

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOCIDA DE CINCO ESPECIES DEL GÉNERO *Acalypha* (*A. guatemalensis*, *A. arvensis*, *A. polystaquia*, *A. hispida* y *A. pseudoalopecuroides*)

Mayra Jiménez,¹ Sully M. Cruz¹ y Armando Cáceres²

¹Escuela de Química Farmacéutica, ²Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia,
Universidad de San Carlos de Guatemala.

RESUMEN

La investigación tuvo como propósito contribuir al estudio biológico y fitoquímico de las plantas medicinales utilizadas popularmente en Guatemala, por lo que resultó interesante seleccionar cinco especies del género *Acalypha* (*Acalypha guatemalensis*, *Acalypha arvensis*, *Acalypha polystaquia*, *Acalypha hispida* y *Acalypha pseudoalopecuroides*) conocidas popularmente como Hierba de cáncer.

Se evaluó la actividad biocida y se demostró que existe actividad significativa para *A. polystaquia*, *A. arvensis* y *A. guatemalensis* contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 274853 y *Cryptococcus neoformans* C13 a una concentración de 1 mg/mL y de 0.5 mg/mL para *A. arvensis*, *A. guatemalensis* y *A. pseudoalopecuroides*.

Ninguna de las especies presentó actividad contra las larvas de *Aedes aegypti* y *Anophles albimanus*. Se identificaron los metabolitos secundarios presentes en los extractos, los cuales fueron: flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, saponinas, principios amargos y cardenólidos.

INTRODUCCIÓN

La naturaleza es una fuente de materias primas para el descubrimiento de nuevas moléculas que pueden actuar como tratamientos alternativos, así como también la elaboración de nuevos medicamentos. El interés mundial por las plantas como fuentes de materia prima ha ocasionado que se realicen investigaciones para determinar los compuestos químicos responsables de la actividad biológica.

Se han realizado estudios de la actividad antimicrobiana del género *Acalypha*, principalmente de la especie *A. guatemalensis* en los cuales se hace referencia que dicha especie posee actividad biocida. En la base de datos NAPRALERT se reporta que esta especie presenta actividad biológica demostrable (1-7).

Para la determinación de la actividad biocida se utilizó el método descrito por Mitscher *et al.*, el cual consiste en una distribución homogénea del extracto etanólico en agar y la actividad biocida se determina por el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras inoculadas en las superficie de los medios (8-10).

El propósito de realizar esta investigación fue contribuir al estudio de plantas medicinales, para dar nuevas alternativas terapéuticas en enfermedades infecciosas causadas por microorganismos, por medio de la evaluación de la actividad biológica del extracto etanólico de las cinco especies del género *Acalypha* y así comparar el poder inhibitorio de las especies en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del extracto

Las plantas seleccionadas para este estudio son conocidas popularmente como Hierba del cáncer, algunas con muy pocos estudios realizados, la mayoría nativas de Guatemala y provenientes de Quiché, Huehuetenango, Chimaltenango, Sacatepéquez, Sololá y Quetzaltenango.

El material seco de cada especie fue 136.8 g, 150 g, 150 g, 200 g y 150 g para *A. hispida*, *A. arvensis*, *A. pseudoalopecuroides*, *A. guatemalensis* y *A. polystaquia* respectivamente (Figura 1). Para la obtención del extracto etanólico se realizó por concentración utilizando un rotavapor marca Büchi.



*Acalypha
alopecuroides*



*Acalypha
guatemalensis*



Acalypha hispida

Figura 1: Especies del género *Acalypha* utilizadas en el estudio

Actividad biocida

Se realizó un estudio no probabilístico a conveniencia, utilizando estadística no paramétrica, si presenta crecimiento no hay actividad y si no presentó crecimiento hay actividad. Se realizaron cuatro réplicas por especie y luego se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la actividad bactericida y antifúngica (11,12), cuatro réplicas para determinar la concentración letal 50 (CL₅₀) en la actividad citotóxica y concentración letal 100 (CL₁₀₀) para actividad larvicida.

El análisis estadístico se hizo por medio de la prueba de hipótesis de una variable binomial con un nivel alfa de 0.10.

Los microorganismos utilizados fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, *Candida albicans* ATCC 10231, *Cryptococcus neoformans* C13, larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*, y nauplios de *Artemia salina*. (12).

