



Actividad Antimicrobiana *In Vitro* de Seis Especies Autóctonas de la Flora de Entre Ríos (Argentina)

Eduardo VIVOT ^{1*}, Rosana MASSA ², María J. CRUAÑES ³, Juan de Dios MUÑOZ ³,
Graciela FERRARO ⁴, Gabriel GUTKIND ² & Virginia MARTINO ⁴

¹ Cátedra de Química General y ³ Cátedra de Botánica Sistemática, Facultad de Ciencias Agropecuarias,
Universidad Nacional de Entre Ríos, Ruta 11, Km 10, CC N° 24 (3100), Oro Verde, Entre Ríos, Argentina

² Cátedra de Microbiología y ⁴ Cátedra de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica,
Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. Los extractos de cinco plantas de la flora de Entre Ríos (Argentina), usadas como antisépticos en medicina popular, fueron ensayados frente a bacterias y hongos para la evaluación de sus actividades antimicrobianas mediante el método de difusión con discos. El extracto diclorometánico de *Acanthospermum australe* y de *Polygonum punctatum* y el extracto hidroalcohólico de *Arctium minus* fue activo contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. El extracto diclorometánico de *Tessaria integrifolia* fue activo contra *B. subtilis* y *S. aureus*. El extracto metanólico de *P. punctatum* fue activo contra *B. subtilis*, *M. luteus*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. El extracto hidroalcohólico de *A. australe* evidenció actividad contra *B. subtilis*, *M. luteus* y *S. aureus*. El extracto metanólico de *P. punctatum* resultó activo contra *Aspergillus niger* y el extracto diclorometánico de *P. punctatum* contra *Candida albicans* y *A. niger*. Entre las especies de plantas ensayadas, los extractos de *P. punctatum* fueron los que presentaron el mayor espectro de actividad.

SUMMARY. "In vitro Antimicrobial Activity of Six Native Species from Entre Rios Flora (Argentina)". Extracts of five plants from Entre Ríos flora (Argentina) traditionally used in folk medicine as antiseptics for external use and/or in the treatment of diseases that could be related to microbial infections were selected for the evaluation of their antimicrobial activities using a disk diffusion test. Dichloromethane, methanolic, hydroalcoholic and aqueous extracts of all species were tested against a representative set of bacteria and fungi. Results showed the activity of the dichloromethane extracts of *Acanthospermum australe* and *Polygonum punctatum* and the hydroalcoholic extract of *Arctium minus* against *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. The dichloromethane extract of *Tessaria integrifolia* was active against *B. subtilis* and *S. aureus*. The methanolic extract of *P. punctatum* was active against *B. subtilis*, *M. luteus*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*. The hydroalcoholic extract of *A. australe* was active against *B. subtilis*, *M. luteus* and *S. aureus*. Antifungal evaluation showed that the methanolic extract of *P. punctatum* was active against *Aspergillus niger* and the dichloromethane extract of *P. punctatum* was active against *Candida albicans* and *A. niger*. Within the tested plants, *P. punctatum* extracts displayed the broadest spectrum of activity.

INTRODUCCIÓN

Una de las plantas que alcanzó un enorme arraigo en la medicina popular de Entre Ríos (Argentina) es *Arctium minus* (Hill.) Berhn., que no falta prácticamente en ninguna de las viejas casas de campo. A pesar de ser una especie adventicia en la Argentina, se adapta perfectamente a nuestros climas. Sus propiedades se consideran las mismas que las de *Arctium lappa* L., por lo cual hay farmacopeas europeas que las aceptan indistintamente ¹.

Muy famosas en el saber popular son las especies de *Polygonum*, en especial *P. punctatum* Elliot, por su abundancia en terrenos inundables. Es considerado astringente y diurético. La decocción se bebe como antigripal, para aliviar resfríos, tos y bronquitis ². Aplicada externamente se usa para problemas de piel, como antiséptico y en baños de asiento para hemorroides ³⁻⁶. Las hojas en cataplasmas se recomiendan para aliviar tumores ⁷. Para tratar dolores de muelas y de garganta se usa la decocción en gárgaras ^{4,5}.

