

ARTÍCULO ORIGINAL

Actividad antibacteriana de extractos de *Gnaphalium polycephalum* Michx contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*

Antibacterial activity of *Gnaphalium polycephalum* Michx extracts against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*

Román Yesid Ramírez Rueda^{1*}, Diana Natalia Mojica Ávila²

¹ MSc Microbiología. Docente Investigador. Grupo de Investigación en Química Medicinal. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Sede Tunja.

² Estudiante de Química. Grupo de Investigación en Química Medicinal. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Sede Tunja.

* Correo electrónico: roman.ramirez@uptc.edu.co

Fecha de recepción: 23 - 01 - 14

Fecha de aceptación: 25 - 02 - 14

Citar este artículo así:

Ramírez - Rueda RY, Mojica DN. Actividad antibacteriana de extractos de *Gnaphalium polycephalum* Michx contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Revista Investig. Salud Univ. Boyacá. 2014; 1(1): 63 - 71

RESUMEN

Introducción. La resistencia bacteriana se ha incrementado de forma exponencial desde la aparición de las primeras cepas resistentes a la penicilina. Por el contrario, el descubrimiento

y la investigación de nuevos antibióticos han decrecido de forma tal que, en la actualidad, las opciones terapéuticas ante infecciones causadas por bacterias multirresistentes son realmente pocas. Por lo anterior es necesario buscar alternativas en fuentes naturales como las plantas, que representan uno de los mejores sustratos para la obtención de moléculas con actividad antimicrobiana.

Objetivo. Evaluar la actividad antibacteriana del extracto en metanol y diclorometano de *Gnaphalium polycephalum* Michx, contra tres cepas bacterianas de importancia clínica.

Métodos. Los extractos se obtuvieron de las hojas de la planta mediante extracción por solventes (metanol y diclorometano) y se secaron en rotaevaporador al vacío. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la técnica de microdilución (adaptada del *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) probando cinco diluciones (1.000, 500, 250, 125 y 62,5 $\mu\text{g/ml}$). Todos los ensayos se hicieron por duplicado y se incubaron 24 horas a 37 °C.

Resultados. Ambos extractos mostraron efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* hasta la segunda dilución, pero no actuaron sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusiones. La obtención de un efecto inhibitorio en concentraciones por debajo de 1.000 $\mu\text{g/ml}$ de cualquier extracto, se convierte en una característica promisorio para seguir investigando los efectos biológicos de esta planta sobre las bacterias. Desde este punto de vista, *Gnaphalium polycephalum* Michx podría representar una nueva fuente potencial de moléculas alternativas para utilizar en la lucha contra la resistencia bacteriana.

Palabras clave: extractos vegetales, plantas medicinales, *Gnaphalium polycephalum*, fitoterapia. (Fuente: DeCS)

ABSTRACT

Introduction: Bacterial resistance has increased exponentially since emergence of first penicillin-resistant strains. Conversely, discovery and investigation of new antibiotics has decreased so that in the present, treatment options to infections caused by multi-resistant bacteria are really few. Therefore, it is necessary to find alternatives in natural sources like plants, which represent one of the best substrates for obtaining molecules with antimicrobial activity.

Objective: To evaluate antibacterial activity of methanolic and dichloromethanic extracts from *Gnaphalium polycephalum* Michx against three clinically important bacterial strains.

Methods: Extracts were obtained from plant leaves, through solvent extraction (methanol and dichloromethane) and dried in a vacuum rotary evaporator. Antimicrobial activity was tested through microdilution technique (adapted from the *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI) to determine minimum inhibitory concentration (MIC) testing five-fold dilutions (1,000, 500, 250, 125 and 62.5 $\mu\text{g/ml}$). All assays were performed in duplicate and incubated 24 hours at 37°C.

Results: Both extracts showed inhibitory effect against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* until the second dilution, but had no effect against *Pseudomonas aeruginosa*.

Conclusions: Obtaining an inhibitory effect at concentrations below 1,000 $\mu\text{g/ml}$ of any sample becomes a promising feature to further investigate biological effects of this plant over bacteria. From this point of view, *Gnaphalium polycephalum* Michx could represent a potential new source of molecules useful in fighting against bacterial resistance.

Key words: Plant extracts, medicinal plants, *Gnaphalium polycephalum*, phytotherapy. (Source: DeCs)

INTRODUCCIÓN

Por recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia bacteriana ha sido declarada como un problema de salud pública; tal resolución emitida en 1998 se contempla como parte de su estrategia mundial para contener la resistencia a los antimicrobianos (1).

