

## ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DEL RUIBARBO (*Rumex conglomeratus*)

### RESUMEN

Los extractos y fracciones etanólicos de las raíces, hojas y espigas del *Rumex conglomeratus* presentaron actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La fracción etérea de espigas fue activa contra *Escherichia coli* ATCC 25922. Las contraplacas de la bioautografía tratadas con fluorescencia y vapores de amoníaco sugieren la presencia de flavonoides y quinonas.

**PALABRAS CLAVES:** Actividad antibacteriana, *Rumex conglomeratus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

### ABSTRACT

The ethanolic extracts and fractions from roots, leaves and spikes of *Rumex conglomeratus* presented inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ethereal fraction of spikes was active against *Escherichia coli* ATCC 25922. The Bioautography plates treated with fluorescence and ammoniac steam suggested the presence of flavonoids and quinones.

**KEYWORDS:** Antibacterial activity, *Rumex conglomeratus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

### 1. INTRODUCCIÓN

La utilización de plantas medicinales en nuestro medio, y el hecho que en gran cantidad de vegetales se encuentran principios activos empleados en el tratamiento de diversas enfermedades, ha incrementado el interés por su estudio. La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima que el 80% de los más de 4.000 millones de habitantes de la tierra confían en las medicinas tradicionales para suplir sus principales necesidades de salud.

La actividad antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes anti-infectivos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales con una base científica [1].

Muchos países se han involucrado en la obtención de medicamentos a partir de las plantas. A su vez, la OMS ha estimado que el 80% de los habitantes de los países en vía de desarrollo dependen de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud [2]; los países tercermundistas poseen los primeros lugares en estos programas de estudio para garantizar la obtención de preparados asequibles a toda la población. Países como Cuba, han establecido un plan para mejorar la salud en la población. Esto abarca la erradicación y prevención de gran cantidad de enfermedades mediante el uso de medicamentos alternativos obtenidos de plantas, los cuales son de bajo costo con alta disponibilidad [3].

El Ruibarbo pertenece a la familia poligonácea que contiene derivados del metilantraceno, quinonas, y compuestos fenólicos que han sido reportados como antibacterianos promisorios. En Colombia se usa la

**LUZ S. RAMIREZ A. PhD.**

Profesora Asociada, Grupo Polifenoles UTP.

Universidad Tecnológica de Pereira.

luramire@utp.edu.co

**HILDA E. DIAZ B. MSc.**

Profesora Transitoria. Universidad de Caldas.

hdiaz@gmail.com

infusión del ruibarbo para el tratamiento de diarreas y lesiones de la piel principalmente. Por esta razón en el presente trabajo se quiso validar su efecto antibacteriano

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Material vegetal

La recolección del material vegetal (*Rumex conglomeratus*) sano se realizó en varios sectores en la vía al nevado del Ruiz a una altitud de 2700 m.s.n.m. Un ejemplar se encuentra en el Herbario Nacional de Colombia con el número voucher COL 347185.

#### 2.2 Método de extracción

El material recolectado se secó al ambiente por 10 días, luego se separó en raíces, hojas y espigas. Se molió hasta obtener 1000 g de polvo uniforme. Se depositó cada parte de la planta en un frasco con etanol al 95% a temperatura ambiente, cubriendo la totalidad del material y haciendo pasar el solvente repetidas veces por el material, seguido de una filtración en frío hasta la obtención del extracto incoloro. El homogenizado obtenido fue concentrado en rotaevaporador a presión reducida, el cual se sometió a fraccionamiento líquido-líquido con éter de petróleo, decantando y extrayendo sustancias poco polares. Al residuo se le adicionó 20 mL de diclorometano durante 5 veces con agitación continua, decantando y llevando a sequedad en evaporador rotatorio hasta obtener la fracción en diclorometano. A las fracciones anteriores se les realizó bioautografía en CCD, pruebas de actividad antibacteriana y determinación de la concentración mínima inhibitoria MIC.

Las fracciones en diclorometano y etérea se sometieron a separación en cromatografía de columna sobre sílica gel

con diferentes solventes, obteniéndose seis fracciones en cada caso; a cada una de las cuales se les realizaron pruebas de sensibilidad y bioautografía en CCD. A las fracciones que dieron actividad antibacteriana promisorias se les realizaron pruebas de caracterización química, para identificación de fenoles, enlaces glicosídicos y quinonas.

### 2.3 Evaluación de la actividad antibacteriana

Se determinó la actividad antibacteriana del extracto etanólico total seco y fracciones etéreas y diclorometano utilizando las cepas de microorganismos Gram positivos *Staphylococcus aureus*, Gram negativos *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando el método de difusión en agar.

