

Artículo original

Componentes volátiles y actividad antibacteriana del vástago de *Myrcia splendens* (Sw.) DC.

Volatile components and antibacterial activity from *Myrcia splendens* (Sw.) DC. shoots.

Jiménez Dilma¹, Araque María², Rojas Luis³, Cordero Atilio⁴, Briceño Benito⁵.

¹Cátedra de Farmacognosia. ²Laboratorio de Microbiología Molecular. ³Instituto de Investigaciones. ⁴Cátedra de Dermocosmética. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ⁵Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. República Bolivariana de Venezuela.

Recibido mayo 2012 - Aceptado septiembre 2012

RESUMEN

El aceite esencial obtenido por hidrodestilación de los vástagos frescos de *Myrcia splendens* se estudió mediante el análisis de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas. El rendimiento del aceite fue 0,15%, del cual se identificaron 18 sesquiterpenos que constituyen el 97,2% del aceite. Los tres compuestos mayoritarios fueron: germacreno-D (25,3%), *trans*-cariofileno (23,8%) y óxido de cariofileno (10,5%). Este aceite inhibió el desarrollo bacteriano de todas las cepas grampositivas y la mayoría de las bacterias gramnegativas estudiadas con CIM de 64 y 32 µg/ml, respectivamente. Los rangos obtenidos para la CBM (32-512 µg/ml) indican el efecto potencial biocida del aceite esencial de *M. splendens*.

PALABRAS CLAVE

Myrcia splendens, Myrtaceae, vástago, aceite esencial, germacreno-D, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

The essential oil obtained by hydrodistillation from fresh shoots of *Myrcia splendens* was studied by gas chromatography/mass spectrometry. The oil yielded 0.15 % w/v and 18 sesquiterpens were identified (97.2% of the total sample). The main constituents were: germacrene-D (25.3%), *trans*-caryophyllene (23.8%) and caryophyllene oxide (10.5%). This oil was effective against grampositive and gramnegative bacteria with CIM 64 and 32 µg/ml, respectively. The CBM (32-512 µg/ml) indicate the potential biocida of *M. splendens* essential oil.

KEY WORDS

Myrcia splendens, Myrtaceae, shoots, essential oil, germacrene D, antibacterial activity.

INTRODUCCIÓN

Myrtaceae es una familia conformada por 144 géneros y 5744 especies [1], se encuentra distribuida en regiones tropicales, subtropicales y zonas templadas de Australia [2]. El género *Myrcia* DC., está constituido por 368 especies, de las cuales, 53 se reportan en Venezuela [3]. De éstas, *Myrcia acuminata* (Kunth) DC. y *Myrcia fallax* (Rich.) DC. han sido consideradas como especies diferentes [3, 4], sin embargo, estudios recientes realizados por Royal Botanic Gardens, Kew y Missouri Botanical Garden en colaboración con The International Plant Names Index (IPNI), entre otros [5, 6, 7, 8], las consideran sinónimos de *Myrcia splendens* disertación sintetizada y divulgada en la página web The Plant List [1]. Esta página fue creada en el 2010, y en ella se informa sobre el nombre latino aceptado, los sinónimos conocidos y nombres de especies aún no resueltos.

M. splendens es un arbusto o árbol de hasta 12 m, con las ramas jóvenes vellosas o barbadas, hojas glabras con ápice progresiva y largamente acuminado, acumen obtuso o redondo, flores blancas. Fruto oblongo, elíptico obovoide o subglobuloso de color rojo o blanco hasta negro, 6-8 mm de largo [9]. Se distribuye entre los 100 – 2500 m de altitud a lo largo de la selva nublada [3,10].

Para especies del género *Myrcia* se han reportado diversas actividades, tales como: antidiabética en *M.*

uniflora [11], *M. multiflora* [12] y *M. speciosa* [13]; antimicrobiana en *M. myrtifolia* [14]; citotóxica en *Myrcia* sp. nov. [15] y *M. laurotteana* [16]; anticonceptiva y antiinflamatoria en *M. pubiflora* [17]. La composición de los aceites esenciales se ha estudiado en las especies: *M. bracteata*, *M. cuprea* y *M. sylvatica* [18]; *M. arborescens*, *M. hatschbachii*, *M. lajeana*, *M. oblecta*, *M. oligantha*, *M. pubipetala*, *M. richardiana*, *M. rostrata* y *M. selloii*, [19]; *M. acuminatissima*, *M. bombycina*, *M. glabra* y *M. multiflora* [20].

