

Evaluación de actividad antimicrobiana en productos naturales: fuente potencial de compuestos bioactivos

Nidia M. Rojas Hernández¹, Senovio Avellaneda² y Beatriz Romeu^{1}.*

1.Dpto. de Microbiología, Facultad de Biología, UH, Telf: 832 9241, E-mail: nidia.rojas@infomed.sld.cu. 2. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, (UAG), Guerrero, México.

INTRODUCCIÓN

La Microbiología es una de las ramas de las Ciencias Biológicas que más se ha desarrollado en los últimos años; sin embargo, sigue siendo una de las que más recursos requiere para su desarrollo práctico.

En especial, las instalaciones de laboratorio para las investigaciones microbiológicas, equipos, reactivos y medios de cultivo encarecen notablemente las operaciones que se efectúen en ellas.

Con la finalidad de elevar la calidad y la repetibilidad de los resultados de los análisis microbiológicos, existen una serie de normas que tratan de estandarizar los procedimientos habituales que se realizan en estos laboratorios, en los cuales, como intervienen organismos vivos, pueden ser extraordinariamente variables y complicados de controlar, ya que un gran número de factores pueden influir en ellos.

Uno de los análisis más comunes en los laboratorios de microbiología es la determinación de la sensibilidad o resistencia microbiana a los antibióticos convencionales, lo cual recibe el nombre de antibiograma y se suele realizar por medio de la difusión radial con discos de papel en medio agarizado¹. Actualmente existen numerosos manuales y guías de trabajo que establecen claramente las pautas a seguir para la ejecución de esta técnica, la cual varía en dependencia de las especies de microorganismos y antibióticos a evaluar.(NCCLS, 1993). Incluso, para métodos más complicados como es el Epsilon test (E test) existen documentos donde se establecen los errores más comunes detectados en su ejecución y se detallan los requisitos y pasos para su adecuada realización con la finalidad de obtener resultados correctos^{2,3 4}.

A pesar de ello, los métodos de determinación de actividad antimicrobiana de productos naturales aún en nuestros días no se encuentran estandarizados, y el antibiograma convencional no es exactamente válido o adecuado cuando se trata de

analizar la actividad antimicrobiana de estos compuestos, cuya complejidad de su composición química y variabilidad de sus características son notables.

Por otra parte, los productos naturales constituyen una fuente inagotable de compuestos con valiosas propiedades biológicas, con la ventaja de tener pocas reacciones adversas, lo cual los hace un campo de trabajo de gran actualidad^{5,6}. Esto explica el incremento de las investigaciones con este tipo de compuestos, sobre todo los de origen vegetal, de los cuales particularmente Cuba tiene una gran riqueza debido a su fértil suelo y benévolo clima favorable a la biodiversidad. Sin embargo, en el trabajo de laboratorio para detectar la presencia de actividad antimicrobiana, la heterogeneidad de estos productos hacen de esta tarea una actividad empírica y poco uniforme.

La necesidad de establecer métodos *in vitro* capaces de uniformar estas determinaciones con un mínimo de recursos implica el desarrollo de una metodología sencilla y confiable capaz de ser lo suficientemente adaptable para emplearla en productos naturales, cuyos extractos o compuestos puros aislados suelen estar disponibles solo en pequeñas cantidades para su evaluación.

El presente trabajo tiene como **objetivo** describir la metodología desarrollada y aplicada para determinar la presencia de actividad antimicrobiana en 55 muestras de productos naturales que fueron evaluadas con este fin y mediante la cual se determinaron los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a hongos y bacterias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inóculo microbiano: Se emplearon bacterias de la colección ATCC y de origen clínico humano, sembradas en la superficie de tubos con cuñas de agar nutriente, las cuales se incubaron a 35-37^a C durante 24 h. En las cepas fúngicas se usó el mismo método con medio Sabouraud glucosa agar incubadas de 24-48h a 25° C. Una vez crecidos, la biomasa de cada microorganismo se resuspendió con solución fisiológica estéril hasta llevarla a una concentración de 9×10^8 UFC/ mL usando el método turbidimétrico⁷. La biomasa de las cepas fúngicas se filtró por gasa estéril y posteriormente se inoculó en medio Sabouraud glucosa agar estéril y fundido vertido en placas y se incubó para permitir el crecimiento microbiano. Luego, se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias y se ajustó su concentración a la misma señalada anteriormente para las bacterias.