Se preparó el inóculo de cada bacteria ajustada al tubo 0,5 de MacFarland equivalente a  $1 \times 10^6$  UFC/mL. En el centro de la caja de petri con agar Mueller Hinton solidificado, se realizó una perforación con sacabocado (0,5 cm de diámetro), con ayuda de una pipeta se adicionaron 10  $\mu$ L de agar para sellar el pozo. Se sembró una bacteria Gram positiva y dos Gram negativas en cajas independientes y luego se adicionó en el pozo una concentración de 500  $\mu$ g/mL del extracto etanólico. De igual forma se ensayó para las fracciones etérea y en diclorometano. Las placas se incubaron y observaron a 37 °C por 24 horas para determinar inhibición del crecimiento.

#### 2.3.1 Medio de cultivo

Se utilizó agar Mueller-Hinton, teniendo en cuenta que en este medio crecen bien la mayor parte de las bacterias patógenas. Se adicionaron 20 mL por placa, posteriormente se solidificó y realizaron cinco perforaciones por caja con ayuda de sacabocado.

#### 2.3.2 Controles

Como control positivo se utilizó ampicilina 10  $\mu$ g/mL para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, gentamicina 10  $\mu$ g/mL para *Pseudomonas aeruginosa* y DMSO como control negativo.

#### 2.3.3 Preparación del inóculo

A partir de una placa de cultivo en crecimiento activo con ayuda de un asa bacteriológica se tomaron cinco colonias y se inocularon en solución salina estéril, ajustando el inóculo a una turbidez equivalente a 0,5 en escala de MacFarland, incubándose a 35 °C durante 24 horas.

### 2.4 Inoculación de cajas

Transcurridas 24 horas, se comprobó la concentración y viabilidad de las células por medio de dilución en placa. se preparó el extracto a una concentración de 500  $\mu$ g/mL. Las cepas utilizadas se adquirieron en el Instituto Nacional de Salud identificadas como *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Typed Culture Colective), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Estas cepas liofilizadas se reconstituyeron con 10 mL de caldo nutritivo, incubadas a 37 °C por 24 horas. Para

la evaluación de la actividad antibacteriana se utilizaron dos métodos.

#### 2.4.1 Método uno

Se toman 0.5 mg de cada extracto y se diluyen a 1 mL con DMSO, se mezclaron 1 mL de la suspensión bacteriana y 20 mL de agar Mueller Hinton fundido a 45 °C y a un pH entre 7.2 y 7.4. Después de solidificado el medio se abrieron 3 pozos con un sacabocado de 0.5 cm de diámetro, posteriormente se selló con 10  $\mu$ L de agar en el fondo y se colocaron en cada pozo 20  $\mu$ L de cada uno de los extractos a una concentración de 500  $\mu$ g/mL. Se incubó a 37 °C por 24 horas y luego se evaluó el crecimiento de los microorganismos alrededor del pozo.

#### 2.4.2 Método dos

Con el fin de evaluar la difusibilidad del extracto, se colocaron 2 mL del extracto en una caja de petri estéril, se adicionaron 20 mL de agar Mueller Hinton a 45 °C, se dejó solidificar y luego se hicieron tres pozos con sacabocado, en cada pozo se colocó 15  $\mu$ L de la suspensión bacteriana de cada una de las cepas a evaluar. Se incubaron a 37 °C, durante 24, 48 y 72 horas, efectuando las lecturas correspondientes. Se realizaron dos mediciones desde la línea que define el halo de inhibición de un lado al otro el tamaño de la inhibición y se tomó como resultado el valor promedio de estas mediciones para calcular el porcentaje de inhibición relativo.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{D. halo del extracto} - \text{D. halo blanco})}{(\text{D. halo control positivo} - \text{D. halo blanco})} \times 100$$

Diámetro del control = Ampicilina 30 mm

Diámetro del blanco = DMSO 5 mm

### 2.5 Bioautografía

Los extractos que dieron positivos por los métodos anteriores, se les realizaron bioautografías por el método antisandwich sembrando dos placas cromatográficas de 7 cm de largo x 2.5 cm de ancho con cada uno de los extractos. Se corrió el extracto etanólico en acetato de etilo, la fracción etérea en diclorometano y la fracción en diclorometano en la mezcla diclorometano-metanol (9:1). Luego se colocó cada una de las placas en contacto con la caja que contenía 1 mL de la suspensión bacteriana y 20 mL de agar Mueller Hinton previamente solidificado, de tal forma que la sílica gel con el extracto corrido quedaba en contacto con el agar. Se incubó a 37 °C por 24, 48 y 72 horas. Y luego se evaluó la presencia de halos de inhibición en la caja de cultivo.

También se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) empleando el método de diluciones seriadas dobles en medio líquido. Se empleó caldo triptonsoya como medio de cultivo. La concentración donde no se observó crecimiento bacteriano fue tomada como la CMI

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos y fracciones de hojas, raíces y espigas del *Rumex conglomeratus* mostraron actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus* y la fracción etérea de espigas, también inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* lo cual fue comprobado por ambos métodos. Aunque es menos eficiente el método dos ya que la cantidad de extracto que se utiliza es muy alta.