Cabe destacar que bajo el nombre de *M. fallax* se ha estudiado la composición del aceite esencial de las hojas de plantas de Brasil y Venezuela [20, 21], en esta última, además, se estudió la composición y actividad antibacteriana del aceite de las flores [21]. Como *M. splendens* únicamente existen estudios de la composición del aceite en hojas de plantas de Costa Rica y Brasil [22, 23].

En este trabajo se identificaron los componentes volátiles y se determinó la actividad antibacteriana de los vástagos de *M. splendens* que crece en la ciudad Mérida (Venezuela).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal: Los vástagos (hojas y tallos jóvenes) [24] de *M. splendens* fueron recolectados en Mérida (N 08° 35' 21" O 71° 9' 976") a 1507 msnm en julio 2009. La identificación de la muestra vegetal fue efectuada por Benito Briceño; la muestra testigo se encuentra registrada bajo el número 15 (Jiménez M. Dilma–Carmona Juan) en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Extracción del aceite esencial: Los vástagos frescos (1000g) se cortaron en pequeños trozos y se sometieron a hidrodestilación durante 4 horas usando la trampa de Cleverger; el aceite obtenido fue secado con sulfato de sodio anhidro y se almacenó a 4 °C en la oscuridad.

Análisis de la composición del aceite esencial:

Cromatografía de gases (CG): Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer AutoSystem equipado con un detector de ionización de llamas y una columna capilar de sílica 5% fenilmetilpolisiloxano (AT-5, Alltech Associates Inc., Deerfield, IL), 60 m x 0,25 mm, grosor 0,25 µm. La temperatura inicial del horno fue 60 °C. El horno se calentó a razón de 4 °C/min hasta 260 °C manteniéndose esta última temperatura durante 20 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 200 °C y 250 °C respectivamente. El gas portador fue helio a 1,0

ml/min. La muestra fue inyectada en una relación de reparto de 1:10. Los índices de Kovats fueron calculados en relación con una serie de n-alcenos de C₈-C₂₄, y comparados con valores reportados en la literatura [25]. El método de normalización de las áreas de los picos fue usado para calcular el porcentaje de cada compuesto presente en el aceite esencial [26].

Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM): El análisis fue realizado en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 serie II conectado a un detector de masa Hewlett Packard 5973 equipado con un inyector automático HP y una columna capilar HP-5MS de 30 m de largo (0,25 mm id; con una película de 0,25 µm de espesor). La energía de ionización fue de 70 eV. Se inyectó una muestra de un 1 µl de 2 % de solución del aceite en n-heptano con un reparto de 100:1. La identificación de los componentes de la esencia fue establecido de acuerdo a sus índices de retención y por comparación con sus espectros de masa con los espectros de una biblioteca (Wiley, 6ta ed., Nist, 05) [25, 27].

Análisis de la actividad antibacteriana del aceite esencial

Cepas bacterianas: Para la evaluación de la actividad antibacteriana se seleccionaron siete especies representativas de bacterias grampositivas y gramnegativas de referencia internacional, pertenecientes a la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC): grampositivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus subtilis* ATCC 6533; gramnegativas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Typhi ATCC 6539.

Preparación de los inóculos bacterianos: Para la preparación de los inóculos se tomaron varias colonias bacterianas provenientes de un cultivo fresco en un medio básico. Estas colonias fueron resuspendidas en una solución estéril de cloruro de sodio al 0,85%, hasta alcanzar el patrón de turbidez equivalente al 0,5 McFarland (10⁶⁻⁸ UFC/ml). Posteriormente, a partir de estas suspensiones se realizó una dilución 1/10, constituyendo de esta manera el inóculo de trabajo.

Preparación de las diluciones del aceite esencial: A partir de una muestra pura del aceite esencial se realizaron diluciones seriadas en caldo Mueller-Hinton (BBL, Cockeysville, Md, USA) para la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) siguiendo los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011) [28]. El rango estudiado para la detección de la actividad antibacteriana del aceite esencial proveniente de los vástagos de *M. splendens*,

estuvo comprendido entre 0,125 µg/ml a 512 µg/ml. El solvente utilizado para disolver el aceite esencial fue el dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Inoculación y lectura de la prueba: Una vez realizadas las diluciones se procedió a inocular cada uno de los tubos con 1 ml de la suspensión bacteriana realizada anteriormente. Posteriormente, estos tubos fueron incubados a una temperatura de 36 °C en aerobiosis durante 18 horas. Transcurrido este tiempo se realizó la lectura, determinándose como CIM la menor concentración del aceite esencial capaz de inhibir macroscópicamente el crecimiento bacteriano.