PALABRAS CLAVE: Actividad antimicrobiana, Argentina, Flora de Entre Ríos, Plantas medicinales.

KEY WORDS: Antibacterial activity, Argentina, Entre Ríos flora, Medicinal Plants.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: evivot@fca.uner.edu.ar

El jugo fresco o diluido se aplica para extraer el pus de heridas infectadas ² y para borrar manchas de la piel, la que adquiere un notable enrojecimiento al aplicar la decocción (información local). Sus extractos registran antecedentes de actividad antimicrobiana sobre *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Mucor* sp. y *Aspergillus niger* ⁸, y también sobre *Enterococcus faecalis* y *Mycobacterium phlei* ⁹, así como actividad antifúngica sobre algunos dermatofitos ¹⁰ y actividad antiviral ¹¹. Del extracto clorofórmico de *P. punctatum* se aisló poligodial, un sesquiterpeno dialdehídico con actividad contra *Cladosporium sphaerospermum* ¹² y también se han identificado sesquiterpenoides y flavonoides ¹³. Los extractos de esta especie habían sido ensayados previamente por nuestro grupo de trabajo. En la presente investigación se amplió el estudio de sus extractos frente a otras bacterias y hongos levaduriformes.

En las playas del Río Uruguay y afluentes es común *Acanthospermum australe* (Loefl.) Kuntze, que crece de manera aislada en la arena y es de muy fácil extracción. Su infusión o decocción se utiliza como depurativa, diurética y antiartrítica. Externamente se usa para tratar heridas ulcerosas y en lavados vaginales contra gonorrea y leucorrea ¹⁴. Es reconocida como antimalárica ¹⁵. También presentó actividad antifúngica contra *Candida cladosporioides*, *Fusarium oxysporum* y algunos dermatofitos ¹⁶. Asimismo, existen estudios fitoquímicos que indican presencia de alcaloides ¹⁷, flavonoides ^{18,19} y terpenos ²⁰.

Myrcianthes pungens (O. Berg) D. Legrand se asemeja al mirto. El cocimiento de sus partes aéreas es astringente y antidisentérico en uso interno ¹⁴. Externamente se aplica en lavados vaginales. Sus hojas, mezcladas con las de *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, otra especie de *Myrtaceae* muy abundante en la Mesopotamia argentina, se usa contra flujos o leucorrea ⁷. Hay estudios que indican presencia de sesquiterpenos en *M. pungens* ²¹.

Tessaria integrifolia Ruíz & Pav. var. *integrifolia* es un pequeño árbol muy común sobre las costas del Río Paraná. Es usado en la construcción de paredes de adobe; asimismo, su decocción es útil como antigonorreica, cicatrizante y resolutive ²². Estudios fitoquímicos denotan la presencia de sesquiterpenoides ²³, ácidos cafeoilquínicos ²⁴, flavonoides ²⁵ y derivados de cauathemona ²⁶.

Myrsine laetevirens (Mez) Arechav. es un árbol de las selvas ribereñas de los ríos Paraná y Uruguay. La información popular lo registra co-

mo una especie cuya decocción se usa en enjuagues bucales contra dolores de muelas y externamente en lavajes para tratar irritaciones y escaldaduras (información local). La resina se usa en fricciones en el tratamiento del reuma, dolores lumbares y fracturas ¹⁴.

