

Actividad antimicrobiana de *Verbesina encelioides*

TORIBIO, M.S.¹; ORIANI, D.S.²; FERNÁNDEZ, J.G.¹; SKLIAR, M.I.³

RESUMEN

Verbesina encelioides (Cav.) Benth. & Hook. (Compuestas) es una especie ampliamente distribuida en la Argentina, que se conoce vulgarmente con el nombre de «girasolcito» o «mirasolcito del campo», debido a que presenta flores amarillas en capítulos terminales pedunculados. El objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad antimicrobiana de esta especie frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y *Candida albicans*. Se utilizaron concentraciones crecientes del extracto vegetal para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el método de dilución en caldo y la concentración bactericida mínima (CBM). Para la determinación de la actividad antimicrobiana, fueron utilizados los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Proteus spp.*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. Los resultados obtenidos, bajo nuestras condiciones de trabajo, demuestran que el extracto metanólico de los capítulos de *Verbesina encelioides* presenta actividad antimicrobiana más notoria sobre microorganismos Gram positivos y *Candida albicans* que contra bacterias Gram negativas, no mostrando actividad contra *Citrobacter freundii*.

Palabras clave: (*Verbesina encelioides*), (actividad antimicrobiana), (CIM), (CBM).

¹Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam. Argentina, ²Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam. Argentina, ³Cátedra de Química Biológica. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLPam. y Cátedra de Farmacognosia. Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. UNS. Argentina.

Recibido: junio 2004 - Aceptado: noviembre 2004 - Versión on line: diciembre 2004

Antimicrobial activity of *Verbesina encelioides*

SUMMARY

Verbesina encelioides (Cav.) Benth. & Hook. (Compositae) is a species broadly distributed in Argentina commonly known as «girasolcito» or «mirasolcito del campo» because it presents yellow flowers in pedunculate terminal heads. The objective of the present work is to evaluate the antimicrobial activity of this species against Gram positive and Gram negative bacteria and *Candida albicans*. Increasing concentrations of the vegetable extract were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) by means of dilution in culture broth method, and the minimum bactericide concentration (MBC). To determine the antimicrobial activity, the following microorganisms were used: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus agalactiae*, *Salmonella typhimurium*, *Citrobacter freundii*, *Proteus spp.*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*. These results, obtained under our working conditions, demonstrate that the methanolic extract of the heads of *Verbesina encelioides* has a more notorious antimicrobial activity against Gram positive microorganisms and *Candida albicans* than against Gram negative bacteria, having no activity against *Citrobacter freundii*.

Key words: (*Verbesina encelioides*), (antimicrobial activity), (MIC), (MBC).

INTRODUCCIÓN

Desde la producción de penicilina, en 1941, hasta la actualidad, los antibióticos han curado millones de infecciones que pudieron haber sido letales. Sin embargo, el uso indiscriminado y muchas veces erróneo ha contribuido a la selección de microorganismos resistentes⁴. Todos los antibióticos usados en la actualidad, incluyendo los nuevos agentes, tales como estreptograminas y la nueva generación de fluoroquinolonas, están sujetos a la aparición de resistencia. La urgente necesidad de hacer frente al problema de la resistencia ha llevado a investigadores y a la industria farmacéutica a buscar nuevas sustancias con actividad antimicrobiana.

Las plantas superiores han constituido durante siglos la principal fuente de agentes medicinales, y muchas de ellas fueron útiles como quimioterápicos. El enfoque etnomédico ha

demostrado ser el más efectivo de todos para el descubrimiento de nuevas drogas⁹. En este sentido, Toursarkissian¹³ menciona que *Verbesina encelioides* (Cav.) Benth. & Hook. presenta actividad como antihemorrágico y cicatrizante, mientras que Roig¹¹ le adjudica propiedades como oftálmico, oxitócico y vulnerable.

La especie *Verbesina encelioides* pertenece a la familia de las Compuestas, está ampliamente distribuida en la Argentina, es dominante en algunas áreas de cultivo, rara en el campo natural y es frecuente encontrarla próxima a las viviendas humanas³. Se conoce vulgarmente con el nombre de «girasolcito» o «mirasolcito del campo», debido a que presenta flores amarillas en capítulos terminales pedunculados². Florece y fructifica desde fines de la primavera hasta el otoño³.