A partir de cada una de las diluciones por encima de la correspondiente a la CIM del aceite obtenida ante cada cepa estudiada y del tubo de control del crecimiento bacteriano, se tomaron 100 µl y se inocularon independientemente en placas de agar Mueller-Hinton, luego se incubaron a 36 °C en aerobiosis durante 18 horas. Al cabo de este tiempo se procedió a realizar la lectura de la prueba, determinándose la CBM como la mínima concentración del aceite que sólo permitió la sobrevivencia del 0,1% o menos, del microorganismo probado en comparación con el número de colonias observadas en la placa control.

Para estos ensayos se utilizó la ciprofloxacina (Genven S.A, Venezuela) como control positivo de la inhibición del crecimiento bacteriano y como control negativo se utilizaron tubos con caldo Mueller-Hinton sin el aceite estudiado. Las pruebas de susceptibilidad fueron realizadas por duplicado.

RESULTADOS

La hidrodestilación de los vástagos (hojas y tallos jóvenes) produjo un aceite amarillento-verdoso translúcido, con rendimiento de 0,15% (1,5 ml). El análisis del aceite esencial obtenido por CG-EM permitió la identificación de 18 compuestos que representan el 97,2% de la mezcla, los cuales se muestran en la tabla 1. Los componentes mayoritarios fueron germacreno-D (25,3%), *trans*-cariofileno (23,8%), óxido de cariofileno (10,5%) y biciclogermacreno (7,1%).

El análisis de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *M. splendens* demostró efecto inhibitorio sobre la mayoría de las bacterias analizadas (Tabla 2). Valores de CIM entre 4 y 64 µg/ml inhibieron el desarrollo bacteriano de las cepas grampositivas (*S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 y *B. subtilis* ATCC 6533), mientras que rangos inhibitorios entre 4 a 32 µg/ml del aceite esencial fueron observados en el grupo de bacterias gramnegativas

(*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13076 y *S. Typhi* ATCC 6539). Sin embargo, *P. aeruginosa* ATCC 27853 permaneció viable a una CIM >512 µg/ml. Independientemente de la cepa bacteriana analizada, la CBM del aceite esencial superó en no más de tres rangos de dilución los valores de la CIM.

TABLA 1

Composición química e índices de Kovats del aceite esencial del vástago de *Myrcia splendens*.

Pico N°	Compuesto	Area (%)	IK cal.
1	α -copaeno	2,9	1384
2	β -bourboneno	1,0	1391
3	β -elemeno	0,9	1397
4	<i>trans</i> -cariofileno	23,8	1429
5	β -guaieno	0,7	1454
6	α -humuleno	2,6	1466
7	germacreno-D	25,3	1495
8	β -selineno	1,4	1499
9	biciclogermacreno	7,1	1510
10	germacreno-A	1,9	1518
11	γ -cadineno	1,2	1528
12	δ -cadineno	3,6	1535
13	germacreno-B	4,6	1566
14	espatulenol	3,9	1584
15	óxido de cariofileno	10,5	1589
16	<i>cis</i> - α -copaeno-8-ol	2,9	1638
17	α -cadinol	1,0	1653
18	juniper canfor	1,9	1670

IK cal.: índice de Kovats calculado

TABLA 2

Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM) del aceite esencial proveniente de vástagos de *M. splendens* frente a cepas de referencia internacional.

Cepas bacterianas	Aceite esencial de <i>M. splendens</i>		Ciprofloxacina ^b	
	CIM ^a	CBM ^a	CIM ^a	CBM ^a
Gram positivas				
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	8	32	0,25	1
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	64	512	0,5	1
<i>B. subtilis</i> ATCC 6533	4	16	0,125	0,5
Gram negativas				
<i>E. coli</i> ATCC 25922	32	128	0,5	0,5
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13076	32	128	0,25	0,25
<i>S. Typhi</i> ATCC 6539	4	64	0,25	0,125
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	> 512	ND	0,5	0,25

^aValores expresados en µg/ml; ^bControl positivo de inhibición del crecimiento bacteriano; ATCC: American Type Culture Collection; ND: no determinado

DISCUSIÓN

El aceite esencial del vástago de *M. splendens*, al igual que el de las hojas de *M. fallax* y *M. splendens* de Brasil [20, 23], es rico en sesquiterpenos. Sin embargo, en *M. fallax* el 83,8% [20], está representado únicamente por el compuesto α -bisabolol, y en *M. splendens* [23], el 80% es α -bisaboleno, no obstante,

el germacreno D, compuesto mayoritario (35,9%) en el aceite extraído de hojas de *M. splendens* proveniente de Costa Rica [22] también lo es en el aceite extraído de los vástagos en donde se encontró un 25,3%. Por otra parte, de los 18 sesquiterpenos identificados en este trabajo, sólo cinco coinciden con los encontrados en los aceites extraídos de las hojas y tres con los de las flores de *M. fallax* reportados por Alarcón [21], aunque con una gran diferencia en los porcentajes; tal es el caso del germacreno D con un 25,3% contra 1,5% procedente de las hojas y flores de la muestra botánica de Táchira [21].