Se usaron 26 cepas bacterianas de la colección ATCC, y 12 cepas de levaduras del género *Candida*, en su mayoría de origen clínico humano (Ver Tablas 1 y 2). También se usaron 8 cepas de hongos filamentosos de los géneros *Aspergillus*, (3 cepas) *Penicillium*, (2 cepas) *Cladosporium*, *Mucor* y *Fusarium*. Para la evaluación de las interrelaciones entre bacterias endófitas de caña de azúcar se emplearon 25 cepas bacterianas aisladas de este cultivo. y 4 de *Gluconacetobacter diazotrophicus*.)

Tabla1. Principales cepas bacterianas de la colección ATCC usadas.

Nombre científico	ATCC	Nombre científico	ATCC
<i>Salmonella typhi</i>	7251	<i>Enterobacter cloacae</i>	23355
<i>Serratia muncescens</i>	14056	<i>Salmonella typhimurium</i>	14028
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883	<i>Salmonella enteritidis</i>	13076
<i>Providencia sp</i>	c- 3450	<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1460	<i>Proteus mirabilis</i>	7002
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	<i>Staphylococcus aureus</i>	6538
<i>Escherichia coli</i>	35150	<i>Salmonella typhi</i>	19430
<i>Escherichia coli</i>	25922	<i>Staphylococcus aureus</i>	33862
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	<i>Proteus vulgaris</i>	13315
<i>Shigella flexneri</i>	12022	<i>Enterococcus faecium</i>	6056
<i>Citrobacter freundii</i>	8090	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	<i>Citrobacter freundii</i>	10625
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	<i>Staphylococcus aureus</i> , cepa Camp	

Tabla 2. Cepas de levaduras empleadas:

Nombre científico	cepas	Nombre científico	cepas
<i>Candida albicans</i>	4	<i>Candida kefir</i>	2
<i>Candda albicans</i>	ATCC 10231	<i>Candida utilis</i>	2
<i>Candida tropicalis</i>	2	<i>Candida glabrata</i>	2
<i>Candida parapsilosis</i>	1	<i>Candida krusei</i>	1

PRODUCTOS EVALUADOS

Mediante este método se evaluó la presencia de actividad inhibitoria del crecimiento microbiano de 55 muestras diferentes de origen natural sobre diferentes microorganismos. Estas fueron:

Cuatro extractos clorofilicos extraídos del alga *Chlorella sp.* disueltos en agua y en etanol. **(Total: 8)**

Tres compuestos puros aislados de plantas cubanas: dos benzofenonas poliisopreniladas (aristofenona y nemorosona) y un glucósido flavonoide de *Hibiscus elatus*., así como un flavonoide obtenido de una planta mexicana de la región Tierra Caliente, el estado de Guerrero. **(Total: 4)**

Se evaluaron 9 extractos acuosos y 9 etanólicos de plantas mexicanas y 5 de plantas argentinas **(Total: 23)**

Veinte extractos de cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* crecidas en diferentes medios de cultivo y en diferentes condiciones **(Total: 20)**

DESARROLLO DEL MÉTODO

A. Difusión Radial por cortes en monocapa de medio agarizado inoculado

Primeramente se realizó una prueba de tamizaje general de cada producto frente al conjunto de cepas determinado y luego de verificar si existía alguna actividad inhibitoria del crecimiento microbiano, se procedió a determinar el valor de la CMI de cada producto o extracto frente a las cepas sensibles. Siempre se realizaron tres réplicas por extracto, producto o dilución para cada cepa. Para el desarrollo del método nos basamos en la metodología de difusión radial en medio agarizado, modificándola.