Cabe destacar que *M. pungens*, *T. integrifolia* y *M. laetevirens* no presentan antecedentes de actividad antibacteriana o antifúngica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las especies seleccionadas para el estudio fueron identificadas, prensadas, secadas, determinadas, preservadas, etiquetadas, numeradas e incorporadas al Herbario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (ERA), registrado en Index Herbariorum. A continuación se citan los ejemplares de referencia: a) *Myrcianthes pungens* (O. Berg) D. Legrand, Provincia de Entre Ríos, Departamento Diamante, La Jaula, 19/IV/2002, Muñoz, J. de D. 6561 (ERA); b) *Myrsine laetevirens* (Mez) Arechav, Provincia de Entre Ríos, Departamento Diamante, La Jaula, 19/IV/2002, Muñoz, J. de D. 6562 (ERA), c) *Polygonum punctatum* Elliot, Provincia de Entre Ríos, Departamento Paraná, Bajada Grande, 21/IV/2002; Muñoz, J. de D. 6563 (ERA), d) *Tessaria integrifolia* Ruiz & Pav. var. *integrifolia*, Provincia de Entre Ríos, Departamento Diamante, La Juanita, 2/V/2002; Muñoz, J. de D. 6564 (ERA), e) *Acanthospermum australe* (Loefl) Kuntze, Provincia de Entre Ríos, Departamento Colón, Liebig, 15/V/2002, Muñoz, J. de D. 6565 (ERA) y f) *Arctium minus* (Hill) Bernh, Provincia de Entre Ríos, Departamento Colón, alrededores de Villa Elisa, 26/VI/2002, Muñoz, J. de D. 6566 (ERA).

El material utilizado de las especies estudiadas en todos los casos estuvo constituido por partes aéreas, hojas y tallos, secados a la sombra y las muestras fueron molidas en molino a disco.

Preparación de extractos

Los extractos diclorometánico y metanólico se prepararon con 100 gramos de cada especie agregando 200 mL de diclorometano a temperatura ambiente. El procedimiento se repitió tres veces durante 24 h. El extracto diclorometánico fue filtrado y evaporado el solvente al vacío hasta residuo sólido. El material vegetal residual de cada especie fue secado y extraído con metanol a temperatura ambiente. El procedimiento se repitió tres veces cada 24 h. El extracto metanólico fue filtrado y el alcohol evaporado al va-

Especie y Extracto	Partes	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633		<i>M. luteus</i> ATCC 9341		<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15313		<i>S. aureus</i> ATCC 6538	
		AM 1	AM 11	AM 1	AM 11	AM 1	AM 11	AM 1	AM 11
<i>P. punctatum</i> (metanólico)	Aéreas	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>P. punctatum</i> (diclorometánico)	Aéreas	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>T. integrifolia</i> (diclorometánico)	Aéreas	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>A. minus</i> (hidroalcohólico)	Aéreas	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>A. australe</i> (hidroalcohólico)	Aéreas	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>A. australe</i> (diclorometánico)	Aéreas	+	+	+	+	+	-	+	+

Tabla 1. Actividad antibacteriana de los extractos. Referencias: **AM1:** Agar para antibióticos núm.1 (pH 6.6); **AM11:** Agar para antibióticos núm.11 (pH 7.9); +: presencia de halo de inhibición ; -: ausencia de halo de inhibición y *: muy poca actividad. Se consignan sólo los microorganismos contra los cuales fueron activos los extractos.

ción hasta residuo sólido. Fue conservado a 2 °C hasta su uso en el ensayo.

El extracto hidroalcohólico se preparó a partir de 100 gramos de cada especie agregando 200 mL de solución acuosa al 70 % en etanol a temperatura ambiente. El procedimiento se repitió tres veces. El extracto hidroalcohólico fue filtrado, el alcohol evaporado al vacío y el residuo fue liofilizado y conservado a 2 °C hasta su uso en el ensayo.

La infusión acuosa se preparó según Farmacopea Argentina ²⁷. A 10 gramos de cada especie, se le agregaron 200 mL de agua a temperatura de ebullición y se dejó en contacto durante 20 min. El extracto fue filtrado y liofilizado.