Es importante destacar que la composición de las sustancias volátiles de *M. splendens* estudiada en el presente trabajo es similar a la de *M. splendens* de Costa Rica, y notoriamente diferente si se compara con los componentes del aceite esencial de *M. fallax* y *M. splendens* de Brasil, los cuales poseen un compuesto mayoritario que presenta el mismo núcleo químico. Esto sugiere, al igual que lo encontrado en *Magnolia grandiflora* L. [29], que las condiciones ambientales donde crecen las especies podrían estar influyendo considerablemente en la composición de los aceites esenciales.

Los sesquiterpenos con demostrados efectos antibacterianos y antifúngicos son sustancias presentes en el aceite esencial de muchas plantas superiores [30,31]. En este estudio, se pudo demostrar que el aceite esencial de *M. splendens* inhibió el desarrollo bacteriano de todas las cepas grampositivas y la mayoría de las bacterias gramnegativas con valores que no superaron los 64 y 32 µg/ml, respectivamente. Por otra parte, los rangos obtenidos para la CBM no mayores a 3 diluciones de la CIM indican el efecto potencial biocida del aceite esencial de *M. splendens*. En *M. fallax*, el aceite esencial de las flores demostró actividad inhibitoria moderada solamente en *S. aureus* ATCC 25923 (CIM: 50 µg/ml) y *E. faecalis* ATCC 29212 (CIM: 400 µg/ml) [21] en comparación al amplio espectro antibacteriano evidenciado por el aceite de *M. splendens* en este trabajo. Es probable que el efecto de los sesquiterpenos, especialmente el germacreno D, presentes en el aceite de *M. splendens*, favorezca la inhibición de las bacterias estudiadas en este trabajo.

CONCLUSIONES

1-El aceite esencial de los vástagos de *M. splendens* está constituido por sesquiterpenos.

2-El componente mayoritario del aceite fue germacreno D (25,3%).

3-El aceite esencial demostró efecto inhibitorio sobre diversas bacterias grampositivas y gramnegativas de referencia internacional.

4-De acuerdo a la bibliografía consultada, éste es el primer trabajo donde se reporta la actividad antibacteriana del aceite esencial proveniente de vástagos de *M. splendens*.

AGRADECIMIENTOS

A la Asistente de Especialista en Información (Biblioteca de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis) Carolina Mora, por ser tan diligente y receptiva.

A los Doctores Govaerts, Ráfael y Lucas, Eve por la bibliografía suministrada y aclaración a nuestra consulta.

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Desarrollo Científico Humanístico Tecnológico y de las Artes (CDCHTA) de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Proyectos: (ADGFA-02-97) y (FA-507-11-08-A).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Kew, Missouri Botanical Garden, The New York Botanical Garden, IPNI, IOPI, Global Compositae Checklist, et al. 2010. The Plant List.

<http://www.theplantlist.org/browse/A/Myrtaceae/#stat>

[2] Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plants. Primera Edición (U.S.A.) Columbia University Press; 1981. p 639-643.

[3] Holst, BK. Myrtaceae (revisada 2005). En: Hokche O, Berry P, Huber O, Eds. Nuevo Catálogo de la Flora Vasculare de Venezuela. Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobias Lasser. Caracas; 2008. p 520-524.

[4] Missouri Botanical Garden. 2012. TROPICOS. <http://mobot.org/W3T/Search/vast.html>.

[5] Kawasaki ML. Flora de Grã-o-Mogol, Minas Gerais: Myrtaceae. Bol Bot Univ São Paulo. 2004; 22: 323-337.

[6] Sobral M. 2005. Personal Communications on Myrtaceae 3. Universidade Federal de Minas Gerais.

[7] Goaverts R, Sobral N, Ashton P, Barrie F, Holst BK, Landrum L, et al. 2008. World Checklist of Myrtaceae: 1-455. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew.

[8] Nelson Sutherland, C.H. 2008. Catálogo de las plantas vasculares de Honduras. Espermatófitas: 1-1576. SERNA/Guaymuras, Tegucigalpa, Honduras.