Jain et al.⁷ evaluaron la actividad antiviral, antimicrobiana, antifúngica, antitumoral e hipoglucemiante de *Verbesina encelioides*

recolectada en la India. Otras investigaciones revelaron la presencia de tres flavonoides glicosídicos aislados de extractos de flores y hojas: quercetina-3-galactósido, quercetina-3-galactósido-7-glucósido y quercetina-3-xylósido-7-glucósido⁶. También se aislaron triterpenoides como acetato de pseudotaraxasterol, pseudotaraxastenona, pseudotaraxasterol, hentriacontol, beta-sitosterol y beta-sitosterol-D(+)-glucósido¹², el alcaloide galegina (3-metil-2-butenil-guanidina)¹⁰ y N-(2,3 dihidroxy-3-metilbutil)-acetamida⁵.

El objetivo de este trabajo fue determinar si la especie vegetal *Verbesina encelioides* que crece en la provincia de La Pampa tiene actividad antimicrobiana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Los capítulos de *Verbesina encelioides* (Cav.) Benth. & Hook. fueron recolectados en el mes de marzo en la zona rural de General Pico, Departamento Maracó, Provincia de La Pampa, Argentina. Un ejemplar fue identificado por el profesor P. E. Steibel, depositado en el Herbario de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa, Santa Rosa, y registrado como M. Toribio 1, SRFA. Los capítulos se secaron en estufa a 35 °C durante 2 días.

Preparación del extracto metanólico

Se colocaron 12 g del material vegetal seco en 300 ml de agua destilada en ebullición durante 20 minutos. Luego que el producto fue filtrado por gasa se repitió el procedimiento anterior a partir del mismo marco (2x). Las soluciones se llevaron a sequedad con rotavapor a presión reducida, obteniéndose 7,57 g de residuo seco (rendimiento 63 %). El extracto acuoso seco fue retomado con 60 ml de metanol. El producto

obtenido se filtró por papel de filtro. Posteriormente se realizaron dos extracciones metanólicas más a partir del mismo marco (3x). Los extractos metanólicos se llevaron a sequedad con rotavapor a presión reducida, obteniéndose 2,04 g de residuo seco (rendimiento 17 %). Al momento de realizar el ensayo se resuspendió el extracto metanólico seco con 5 ml de agua destilada estéril, obteniéndose una solución.

Microorganismos utilizados

Para la determinación de la actividad antimicrobiana fueron utilizadas las siguientes cepas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus intermedius* (Centro de Investigación y Desarrollo de Fármacos. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam., CIDEF), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptococcus agalactiae* (CIDEF), *Salmonella typhimurium* (Collection OMS 2/86), *Citrobacter freundii* (Collection BE 161/90), *Proteus spp.* (CIDEF), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (6615).

Determinación de la Concentración

Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM)

Se determinó la CIM⁸ mediante el método de dilución en caldo en tubos con medio de cultivo Mueller-Hinton (Laboratorio Britania, Buenos Aires, Argentina). Con la solución obtenida proveniente del extracto metanólico se ensayaron las siguientes diluciones: 50, 100, 150, 200, 250, 300 y 350 ul que corresponde a 204, 408, 612, 816, 1020, 1224 y 1428 mg de extracto metanólico seco por ml de solución respectivamente. Los tubos fueron inoculados según Bauer et al.¹ con 10⁶ UFC/ml aproximadamente, según estándar de turbidez de Mac Farland, luego fueron incubados a 37°C durante 24 h. Todas las determinaciones fueron realizadas por duplicado, y se utilizaron como

referencia estándar Cloranfenicol (Sigma C-0378, Lote 92H0288) y Nistatina (Sigma N-3503, Lote 33H0762). Para evaluar el efecto bactericida del extracto metanólico se determinó la CBM⁸. Se tomó 0,1 ml de los tubos que en la determinación de la CIM no presentaban turbidez y se cultivaron en placas de Petri con agar Mueller-Hinton (Laboratorio Britania). Se incubaron a 37°C durante 24 h y posteriormente se realizó el recuento de UFC/ml.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra la actividad antimicrobiana que presenta el extracto metanólico de capítulos secos de *Verbesina encelioides*. *S. aureus* fue el más sensible de los diez microorganismos investigados, ya que presentó valores de CIM y CBM de 408 mg/ml en ambos casos, seguido de *S. agalactiae* con

408 y 612 mg/ml para CIM y CBM respectivamente. Similares valores de concentración inhibitoria mínima presentó *Candida albicans*. *Salmonella typhimurium*, *Proteus spp* y *Escherichia coli* se mostraron como los menos sensibles con valores de CIM de 1428 mg/ml, mientras que con *S. epidermidis*, *S. intermedius* y *Pseudomonas aeruginosa* se alcanzaron valores medios tanto para CIM como para CBM. El extracto metanólico de *Verbesina encelioides* no presentó actividad antimicrobiana para *Citrobacter freundii*, bajo nuestras condiciones de trabajo.