La creciente aparición y la diseminación de la resistencia bacteriana ha generado un incremento en la mortalidad, la morbilidad, y en los costos generados por la atención médica

de pacientes que padecen infecciones, sobre todo de tipo hospitalario. No obstante las medidas preventivas como el mejoramiento en la prescripción y uso de los antibióticos, y el manejo de los mismos en ambientes hospitalarios, las bacterias cada vez se hacen más resistentes creando la necesidad urgente de buscar nuevas alternativas terapéuticas para el manejo de cepas resistentes a múltiples antibióticos (2).

Es importante contemplar la lucha contra la resistencia bacteriana, al menos, desde dos

diferentes ángulos: el primero es la prevención de la resistencia (estrategias que ayuden a disminuir el surgimiento de nuevas cepas resistentes), y el segundo es el desarrollo de alternativas terapéuticas (que solucionen los problemas ya establecidos).

La necesidad de desarrollar nuevas estrategias para combatir las bacterias y su resistencia a los antimicrobianos, ha llevado a diversos grupos de investigación a probar nuevas fuentes de antibióticos o sustancias que sirvan para eliminarlas. Uno de estos recursos es la propia naturaleza, y en ella la biodiversidad de las plantas que son una fuente importante de moléculas con potencial acción antimicrobiana. Es así como surge la fitomedicina, que desde la antigüedad ha sido practicada como fuente inagotable de recursos terapéuticos para tratar diversas enfermedades, entre ellas las infecciones bacterianas (3). Esta tradición popular ha venido siendo cada vez más estudiada por grupos de científicos alrededor del mundo, que están empleando variadas técnicas para conocer los secretos terapéuticos que se esconden en las plantas. Como resultado de esta tendencia se conocen diversos productos de plantas que inhiben el crecimiento microbiano; también se han dilucidado varios mecanismos por los cuales se lleva a cabo su acción y los metabolitos que proveen la actividad de tales productos naturales (4-6).

Gnaphalium polycephalum es una planta de

la familia Asteraceae, considerada como una maleza por su rápido crecimiento y su adaptación para crecer en casi cualquier terreno, así como por su resistencia a climas extremos. Esta última característica le ha valido para que en el argot popular se le denomine "siempreviva". Se describe como una planta que puede medir en promedio 40 cm, de tallo simple o ramificado en la parte superior, y con hojas de color verde oscuro, muy finas, oblongas, puntiagudas y lanosas. Sus flores son amarillas, pistiladas y se juntan en racimos de pocas unidades (7).

En Colombia está catalogada en varios herbarios, entre ellos en el del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia (8) y se ha descrito junto a otra flora vascular de la cuenca alta del río Subachoque (Cundinamarca), en donde se encontraron 115 especies del género Asteraceae (9) y, también, en un estudio más reciente en el que se caracterizó la comunidad de malezas en un sistema de producción de rosas en invernadero de la sabana de Bogotá (10).

Para este trabajo se utilizaron extractos en metanol y diclorometano de las hojas de *Gnaphalium polycephalum* Michx, (planta que no reporta informes previos de actividad antimicrobiana) los cuales fueron evaluados con el objetivo de determinar su capacidad inhibitoria frente a tres cepas bacterianas ATCC (*American Type Culture Collection*) de importancia clínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Las hojas de *Gnaphalium polycephalum* se recolectaron en la zona rural del municipio de Tunja (Boyacá) a una altura de 2.737 msnm, latitud norte de 5° y longitud oeste de 73°. Luego de ser recolectadas se clasificaron en el herbario de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. La planta recolectada corresponde al registro 020920 de la colección de dicho herbario.

Obtención de los extractos. El material vegetal fue posteriormente deshidratado a 40 °C y finalmente pulverizado. La extracción se llevó a cabo con dos solventes (diclorometano y metanol) por percolación. Los extractos se obtuvieron de manera independiente y el proceso se realizó a temperatura ambiente durante 72 horas con agitación constante. Una vez obtenidos ambos extractos, se retiró el solvente por medio de evaporación, para lo cual se utilizó un rotaevaporador a 40 °C para el extracto de diclorometano y a 60 °C para el de metano, hasta obtener un material libre de solvente. El material obtenido se almacenó en envase de vidrio ámbar y se refrigeró hasta el momento de su uso.