Esta modificación consistió en lo siguiente:

- Sustitución de las dos capas de agar originales descritas por Grove y Randall en 1955 , (una capa basal estéril y una segunda capa con inóculo microbiano, de agar nutriente para las bacterias y de agar Sabouraud Glucosa para las levaduras) por una sola capa de agar inóculo.
- Empleo de soportes de vidrio (portaobjetos) de 7.5 x 2.5 cm o de 10 X10 cm en lugar de placas Petri, en los cuales se añade el medio inoculado y fundido. (Las láminas de vidrio se colocaron en placas Petri estériles de 120 x 15 mm. o de 150 x 15 mm en dependencia de la lámina usada)
- Inclusión de un tiempo de predifusión en frío previo a la incubación microbiana y determinación del tiempo necesario para la difusión del extracto.
- Realización de cortes cilíndricos de 3 mm de diámetro en el agar con horador de metal estéril en cuyos cortes se coloca el extracto, en lugar de emplear discos de papel embebidos en el extracto.
- Cuantificación y estandarización de inóculo (concentración y proporción con relación al volumen de medio agarizado a inocular).

.Descripción del método

Se utilizaron tubos de cultivo con 9 mL de medio agarizado adecuado (en dependencia de si se trata de bacterias u hongos) para cada portaobjeto (por cada cepa) que una vez estéril y fundido y cuando se encuentra a una temperatura de 45 °C aproximadamente fueron inoculados con 0.5 mL de suspensión microbiana. (inóculo ya explicado anteriormente). El medio inoculado se agitó suavemente durante un minuto para lograr una mejor homogenización.

Posterior a este paso, empleando una pipeta estéril, se toman 3 mL de medio y se vierten en un portaobjetos (7,5 x 2,5 cm) estéril el cual se encuentran dentro de una placa Petri también estéril. Repetir la operación para las otras dos réplicas de cada cepa. Cuando se emplearon soportes de vidrio de mayores dimensiones (10x10 cm) la misma proporción de medio e inóculo fue respetada. Una vez solidificado el medio, se usa un horador de metal estéril para realizar cortes circulares de 3 mm de diámetro cada uno según patrón previamente dibujado en una plantilla de papel. Se pueden realizar hasta 5 cortes en el centro del portaobjetos.

Extraer el contenido de los cortes cilíndricos (pocitos) marcados con el horador sobre el medio agarizado solidificado. Esta operación puede efectuarse con un asa de siembra o aguja hipodérmica estéril.. A continuación, y siempre trabajando asépticamente se aplican los extractos o productos a evaluar usando tubos capilares de cristal o plástico.

Una vez aplicado el producto, las placas con las láminas de vidrio inoculadas deben ponerse en frío (4-10 ° C) durante dos horas

Después de realizado todo esto, las placas se incuban a una temperatura de 30- 35 °C durante 24 horas para las bacterias y a 25 °C para los hongos, manteniéndose durante el tiempo adecuado para observar el crecimiento en forma de película turbia homogénea en toda la superficie del soporte y luego se leen los resultados: La ausencia de halo de inhibición del crecimiento se consideró como un resultado negativo y la presencia de halo traslúcido alrededor de los tres orificios se tomó como positivo.

Para el estudio de las interacciones entre microorganismos, se empleó una variante de este método, la cual consistió en sustituir los cortes cilíndricos en el medio de cultivo añadido en el portaobjetos por pequeños cilindros de medio agarizado en el cual ya ha crecido el microorganismo del cual queremos conocer si sus productos metabólicos influyen sobre las otras cepas de prueba. La presencia de halos

translúcidos en torno a los pequeños trozos cilíndricos de agar indican inhibición del crecimiento y producción de sustancias inhibitoras del crecimiento.