[9] Fournet J. Flore de Guadeloupe et de Martinique. Primera Edición (Francia). Institut National de la Recherche Agronomique; 1978. p 863-870.

[10] Steyermark J, Huber O. Flora del Avila. Primera Edición (Venezuela). INCAFO; 1978. p 647.

- [11] Pepato M, Oliveira J, Kettelhut C, Migliorini R. Assessment of the antidiabetic activity of *Myrcia uniflora* extracts in streptozotocin diabetic rats. *Diabetes Res.* 1993; 22 (2): 49-57.
- [12] Yoshikawa M, Shimada H, Nishida N, Li Y, Toguchida I, Yamahara J, et al. Antidiabetic principles of natural medicines. II Aldose reductase and α -glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): Structures of myrciacitrins I and II and myciaphenones A and B. *Chem Pharm Bull.* 1998; 46 (1): 113-119.
- [13] Miura T, Mizutani Y, Ishida T. Antidiabetic effect of the herb *Myrcia speciosa* in KK-Ay diabetic mice. *J Trad Med.* 2006; 23 (1): 16-18.
- [14] Cerqueira M, Souza-Neta L, Passos M, Lima E, Roque N, Martins D, et al. Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. *J Braz Chem. Soc.* 2007; 18 (5): 998-1003.
- [15] Moriarity D, Bensala A, Cole R, Takaku S, Haber W, Setzer W. Selective cytotoxic activities of leaf essential oils from Monteverde, Costa Rica. *Nat Prod Commun.* 2007; 2 (12): 1263-1268.
- [16] Stefanello M, Riva D, Simionatto E, Carvalho J, Góis A, Salvador M. Chemical composition and cytotoxic activity of essential oil from *Myrcia laurotteana* fruits. *J Essent Oil Res.* 2011; 23 (5): 7-10.
- [17] Andrade G, Guimaraes A, Santana M, Siqueira R, Passos L, Machado S, et al. Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Myrcia pubiflora* in mice. *Rev Bras Farmacogn.* 2011; 22 (1): 181-188.
- [18] Zoghbi M, Andrade E, da Silva M, Carreira L, Maia J. Essential oils from three *Myrcia species*. *Flavour Fragr J.* 2003; 18 (5): 421-424.
- [19] Limberger R, Pires S, Sobral M, Menut C, Bessiere J, Henriques A. Essential oils from nine *Myrcia species* (Myrtaceae). *BLACCPMA.* 2002; 1 (2): 9-11.
- [20] Henriques A, Sobral M, Bridi R. Essential oils from five southern Brazilian species of *Myrcia* (Myrtaceae). *J Essent Oil Res.* 1997; 9: 13-18.
- [21] Alarcón L, Peña A, Gonzales N, Quintero A, Meza M, Usubillaga A, et al. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Myrcia fallax* (Rich.) DC. From Venezuela. *Rev Soc Quím Perú.* 2009; 75 (2): 221-227.
- [22] Cole R, Haber W, Setzer W. The leaf oil composition of *Myrcia splendens* from Monteverde, Costa Rica. *J Essent Oil Bear. Pl.* 2008; 11 (1): 41-44.
- [23] Nakamura M, Monteiro S, Bizarri C, Siani A, Ramos M. Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. *Biochem Syst Ecol.* 2010; 38 (6): 1170-1175.
- [24] Font Quer P. *Diccionario de Botánica.* Primera Edición. Editorial Labor, S.A. (Madrid); 1979. p 1092.
- [25] Adams R. Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream IL, USA. Allured Publishing Corporation; 2007.
- [26] Sandra P, Bicchi C. Capillary gas chromatography in essential oil analysis. *Serie Chromatographic Methods.* Ed. Heidelberg; New York: Huethig, 1987. p 435.
- [27] Davies N. Gas chromatography retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20 M phases. *J Chromatogr A.* 1990; 503:1-24
- [28] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty first informational supplement. M100-S16. Wayne (PA), USA; 2011.
- [29] Jiménez-Medina D, Cordero A, Rojas L, Rodríguez M. Estudio de los componentes volátiles de las hojas y flores de *Magnolia grandiflora* L. que crece en el Estado Mérida, Venezuela. *Rev Fac Farm.* 2007; 49 (1): 2-4.
- [30] Marcano D, Hasegawa M. *Fitoquímica organica.* Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, CDCH. Universidad de Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela; 2002. p 588.
- [31] Angioni A, Barra A, Russo M, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(10): 3073-3078.