Determinación de actividad antibacteriana. Los extractos se probaron contra tres cepas bacterianas de relevancia clínica: *Staphylococcus aureus* ATCC 33862, *Escherichia coli* ATCC 25922, y *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 9027. La técnica utilizada fue la de microdilución en caldo, adaptada de las técnicas propuestas por el protocolo M07-A9 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (11). Para tal fin, se utilizó una placa de microtitulación de 96 pocillos; en cada pocillo de prueba se dispensaron 100 μ l de caldo Mueller Hinton, 100 μ l de extracto soluble y 10 μ l del inóculo bacteriano ajustado a una concentración de 5×10^6 UFC/ml, para obtener una concentración de 5×10^5 UFC/ml después de inocularlo.

La concentración inicial de extracto fue de 1.000 μ g/ml y se diluyó cinco veces sucesivas hasta llegar a una concentración de 62,5 μ g/ml (1.000, 500, 250, 125 y 62,5 μ g/ml). Todos los extractos se disolvieron con DMSO al 5 %. Además de lo anterior, se montaron controles de esterilidad (pocillo con caldo Mueller Hinton sin inocular y sin extracto), de inhibición (cloranfenicol, 50 μ g/ml), del diluyente (DMSO al 5 %), y de crecimiento (pocillos inoculados con las especies bacterianas en estudio pero sin extracto). Todos los montajes descritos se hicieron por duplicado. Después de inoculadas las placas, se incubaron por 24 horas a 37 °C.

RESULTADOS

Después de la incubación, la inhibición se leyó de manera visual, observando la presencia o ausencia de botón en cada uno de los pocillos de prueba. Los controles mostraron

los resultados esperados, comprobándose así la viabilidad de las cepas bacterianas usadas, la inocuidad del diluyente al 5 % (DMSO) y la esterilidad del medio de cultivo. En general, ambos tipos de extractos mostraron inhibición de *S. aureus* y *E. coli* a una concentra-

ción inhibitoria mínima (CIM) de 500 µg/ml (excepto el extracto de diclorometano en *S. aureus*); por el contrario, para *P. aeruginosa* no se obtuvo ningún resultado que mostrara inhibición. En la tabla 1 se muestra el resultado del ensayo.

Tabla 1. Resultados del ensayo de inhibición bacteriana de extractos de *Gnaphalium polycephalum*

Concentración (µg/ml)	Extractos en metanólicos					Extractos en diclorometánicos				
	1.000	500	250	125	62,5	1.000	500	250	125	62,5
Bacteria										
<i>S. aureus</i> ATCC 33862	I	I	NI	NI	NI	I	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	I	I	NI	NI	NI	I	I	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

I: inhibición; NI: sin inhibición

DISCUSIÓN

El género *Gnaphalium* comprende más de 1.300 especies, de las cuales solo un poco más de un centenar han sido aceptadas como parte del género. Algunas de estas son conocidas y hacen parte de la cultura gastronómica y medicinal de pueblos orientales como China. Este es el caso de *G. affine* (12) que, además, en estudios recientes ha

demostrado tener acción antioxidante y antimicrobiana, llegándose a conseguir CIM que fluctúan entre 0,2 y 1,56 µg/ml (0,39 µg/ml para *S. aureus* y 1,56 µg/ml para *E. coli*) (13).

En otros estudios menos recientes también se reporta un efecto antimicrobiano de extractos de algunas especies de *Gnaphalium*,

como *G. stramineum* (14), *G. spicatum* (15), *G. viscosum* (16); más recientemente, en un estudio de la actividad antimicrobiana de plantas tradicionales de México, se identificaron dos especies, *G. oxyphyllum* y *G. americanum*, las cuales poseen una CIM entre 2.500 y 5.000 mg/ μ l (17), efecto significativamente menor que el encontrado en el presente estudio con *G. polycephalum*, el cual está entre 0,5 y 1 mg/ml.

En otros trabajos científicos se han identificado algunos componentes de otras especies de *Gnaphalium*. Entre los grupos químicos encontrados se encuentran las flavonas (18,19) y las lactonas sesquiterpénicas (20).

El presente trabajo es el primero en que se reporta la actividad antimicrobiana *in vitro* de *G. polycephalum*, ya que en la literatura científica solo se encuentra el uso de esta planta en herbolaria aplicada en veterinaria, la cual se utiliza en estomatitis y problemas de las vías respiratorias superiores en animales (21).