B. Dilución en medio sólido.

En caso que los productos a evaluar fueran insolubles en agua, pero si solubles en etanol, o en Dimetil Sulfóxido (DMS) se utilizó otra metodología, basada en la incorporación y dilución del producto a evaluar en el medio agarizado estéril fundido y a 50° C aproximadamente. Una vez homogeneizada la muestra en el medio a la concentración deseada, con pipeta estéril se colocaron 0,5 mL de este medio en las oquedades de portaobjetos excavados estériles colocados en el interior de placas Petri. Una vez solidificado el medio, se inoculó la superficie con la cepa bacteriana o fúngica seleccionada con ayuda de un asa de siembra. Con esta misma metodología se realizaron controles con el solvente empleado para la disolución del extracto en evaluación, procediendo de igual forma que con la muestra del producto. Se realizaron controles de crecimiento preparados con el medio y la adición de agua destilada estéril en la misma proporción utilizada para las muestras y el solvente. Las placas con los portaobjetos se incuban a temperatura y tiempo adecuados en dependencia del tipo de microorganismo de prueba y una vez crecidos los controles sin solvente, se realizan las lecturas de los resultados.

Ambas metodologías (Métodos A y B) se emplearon para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria de los productos o extractos usados que mostraron actividad en el tamizaje inicial.

En los primeros 15 extractos evaluados, se empleó simultáneamente el método convencional de difusión radial en doble capa de medio agarizado con discos de papel y con cortes cilíndricos para comparar los resultados

RESULTADOS

Los resultados por el método descritos, son fácilmente distinguibles, ya que la capa de agar es muy fina en comparación con la doble capa.

Por otra parte, el fondo de las placas Petri no siempre es plano, por lo cual se debe añadir una mayor cantidad de agar base o agar-inóculo para disminuir el error debido a este defecto, lo cual ocasiona que el espesor de la capa de agar no sea homogéneo en toda la placa y que los cortes no contengan siempre el mismo volumen de muestra a evaluar. La repetibilidad de los resultados en cuanto al

tamaño del halo y presencia de inhibición fue constante en las tres réplicas efectuadas con el minimétodo, pero no en la utilización del método de difusión con cortes en placas Petri.

En cuanto al método de los discos de papel, ya distintos autores han referido la dificultad que presenta el empleo de esta metodología, ya que la absorción del extracto en el papel difiere cuando evaluamos productos diferentes, en dependencia de su tamaño molecular o de su difusión, lo cual ocasiona una menor o mayor difusión en el medio agarizado en dependencia del tipo de compuesto.

La predifusión permitió detectar valores más bajos de CMI para un mismo producto comparado con la ausencia de este paso en todos los compuestos en los que se aplicó y en el tamizaje, detectar la presencia de actividad antimicrobiana en productos que no se hubieran detectado si no se incluye este paso, sobre todo en cepas de bacterias de rápido crecimiento a temperaturas de 20 a 25°C.

En ocasiones, (sobre todo para bacterias de rápido crecimiento) los resultados se pudieron leer a las 6-8 horas de incubación, lo cual nunca ocurrió con los métodos convencionales.

Es aplicable a productos solubles en agua o en otros solventes como el etanol, independientemente de la presencia de pigmentos en ellos.

Algunas de las ventajas encontradas se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Ventajas del empleo del minimétodo de difusión en monocapa de medio agarizado

Halos claros y evidentes
Disminución del tiempo de incubación de 18-24 h a 8-12 h
Reducción de la cantidad de cristalería, ya que en una placa Petri caben dos portaobjetos para el mismo número de réplicas
Reducción del volumen de medio de cultivo de 60 mL (para las dos capas en tres placas) a 9 mL para el mismo número de réplicas
Disminución del volumen de inóculo microbiano a emplear por cada cepa de 2,5 a 0,5 mL
Disminución del volumen de muestra a evaluar
Repetibilidad de los resultados
Detección de propiedades inhibitorias en productos que tienen baja actividad
No interferencia de la lectura de los resultados con la presencia de pigmentos en los extractos