Determinación de metabolitos secundarios

Se realizó la determinación de alcaloides, flavonoides,

antrociyaninas, antraquinonas, cumarinas, cardenólidos, bufadienólicos, principios amargos, taninos, glicósidos cianogénicos y aceites volátiles por medio de Rf, ensayados en macro y semimicro de reacciones de coloración y precipitación.

RESULTADOS

Rendimiento de las plantas en estudio

En la Tabla 1 se observan las cantidades de material vegetal seco, la cantidad de extracto obtenido y el porcentaje de rendimiento de cada planta.

Determinación de la actividad biocida

Fase de tamizaje

Se determinó la actividad de cada uno de los extractos etanólicos obtenidos contra bacterias Gram positivo (*B. subtilis* y *S. aureus*), bacterias Gram negativo (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. typhi*) y hongos levaduriformes (*C. albicans* y *C. neoformans*) (Tabla 1).

Tabla 1. Rendimiento de los extractos utilizados y tamizaje de la actividad antibacteriana de las plantas en estudio

Planta	Material vegetal (g)	Extracto (g)	Rendimiento (%)	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>A. hispida</i>	136.8	13.59	9.93	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. arvensis</i>	150	3.73	2.48	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>A. pseudoalopecuroides</i>	150	9.50	6.33	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>A. guatemalensis</i>	200	24.97	12.48	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>A. polystaquia</i>	150	8.10	5.39	-	-	-	-	+	-	+	-

Bacterias Gram positivo (D: *B. subtilis* y A: *S. aureus*), bacterias gram negativo (H: *E. coli*, E: *P. aeruginosa* y B: *S. typhi*), hongos levaduriformes (F: *C. albicans* y G: *C. neoformans*) y micobacterias (C: *M. smegmatis*). (+) No hay crecimiento o actividad positiva; (-) Si hay crecimiento o actividad negativa

Según lo observado en la Tabla 2, las especies de *A. arvensis*, *A. guatemalensis*, *A. pseudoalopeculoides* y *A. polystaquia* tiene actividad positiva contra *P. aeruginosa* y *C. neoformans*. Estos mismos no presentaron actividad contra el resto de los microorganismos.

Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)

Se determinó la CIM de los extractos que presentaron actividad en la fase de tamizaje. Los resultados se observan en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentración inhibitoria mínima de los extractos positivos (mg/mL)

Especie	E	G
<i>A. arvensis</i>	1	1
<i>A. pseudoalopeculoides</i>	1	0.5
<i>A. guatemalensis</i>	1	1
<i>A. polystaquia</i>	1	1

Determinación de la actividad larvicida

Esta prueba se realizó con los extractos etanólicos contra larvas de los mosquitos *A. aegypti* y *A. albimanus* de 24 horas de vida, mediante un ensayo en placa y por triplicado. Se estableció que la actividad positiva era considerada si el extracto en estudio provocaba la muerte del 100% de las larvas presentes en los pozos en placa. Se estableció que la CL_{100} es mayor de 1 mg/mL (Tabla 3).

Determinación de la actividad citotóxica contra *A. salina*

En la Tabla 3 también se muestran los resultados obtenidos en el bioensayo contra *A. salina* de las especies en estudio.

Se observó que los extractos etanólicos presentan actividad citotóxica menor a 2 mg/mL, se realizó nuevamente la prueba utilizando diferentes concentraciones (1, 0.5 y 0.25 mg/mL) para obtener a través del programa Finney la CL_{50} .

Tabla 3. Actividad larvicida y citotóxica contra nauplios de *A. salina*

Especie	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albimanus</i>	Nauplios muertos por dosis			DL ₅₀	Intervalo de confianza
			1	0.5	0.25 mg/mL		
<i>A. hispida</i>	-	-	6	3	1	0.79	0.346-0.628
<i>A. arvensis</i>	-	-	5	4	3	0.99	0.134-0.478
<i>A. pseudoalopecuroides</i>	-	-	5	4	2	0.91	1.652-0.036
<i>A. guatemalensis</i>	-	-	4	3	1	1.30	7.649-0.500
<i>A. polystaquia</i>	-	-	5	3	2	1.05	0.261-0.33

Tamizaje fitoquímico

A través de ensayos macro y semimicro y la técnica de cromatografía en capa fina se identificaron los metabolitos secundarios presentes en las hojas de los extractos etanólicos de *A. polystaquia*, *A. hispida*, *A. pseudoalopeculoides*, *A. guatemalensis* y *A. arvensis* (Tabla 4).