Ensayo antimicrobiano

La actividad antimicrobiana de los extractos diclorometánico, metanólico, hidroalcohólico y acuoso de cada especie fue ensayada mediante el método de difusión en medio sólido por impregnación de discos de papel (6 mm) con 100 µg de extracto seco disuelto en el correspondiente solvente y secado a temperatura ambiente. El inóculo microbiano fue preparado como se ha descrito previamente ²⁸. Esencialmente, suspensiones de 2.5 ml con 1x10⁸ microorganismos/mL fueron inoculadas en 25 mL de medio de cultivo (Agar para antibióticos num.1, Merck, Germany) a pH 6.6, (Agar para antibióticos num. 11, Merck, Germany) a pH 7.9 y en medio de cultivo para hongos (Agar Glucosado de Sabouraud, Britania, Argentina) y volcadas en placas de 90 mm. Una vez solidificados los medios, los discos impregnados fueron distribuidos en la superficie y las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Se adoptó el criterio de presencia o ausencia de zona de inhibición para definir la

actividad o no de los extractos. Los ensayos fueron realizados por duplicado y se utilizaron discos de ampicilina como control positivo.

Los microorganismos utilizados en el ensayo fueron: *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 11105, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Aspergillus niger* ATCC 16404.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Se realizó la evaluación de las actividades antibacteriana y antifúngica de los extractos diclorometánico, metanólico, hidroalcohólico y acuoso de las especies: *Myrcianthes pungens*, *Myrsine laetevirens*, *Polygonum punctatum*, *Tesaria integrifolia*, *Acanthospermum australe* y *Arctium minus*. Los resultados antibacterianos se muestran en Tabla 1, y los antifúngicos en Tabla 2.

Entre los 24 extractos ensayados, varios presentaron actividad antibacteriana. Ninguno de ellos fue activo frente a las bacterias gram-negativas ensayadas. Se confirmaron los resultados de actividad de los extractos metanólico y diclorometánico de *P. punctatum* frente *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. aureus* y *A. niger* obtenidos por Penna *et al.* ¹⁴. En este trabajo se detectó además actividad de los extractos metanólico y diclorometánico sobre *Listeria monocytogenes* y del extracto diclorometánico frente a *C. albicans*. El extracto hidroalcohólico de *A. minus* y el extracto diclorometánico de *A. australe* presentaron el mismo perfil de actividad, contra *B. subtilis*, *M. luteus*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*. El extracto hidroalcohólico de *A. australe* presentó actividad contra *B. subtilis*, *S. aureus* y *M.*

Especie y Extracto	Partes	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
<i>P. punctatum</i> (metanólico)	Aéreas	-	+*
<i>P. punctatum</i> (diclorometánico)	Aéreas	+	+

Tabla 2. Actividad antifúngica de los extractos. Los ensayos de actividad antifúngica fueron realizados en Agar Sabouraud, +: presencia de halo de inhibición; -: ausencia de halo de inhibición y *: muy poca actividad.

luteus. El extracto diclorometánico de *T. integrifolia* presentó actividad sólo frente a *B. subtilis* y *S. aureus*.

Las diferencias de actividad de los extractos en los diferentes medios de cultivo utilizados puede deberse a modificaciones químicas de los principios activos debido al pH del medio, lo cual puede alterar la entrada del compuesto a la célula bacteriana. Entre las especies ensayadas, los extractos de *P. punctatum* fueron los más interesantes, ya que muestran un amplio espectro de actividad. Los resultados obtenidos con esta especie auspician la profundización de los estudios en busca de los compuestos responsables de su bioactividad.