El método descrito ha sido empleado para determinar cualitativamente la presencia de actividad bacteriana y antifúngica y establecer cuantitativamente los valores de Concentración Mínima Inhibitoria, Fungicida y Bactericida (CMI, CMF y CMB) de 55 productos naturales frente a 25 cepas bacterianas y 20 fúngicas, encontrando una aplicación en muestras de diversos orígenes dentro del campo de los productos naturales. Se ha empleado en varias investigaciones relacionadas con la actividad antimicrobiana de productos naturales y preservos convencionales, en la parte experimental de Trabajos de pregrado de estudiantes de Licenciatura en Microbiología y los resultados de su aplicación aparecen en 5 publicaciones y 7 trabajos presentados en congresos o eventos científicos. (Ver Tabla 4)

Tabla 4.APLICACIONES DEL MINIMÉTODO

ACTIVIDAD	Nº	REFERENCIAS
Investigaciones	7	ANEXO 1
Tesis de grado	5	ANEXO 2
Trabajos presentados En congresos y eventos	7	ANEXO 3
Publicaciones en revistas científicas	5	8-12

El empleo de la variante con cilindros de medio agarizado en el cual habían cultivos de diferentes cepas de *Gluconacetobacter diazotrophicus* a distintos tiempos de incubación, permitió detectar la presencia de metabolitos secundarios inhibidores del crecimiento de algunos miembros de la comunidad microbiana endófito de la caña de azúcar, pero además, detectó sobrecrecimiento bacteriano frente a otros cultivos, lo cual es una posibilidad más para el empleo de esta metodología.

Es evidente que el empleo de esta metodología permite realizar un ahorro por concepto de medios de cultivo y la consiguiente disminución del volumen de muestras a evaluar, lo cual indica que es un método cualitativamente superior.

Además, al disminuir el volumen de muestra de ensayo, es posible optimizar su empleo y hacer un estudio más completo de estos compuestos o de su espectro antimicrobiano de acción.

CONCLUSIONES

- Se desarrolló una metodología sencilla y confiable capaz de ser lo suficientemente adaptable para emplearla en distintos productos naturales o extractos.
- Estos métodos permiten emplear un mínimo de recursos tales como medios de cultivo, inóculo microbiano y muestras a evaluar
- El método permite evaluar esta actividad sobre bacterias y hongos.
- Puede emplearse para el estudio de interrelaciones entre diferentes microorganismos, tanto que favorezcan como que inhiban el crecimiento microbiano, lo cual le da utilidad en trabajos de Ecología microbiana.

ANEXO 1

- INVESTIGACIONES EN LAS CUALES SE HA APLICADO ESTA METODOLOGÍA:

- 1-** Evaluación de actividad antimicrobiana de plantas medicinales cubanas
- 2-** Evaluación de preservos antimicrobianas para productos bioactivos
- 3-** Evaluación de actividad antimicrobiana de benzofenonas poliisopreniladas de plantas cubanas
- 4-** Evaluación de actividad antimicrobiana de cuproclorofila preparada de *Chlorella* sp
- 5-** Evaluación de actividad antibacteriana de plantas medicinales de Guerrero, México
- 6-** Evaluación de actividad antimicrobiana de GOSSYPITRINA aislada de *Hibiscus elatus*
- 7-** Interrelaciones de las comunidades microbianas endófitas de la caña de azúcar

ANEXO 2

- TRABAJOS DE DIPLOMA EN LOS CUALES SE HA EMPLEADO ESTA METODOLOGÍA.

(DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA, FACULTAD DE BIOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE LA HABANA)

- 1- 2001 Presencia de actividad antibacteriana en productos naturales.**
- 2- 2002. Evaluación de actividad antibacteriana de dos benzofenonas poliisofeniladas**
- 3- 2002. Actividad antibacteriana de clorofila y cuproclorofila obtenidas de *Chlorella* sp.**
- 4- 2002 Interacciones entre *Gluconacetobacter diazotrophicus* y cepas bacterianas endófitas de la caña de azúcar.**
- 5- 2003. Evaluación de Gossypitrina aislada de flores de *Hibiscus elatus*.**

ANEXO 3.

- PRESENTACIONES EN CONGRESOS:
 - 1- **XI Jornada Farmacéutica JOFAU y VI Jornada Internacional de Umuarama, Brasil, Mayo, 2002.** "Antibacterial activity of *Boldoa purpurascens* (Nictaginaceae).
 - 2- **IV Taller Internacional de Química de los Productos Naturales., CQF, Nov 2002.** Evaluación fitoquímica y antimicrobiana de plantas medicinales de la región Tierra Caliente, Guerrero, México."
 - 3- **XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología, ALAM, Nov 11-15, 2002.** Propiedades antibacterianas de la cuproclorofila".
 - 4- **XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología, ALAM, Nov 11-15, 2002.** Actividad antibacteriana in vitro de 4 extractos de plantas que crecen en Cuba.
 - 5- **Biotecnología Habana 2002. (Nov, 2002).** Propiedades biocidas de la cuproclorofila extraída de *Chlorella* sp cultivada en residual orgánico de la industria pesquera cubana.
 - 6- **Calidad 2003. Evento Territorial de Ciudad de La Habana, abril, 2003.** Gossypitrina. Componente de flores de *Hibiscus elatus* Sw.
 - 7- **Calidad 2003. Evento Territorial de Ciudad de La Habana, abril, 2003.** Actividad antimicrobiana de productos naturales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC et al., Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin Pathol*, 1966, 45:493-496.
2. AB Biodisk (1996) E test Reading Guide . Organism Related. (o3.96) M0000090- M239
3. AB Biodisk (1997) E test Media, Inoculum and Incubation. Guide. M0000169- M511
4. AB Biodisk (1999) E test for ART of pneumococci. M9999170-M724.
5. Jatem-Lasser A, Ricardl MM & Adamo G. Herbal Traditional Medicine from Venezuela Andes: An ethnopharmacological study. *Phytotherapy Research (UK)* 1998, 12 (supplement): 53-9.
6. NCCLS Nacional Comité for Clinical Meckes M, Torres J, Calzada F, Rivera J, Camorlinga M, Lemus, H & Rodriguez G. Antibacterial properties of

Helianthemum glomeratum: a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytotherapy Research*. (UK), 1997, 11 (2): 128-31.

7. Laboratory Standards: Performance Standard for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standards M2-A5, Villanova, PA, NCCLS, 1993
8. Rojas N, O. Cuesta, A Avilés, D. Lugo y S. Avellaneda. “ Actividad antimicrobiana de *Nemorosona* aislada de *Clusia rosea*”. *Rev. Cub, Farm.*35, Suplemento Especial: 197-200, (2001)
9. Rojas NM, M Matos, DM Glez y R. Howart, Antibacterial activity of *Boldoa purpurascens* (Nictaginaceae). *Arq. Cienc Saúde Unipar.* 6, Sep: 33, (2002_a)
10. Rojas N, Romero, Actividad antimicrobiana de la cuproclorofila. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas de Venezuela* Vol. 36. No 1. pp: 68-78 (2002_b)
11. Rojas N, L Mesa, D Lugo y T. Romero Propiedades antibacterianas de la cuproclorofila”. XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología, ALAM, Nov 11-15, (2002_c).
12. Rubio OC, Cuellar A. Rojas NM, Castro H, Rastrelli L, Aquino R. A poly isoprenilated benzophenone from cuban propolis.. *Journal of Natural Products.* 62(7): 1013-1015, 1999