#### 3.1 Evaluación de la actividad antibacteriana

Las pruebas de actividad antibacteriana realizadas por bioautografía muestran que en el extracto etanólico de raíces se encuentra un halo de inhibición en el punto de aplicación y otro con Rf 0.68. Esta última mancha de baja polaridad manifiesta actividad incrementada en la fracción etérea, debido a un aumento en la concentración, mientras que desaparece en la fracción en diclorometano. El halo de inhibición que se observó en el punto de aplicación fue constante en las 3 placas, pero su actividad fue incrementada en la placa en diclorometano por presentar un halo de mayor diámetro.

En la figura 1 se presentan los porcentajes de inhibición de los extractos etanólico, etéreo y en diclorometano contra *Staphylococcus aureus* a 500 µg/mL.

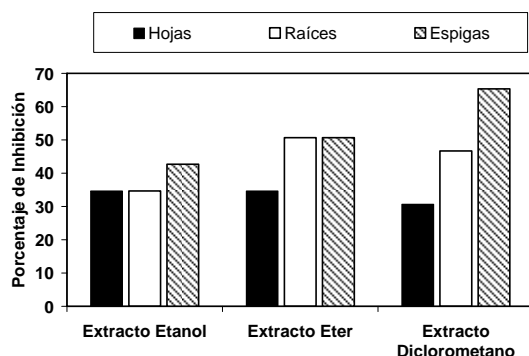


Figura 1. Porcentaje de inhibición extracto etanólico, etéreo y diclorometano de *Rumex conglomeratus* frente a *Staphylococcus aureus*.

La actividad antibacteriana de *Rumex conglomeratus* no depende de un solo compuesto, ya que en las bioautografías de cada uno de los órganos se observaron halos de inhibición correspondientes a compuestos de diferente polaridad.

El compuesto de baja polaridad analizado en raíces, hojas y espigas de la fracción etérea del ruibarbo es diferente ya que dichas fracciones fueron corridas en diclorometano y sus Rf tienen valores de 0.6, 0.23 y 0.51, respectivamente. Además, el compuesto de bajo polaridad presente en la fracción etérea de espigas fue el único que presentó actividad contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, y las de raíces y

hojas solo presentan actividad contra *Staphylococcus aureus*.

La tabla 1 muestra la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos, fracciones etérea y en diclorometano de hojas, raíces y espigas de *Rumex conglomeratus* frente a *Staphylococcus aureus*.

MUESTRA		CMI (µg/mL)				
		500	250	150	100	50
HOJAS	Extracto Etanólico	+	+	+	-	
	Fracción Etérea	+	+	+	-	
	Fracción Diclorometano	+	+	+	-	
RAÍCES	Extracto Etanólico	+	+	+	-	
	Fracción Etérea	+	+	+	+	-
	Fracción Diclorometano	+	+	+	-	
ESPIGAS	Extracto Etanólico	+	+	+	-	
	Fracción Etérea	+	+	+	-	
	Fracción Diclorometano	+	+	+	-	

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria.

En la fracción etérea de espigas el compuesto responsable de la actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* es el mismo y aparece con un valor de Rf de 0.51 en un sistema de CCD-sílica gel-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

En espigas, los compuestos responsables de la inhibición se concentran en la fracción en diclorometano y comparando raíces, hojas y espigas, estas últimas presentan mayor actividad antibacteriana contraria a la creencia popular que usan las hojas para combatir infecciones. Sin embargo la CMI más baja frente a *S aureus* se presenta en el extracto etéreo de raíces 100 (µg/mL)

De acuerdo con la separación por cromatografía en columna del extracto proveniente de las hojas, donde ninguna de las fracciones obtenidas como F1 a F6 dio positivas en la bioautografía, pero en el extracto total hace suponer un efecto sinérgico.

En el presente trabajo se encontraron actividades inhibitorias hasta el 68% en el extracto en diclorometano de espigas frente a *Staphylococcus aureus* lo cual puede sugerir una buena fuente de productos potenciales como antibacterianos frente a microorganismos Gram positivos, en tanto que el porcentaje de inhibición frente a microorganismos Gram negativos no superó el 50%, en ninguna de las partes evaluadas. Lo anterior está de acuerdo con muchas investigaciones donde se demuestra que los microorganismos Gram positivos son mas sensibles que los Gram negativos.

Los compuestos activos aparecen en un alto grado de

polaridad, lo cual es consistente con la descripción química donde se hace referencia a compuestos tales como quinonas y flavonoides. Esto se confrontó con pruebas químicas preliminares realizadas que demostraron la presencia de estos compuestos en las fracciones evaluadas.

#### 4. BIBLIOGRAFÍA

---

**1 López R, Alvarez M, López T, González J.** 1997. Actividad antifúngica in vitro de *Pinus caribaea*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2:25-29.

**2 Mongeli E, Pomilio A.** 2002. Nuevos medicamentos y etnomedicina del uso popular a la industria. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la asociación ciencia hoy*, 12:2-3.

**3 Martínez J, Molina N, Boucourt E.** 1997. Evaluación de la actividad antimicrobiana de *Psidium guajava*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2:12-14.