Los resultados presentados en este artículo indican la existencia de compuestos con potencial acción antibacteriana en los extractos estudiados; lo anterior presenta una clara correlación con los reportes descritos anteriormente. Este reporte deja ver el potencial farmacológico que tiene el género *Gnaphalium* y, específicamente, el de la especie *polycephalum*, del cual no existen reportes previos en la literatura científica. Se requie-

ren estudios fitoquímicos para establecer el real efecto inhibitor de los extractos de esta planta y los tipos de compuestos responsables de su efecto antimicrobiano.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Laboratorio de Microbiología y al Laboratorio Clínico de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, por el préstamo de sus instalaciones y algunos materiales y reactivos necesarios para el desarrollo del estudio, al igual que al herbario, por su colaboración en la identificación taxonómica de la planta.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores no declaran ningún conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. Emerging and other communicable diseases: Antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 1998.
2. Livermore DM. Bacterial resistance: Origins, epidemiology, and impact. Clin Infect Dis. 2003;15(36 S1):S11-23.
3. Schmidt B, Ribnicky D, Poulev A, Logendra S, Cefalu W, Raskin I. A natural

- history of botanical therapeutics. *Metabolis*. 2008;57(Suppl.1):S3-9.
4. Silva NC, Fernandes A Jr. Biological properties of medicinal plants: A review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins*. 2010;16:402-13.
 5. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:564-82.
 6. Ríos J, Recio M. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*. 2005;100:80-4.
 7. Georgia AE. A manual of weeds, with descriptions of all the most pernicious and troublesome plants in the United States and Canada, their habits of growth and distribution, with methods of control. New York: The Macmillan Company; 1916.
 8. Fernández JL. COL000081633 - *Gnaphalium polycephalum* Michx. - Asteraceae. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 1996. Fecha de consulta: 14 de febrero de 2014. Disponible en: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=284970>.
 9. Fernández JL, Hernández M. Catálogo de la flora vascular de la cuenca alta del río Subachoque (Cundinamarca, Colombia). *Caldasia*. 2007;29:73-104.
 10. Plaza GA, Quintana DN, Aponte LS, Chaves B. Caracterización de la comunidad de malezas en un sistema de producción de rosa bajo invernadero en la sabana de Bogotá. *Agronomía Colombiana*. 2009;27:385-94.
 11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved atandard. Broth microdilution method. Ninth edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
 12. Chen GS. Ching Ming vegetable. *Shanghai Vegetables*. 1999;2:41.
 13. Zeng WC, Zhu RX, Jia LR, Gao H, Zheng Y, Sun Q. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Gnaphalium affine*. *Food Chem Toxicol*. 2011;49:1322-8.
 14. Cáceres A, Álvarez AV, Ovando AE, Samayoa BE. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against Gram-positive bacteria. *J Ethnopharmacol*. 1991;31:193-208.
 15. Monguelli E, Desmarchelier C, Coussio J, Ciccía G. Antimicrobial activity and interaction with DNA of medicinal plants from the Peruvian Amazon region. *Revista Argentina de Microbiología*. 1995;27:199-203.

16. Cáceres A, Cano O, Samayoa B, Aguilar L. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. *J Ethnopharmacology*. 1990;30:55-73.
17. Rojas G, Lévaro J, Tortoriello J, Navarro V. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. *J Ethnopharmacol*. 2001;74:97-101.
18. Cuadra P, Fajardo V, Muñoz O, Arrieta A, Urzua A. Determination of the effect of 8-O-(2-methyl-2butenoyl)-5,7-dihydroxy-3-metoxyflavone from *Gnaphalium robustum* on growth of *Escherichia coli* K-12 by optical density and electrical conductance measurements. *Planta Med*. 1994;60:598-9.
19. Torrenegra RD, Ricardo A, Ayda PP, Julio FD. Flavonoids from *Gnaphalium gracile* H.B.K. *Int J Crude Drug Res*. 1989;27:22-40.
20. Bohlman F. Compositae, a source of unusual natural compounds. *GIT Fachz Laboratory*. 1988;32:453-6.
21. Wynn SG, Fougère BJ. Veterinary herbal medicine: A systems-based approach. In: Wynn SG, Fougère BJ, editors. *Veterinary herbal medicine*. Saint Louis: Mosby; 2007. p. 291-409.