenda: (-): ausencia, (+): presencia, (++) (+++): abundante, los espacios vacíos indican que el ensayo no se realizó.

Tabla 2. Resultados del tamizaje fitoquímico de la tintura al 20 % y el extracto seco.

Ensayos (metabolitos)	Hojas	
	Tintura	E. seco
FeCl ₃ (fenoles y taninos)	+	+
Mayer (alcaloides)	++	++
Baljet (coumarinas)	++	++
Espuma (saponinas)	+	+
Shinoda (flavonoides)	+	+
Fehling (azúcares reductores)	+	+
Borntrager (quinonas)	++	++
Resinas	-	-
Libermann-Burchard (triterpenos y/o esteroides)	+	+
Ninhidrina (aminoácidos libres)	+	+
Antocianidinas	+	+

Leyenda: (véase tabla 1)

Tabla 3. Resultados del ensayo *in vitro* de la actividad antimicrobiana de los extractos.

Extractos	Halos de inhibición (mm)			
	<i>E.coli</i> (ATC C)	<i>P.aeruginosa</i> (ATC C)	<i>S.aureus</i> (ATC C)	<i>Candida</i> <i>sp</i>
Hexánico	9	-	8	-
Clorofórmico	8	-	10	-
Acetato de etilo	10	-	8	9
Acuoso	-	-	-	-
Extracto seco	8	-	12	-
Ciprofloxacin (control +)	17	16	19	

Fluconazol (control +)				20
------------------------	--	--	--	----

Tabla 4. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hexánico clorofórmico y de acetato de etilo de las hojas de *Jatropha aethiopica*.

Ensayos (metabolitos)	Extractos de hojas		
	Hexánico	Clorofórmico	Acetato de Etilo
Borntrager (quinonas)	+	+	+
FeCl ₃ (fenoles y/o taninos)	-	-	-
Shinoda (flavonoides)	+	-	-
Baljet (coumarinas)	+	++	+
Wagner (alcaloides)	-	-	-
Mayer (alcaloides)	+	-	-

Leyenda: (véase tabla 1)

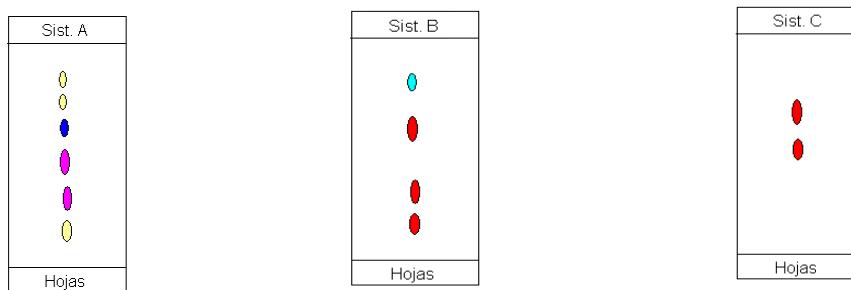


Figura 1. CCF. Extracto hexánico de *Jatropha aethiopica*.

Figura 2. CCF. Extracto clorofórmico de *Jatropha aethiopica*.

Figura 3. CCF. Extracto de acetato de etilo de *Jatropha aethiopica*.

Recibido: 23 abril 2012.

Aprobado: 3 mayo 2012.