Agradecimientos. Se agradece el apoyo brindado por la Secretaría SICTFRH de la UNER al PID 2071-2. Esta investigación fue parcialmente financiada por del subsidio UBACYT B101.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arteche García, A. (1998) *Fitoterapia* 3ª edic. Edit. Masson. Barcelona.
- Lust, J. (1974) *The Book of Herbs*. Bantam Books. New York.
- Brandão, M. (1993) *Ciencia das Plantas Daninhas* 1 (2): 3-10. Londrina
- Martínez Crovetto, R. N. (1964) *Bonplandia* 2: 1-28.
- Martínez Crovetto, R. N. (1963) *Bonplandia* 1: 279-333
- Marzocca, A. (1997) *Vademécum de Malezas Medicinales de la Argentina. Indígenas y Exóticas*. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires.
- Berro, M.B. (1899) *La Vegetación Uruguaya*. En: Arechavaleta, J. Anales del Museo Nacional de Montevideo (dir) Tomo II, fasc. 11, 199 págs. Montevideo, Uruguay.
- Penna, C., S. Marino, E. Vivot, M.C. Cruañes, J. de D. Muñoz, J. Cruañes, G. Ferraro, G. Gutkind & V. Martino (2001) *J. Ethnopharmacol.* 77: 37-40.
- López, A., J. Hudson & N. Towers (2001) *J. Ethnopharmacol.* 77: 189-90.
- Zacchino, S., C. Santecchia, S. Lopez, S. Gattuso, J. de D. Muñoz, J. Cruañes, E. Vivot, M. del C. Cruañes, A. Salinas, R.E. de Ruiz & S. Ruiz (1998) *Phytomedicine* 5: 389-95.
- Kott, V., L. Barbini, M. Cruañes, J. de D. Muñoz, E. Vivot, J. Cruañes, V. Martino, G. Ferraro & L. Cavallaro (1999) *J. Ethnopharmacol.* 64: 79-84.
- Alves, T.M.A., F.L.; Ribeiro, H. Kloos & C.L. Zani (2001) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96: 831-3.
- Marin, J.C, F. Torres, W. Quinones & F. Echeverill (2001) *Rev. Lat. Quím.* 29: 100-7 .
- González Torres, D.M. (1992) *Catálogo de Plantas Medicinales Usadas en Paraguay*, Asunción, Paraguay.
- Brandão, M., T. Grandi, E. Rocha, D. Sawyer & A. Kretli (1992) *J. Ethnopharmacol.* 36: 175-82
- Portillo, A., R. Vila, B. Freixa, T. Adzet & S. Cañigüeral (2001) *J. Ethnopharmacol.* 76: 93-8.
- Davyt, D., E. Dellacassa, P. Ferreira, P. Menendez,, P. Moyna & A. Vazquez (1991) *Fitoterapia* 62: 519-21.
- Shimizu, M., S.Horie, M. Arisawa, T. Hayashi, S. Suzuki, M. Yoshizaki, M. Kawasaki, S. Terashimas, H. Tsuji, S. Wadas, H. Ueno, N. Moritan, L.H. Berganza & E. Ferro (1987) *Chem. Pharm. Bull.* 35: 1234-7.
- Debenedetti,S., V. Martino, P. Palacios & J.D. Coussio (1987) *J. Nat. Prod.* 50: 325.
- Bohlman, F, J. Jakupovic, A.K. Dhar, R.M. King & H. Robinson (1981) *Phytochemistry* 20: 1081-3.
- Ubierno, G., H. Taher & E. Talenti (1986) *Anal. Asoc. Quím. Argent.* 74: 567-9.
- Amat, A.G. (1983) *Acta Farm. Bonaerense* 2: 23-36.
- Ono, M, C. Masuoka, Y. Otake, Y. Ito & T. Nohara (2000) *Phytochemistry* 53: 479-84.
- Peluso, G., V. De Feo, F. De Simone, E. Bresciano & M.L. Vuotto (1995) *J. Nat. Prod.* 58: 639-46.
- Guerreiro, E., M.J. Pestchanker, L. Del Vitto & O.S. Giordano (1990) *Phytochemistry* 29: 877-9.
- Jakupovic, J., L.N. Misra, T.V. Chau Thi, F. Bohlmann & V. Castro (1985) *Phytochemistry* 24: 3053-5.
- Farmacopea Nacional Argentina* (1978) 4ª ed., Buenos Aires, Argentina.
- Gutkind, G., C. Norbedo, M. Mollerach, G. Ferraro, J.D. Coussio & R. de Torres (1984) *J. Ethnopharmacol.* 10: 319-21.