CONCLUSIÓN

No existen trabajos de referencia sobre actividad antimicrobiana de esta maleza que nos permitan comparar los resultados obtenidos. Si bien Jain et al.⁷ evaluaron la actividad

Tabla 1: Actividad antimicrobiana de *Verbesina encelioides*.

Microorganismos	Inóculo	CIM (mg/ml)	CBM (mg/ml)	Clor ^a	Nist ^b
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,4x10 ⁶	408	408	S	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3,4x10 ⁴	816	816	S	-
<i>Staphylococcus intermedius</i>	9,4x10 ⁴	816	816	S	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,0x10 ⁴	816	816	S	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	4,4x10 ⁵	408	612	S	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	10x10 ⁴	1428	-	S	-
<i>Citrobacter freundii</i>	2,6x10 ⁵	-	-	S	-
<i>Proteus spp</i>	4,0x10 ⁵	1428	-	S	-
<i>Escherichia coli</i>	1,2x10 ⁵	1428	-	S	-
<i>Candida albicans</i>	4,0x10 ⁴	408	-	-	S

Las dosis expresadas en mg/ml de la Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima se calcularon a partir del rendimiento del extracto metanólico proveniente de 12 g de capítulos secos de *Verbesina encelioides*.

^aCloranfenicol: 10 mg/ml

^bNistatina: 500 UI/ml

S: sensible, (-): no presenta actividad.

antimicrobiana de *Verbesina encelioides* recolectada en Jaipur (India), utilizaron el método de difusión en agar y no aclararon cuáles cepas de colección usaron.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que el extracto metanólico de los capítulos de *Verbesina encelioides* presentan actividad antimicrobiana especialmente sobre microorganismos Gram positivos y *Candida albicans*, ya que el extracto fue más eficiente contra *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae*, que contra bacterias Gram negativas. Estos resultados, entre otros, aportan evidencia que nos permitirá continuar con los estudios tendientes a purificar la muestra e intentar aislar el o los principio/s activo/s.

BIBLIOGRAFÍA

1. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TRUCK, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol. 45: 493-496.
2. CABRERA, A.L.; ZARDINI, E.M. Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires. Segunda edición. Editorial Acme S.A.C.I., Buenos Aires, Argentina, 1993, pág. 660-661.
3. CANO, E. Pastizales naturales de La Pampa. Descripción de las especies más importantes. Convenio AACREA-Provincia de La Pampa, Argentina, 1988, Vol. I, pág. 92-93.
4. CHAMBERS, H.F.; SANDE, M.A. -Fármacos antimicrobianos. En: GOODMAN & GILMAN - Las bases farmacológicas de la terapéutica. Novena edición. McGraw-Hill- Interamericana, México, 1998, Vol. II, pág. 1095.
5. EICHHOLZER, J.V.; LEWIS, I.A.S.; MACLEOD, J.K.; OELRICHS, P.B.; VALLELY, P.J. 1982. Galegine and dihydroxyalkyl acetamide from *Verbesina encelioides*. Phytochemistry 21: 97-100.
6. GLENNIE, C.W.; JAIN, S.C. 1980. Flavonol 3,7-diglycosides of *Verbesina encelioides*. Phytochemistry, 19: 157-158.
7. JAIN, S.C.; PUROHIT, M.; SHARMA, R. 1988. Pharmacological evaluation of *Verbesina encelioides*. Phytother. Res. 2: 146-148.
8. LEIVA, J. -Determinación de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima bactericida. En: DÍAZ, R., GAMAZO, C., LÓPEZ-GOÑI, I. - Manual Práctico de Microbiología. Editorial Masson, España, 1995, pág. 127-132.
9. MONGELLI, E.R.; POMILIO, A.B. 2002. Nuevos medicamentos y etnomedicina. Del uso popular a la industria farmacéutica. Ciencia hoy 12: 52-66.
10. OELRICHS, P.B.; VALLELY, P.J. 1981. Isolation of galegine from *Verbesina encelioides*. J. Nat. Prod. 44: 754-755.
11. ROIG, F.A. Flora Medicinal Mendocina. Las plantas medicinales y aromáticas de la provincia de Mendoza. Argentina. Universidad Nacional de Cuyo. EDIUNC, 2001, pág. 91.
12. TIWARI, H.P.; RAO, V.S. 1978. Constituents of *Verbesina encelioides* isolation of triterpenoids from a *Verbesina* sp. Indian Journal of Chemistry, Section B Organic Chemistry, Including Medicinal Chemistry 16: 1133.
13. TOURSARKISSIAN, M. Plantas medicinales de la Argentina. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina, 1980, pág. 41.