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico

Especie	A	B	C	D	E
Saponinas	+	+	+	+	+
Principios amargos	+	+	+	+	+
Cardenólidos	+	+	+	+	+
Flavonoides	+	+	+	+	+
Antrocianinas	+	+	+	+	+
Antraquinonas	+	+	+	+	+
Cumarinas	+	+	+	+	+

A: *A. hispida*, B: *A. arvensis*, C: *A. guatemalensis*,
D: *A. pseudoalopeculoides*, E: *A. polystaquia*; (+) Positivo

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El ensayo *in vitro* para la evaluación de la actividad contra bacterias y levaduras determinó que las especies de *A. arvensis*, *A. guatemalensis* y *A. polystaquia* presentaron actividad significativa a una concentración de 1 mg/mL contra *P. aeruginosa* y *C. neoformans* y a una concentración de 0.5 mg/mL *A. pseudoalopecuroides* presenta actividad, con una probabilidad de 0.062. Por lo que se evidenció que las especies poseen

actividad contra bacterias Gram negativo y hongos levaduriformes a concentraciones mínimas.

En la determinación de la actividad larvicida de las especies se estableció que no presentó actividad con ninguna de las dos especies de mosquitos ensayados.

Con respecto a la actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina* se determinó que las especies presentaron actividad a una CL_{50} de 0.79, 0.91, 1.30, .99 y 1.05 mg/mL. (Tabla 3).

Todas las especies presentaron metabolitos secundarios tales como flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, saponinas, principios amargos y cardenólidos.

CONCLUSIONES

A. arvensis, *A. pseudoalopeculoides*, *A. guatemalensis* y *A. polystaquia* presentaron actividad biocida significativa en la fase de tamizaje.

La concentración inhibitoria mínima es de 1 mg/mL para *A. arvensis*, *A. guatemalensis* y *A. pseudoalopeculoides* contra *P. aeruginosa* y *C. neoformans*.

Ninguno de los extractos ensayados presentaron actividad larvicida contra *A. aegypti* y *A. albimanus*.

Todos los extractos etanólicos de las cinco especies presentaron actividad citotóxica contra nauplios de *A. salina*.

Flavonoides, antocianinas, antraquinonas, cumarinas, saponinas, principios amargos y cardenólidos fueron los metabolitos secundarios identificados en las hojas de las cinco especies del género *Acalypha*.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), al Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, al Laboratorio Farmaya y al Proyecto OEA/AICD/USAC.

REFERENCIAS

1. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: Editorial Universitaria, 1996.
2. Cáceres A. *et al.* 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram positive bacteria. *J. Ethnopharmacol.* 31:193-208.
3. Cáceres A. *et al.* 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatophytic infections. 1. Screening of antimycotic activity of 44 plants extracts. *J. Ethnopharmacol.* 31:263-276.
4. Cáceres A. *et al.* 1991. Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections. 1. Screening of 38 plants extracts for anti-candidal activity. *J. Ethnopharmacol.* 33:277-283.
5. Cáceres A. *et al.* 1987. Screening of anti-microbial activity of plants popularly used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal diseases. *J. Ethnopharmacol.* 20:233-237.
6. Cáceres A. *et al.* 1993. Plants used in Guatemala for the treatment of gastro-intestinal disorders. 3. Confirmation of activity against enterobacteria. *J. Ethnopharmacol.* 38:31-38.
7. Cáceres A. *et al.* 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. 1. Screening of activity to bacteria, fungus and American tripanozomes of 13 natives plants. *J. Ethnopharmacol.* 62:195-202.
8. Myern BN. *et al.* 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plants constituents. *Planta Med.* 45:31-34.
9. Michael A. *et al.* 1956. *Artemia salina* as a test organism bioassay. *Science* 123:264.
10. Mishra SK. *et al.* 1987. Insecticidal and nematocidal properties of microbial metabolites. *J. Indust. Microbiol.* 2:267-276.
11. Mitscher L. *et al.* Antimicrobial agents higher plants. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia* 35:157-166.
12. Mitscher L. *et al.* A modern look at folkloric use anti-infective agents. *J. Nat. Prod.* 5: 1025-1041.
13. Solis PN. *et al.* 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Med.* 59: 250-252.