

Actividad antimicrobiana de extractos de partes aéreas y tallo de *Simsia sp*

LAURO D. AGUILAR RAMÍREZ, MONTSERRATT HERRERA MARTELL, ANABELLE CERÓN NAVA, JUAN R. SALAZAR

Resumen—El término "acahual" se emplea para describir a una serie de vegetación arvense, que crece como especies secundarias asociadas a cultivos. Dentro de las especies catalogadas como acahuales encontramos a las plantas del género *Simsia*, las cuales se caracterizan por tener inflorescencias amarillas o blancas y semillas que al contacto con la ropa o pelo se adhieren, siendo éste un sello distintivo de estas especies. Una estrategia de aprovechamiento para esta flora secundaria es darle un valor agregado, una explotación de estas especies no cultivadas en lugar de su eliminación, por lo cual se ha realizado una investigación bibliográfica en donde se encontró que a varias de estas especies se les atribuye un uso medicinal como tratamiento para el denominado "mal de orín" causado principalmente por bacterias como *Escherichia coli* o especies del género *Candida*. El presente trabajo plantea comprobar las propiedades antimicrobianas de diferentes extractos orgánicos de una planta asociada a vegetación secundaria, en esta oportunidad decidimos obtener extractos de estas plantas y evaluar su actividad contra una batería de especies comúnmente encontradas como agentes causales de infecciones urinarias para generar un beneficio con impacto social en la comunidad en donde es empleada esta planta como remedio tradicional. Se destaca también, la importancia de la sensibilidad de algunos hongos filamentosos debido a que pueden ser perjudiciales en la producción y consumo de alimentos para un aprovechamiento mayor de la planta. Se probó la sensibilidad de las cepas *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus*, *Aspergillus sp*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Cándida albicans*, *Cándida parapsilosis*, *Cándida neoformans* y *Cándida tropicalis* con los extractos con hexano, acetato de etilo y etanol del tallo y partes aéreas por método de microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC). Los resultados demuestran que *Simsia sp.* posee inhibición en las diferentes cepas utilizadas, tanto bacterias grampositivo y gramnegativo, como para hongos y levaduras con los diferentes extractos, por lo que se requiere más investigaciones de la especie, así como de los compuestos presentes en los extractos. Se propone continuar su estudio y dar uso con valor agregado a una planta considerada como plaga.

Palabras clave: Plantas medicinales, medicina tradicional, Concentración mínima inhibitoria, acahual, microbiología

LAURO D. AGUILAR-RAMÍREZ, MONTSERRATT HERRERA-MARTELL pertenecen a la carrera LICENCIATURA EN QUÍMICA DE ALIMENTOS de la Facultad de Ciencias Químicas y realizaron el proyecto dentro de los cursos INVIERNO Y VERANO DE INVESTIGACIÓN 2013-2014 (lauroaguilar@lasallistas.org.mx).

El proyecto fue asesorado por MTRA. ANABELLE CERÓN-NAVA, DR. JUAN RODRÍGO SALAZAR

Los autores agradecen a la dirección administrativa y de laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas

I. INTRODUCCIÓN

El término "acahual" se emplea para describir a una serie de vegetación arvense, que generalmente crece como especie secundaria asociada a cultivos [1]. Debido a la competencia por la luz y nutrimentos, generalmente se gastan muchos recursos económicos para conseguir herbicidas capaces de inhibir el desarrollo de estas plantas no deseadas. Entre estas especies encontramos a numerosas especies de la familia *Asteraceae*, cuya habilidad para crecer es muy notable, dentro de las especies catalogadas como acahuales encontramos a las plantas del género *Simsia*, las cuales se caracterizan por tener inflorescencias amarillas o blancas y semillas que al contacto con la ropa o pelo se adhieren, siendo éste un sello distintivo de dichas especies. La resistencia de esta planta a los factores ambientales, invasión de insectos y organismos inferiores aclamó la atención para su estudio.

Una estrategia de aprovechamiento para esta flora secundaria es darle un valor agregado, una explotación de estas especies no cultivadas que deberá ser estandarizado, en lugar de su eliminación debido a la competencia que representan las malezas para los cultivos. Por lo cual, se ha realizado una investigación bibliográfica en donde se encontró que a varias de estas especies se les atribuye un uso medicinal como tratamiento para el denominado "mal de orín", que en la medicina tradicional otomí se emplea en forma de infusión, [2] para combatir a una serie de padecimientos caracterizados por infecciones localizadas generalmente en las vías excretoras de la orina y causadas principalmente por bacterias como *Escherichia coli* o especies del género *Candida*. El presente trabajo plantea comprobar las propiedades antimicrobianas de diferentes extractos orgánicos de una planta asociada a vegetación ruderal, en esta oportunidad decidimos obtener extractos de estas plantas y evaluar su actividad contra una batería de especies comúnmente encontradas como agentes causales de infecciones urinarias para generar un beneficio con impacto social en la comunidad en donde es empleada esta planta como remedio tradicional.

Por otro lado, es conocido que en la industria alimentaria, algunos microorganismos pueden ser perjudiciales para la producción de alimentos y para el consumidor. Entre estos microorganismos se encuentran hongos filamentosos que incluyen las cepas de los géneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Botrytis*, entre otros, que generalmente se desarrollan en cereales, frutas y subproductos. [3] Por lo anterior se destaca la importancia de probar la sensibilidad de algunos hongos de interés alimentario ante *Simsia sp.*

La presente investigación contó con un diseño experimental, descriptivo, transeccional y con tratamientos múltiples, en donde se pretendió comprobar actividad antimicrobiana de la planta *Simsia sp* recolectada en el Estado de Tlaxcala, México.

El objetivo principal de la presente investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de *Simsia sp* contra bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, levaduras y hongos filamentosos de interés clínico y en la industria alimentaria.

II. CONCEPTOS BÁSICOS

Actividad antimicrobiana: Propiedad de un extracto que en bajas concentraciones es capaz de inhibir el crecimiento e, incluso, destruir microorganismos.

Cepa: Organismo que presenta un fenotipo característico reproducible de una generación a la otra. [4]

Concentración mínima inhibitoria (MIC): Se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en µg/mL) que inhibe el crecimiento visible después de 24 horas de incubación a 37° C. La MIC se ha establecido como “gold standard” frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado. [5]

Acahual: se emplea para describir a una serie de plantas invasoras que crecen como especies secundarias asociadas a cultivos

Mal de orín: serie de padecimientos caracterizados por infecciones localizadas generalmente en las vías excretoras de la orina y causadas principalmente por bacterias como *Escherichia coli* o especies del género *Cándida*.

Sensibilidad de las cepas: Una cepa es sensible si presenta cambios notables en su crecimiento normal.

MICROORGANISMOS

Bacterias

- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*

Hongos y levaduras

- *Penicillium notatum*
- *Rhizopus sp*
- *Aspegillus sp*
- *Aspegillus nidulans*
- *Aspegillus oryzae*
- *Aspegillus niger*
- *Candida albicans*
- *Candida parpsilosis*
- *Candida neoformans*
- *Candida tropicalis*

III. METODOLOGÍA PROPUESTA

La planta se recolectó en estado vegetativo el día 13 de octubre del 2013 de una parcela localizada en el municipio de Calpulalpan en el estado de Tlaxcala, México. Se dejó secar naturalmente y se molió separando las partes aéreas (flor, hojas y espinas), el tallo y raíz. Posteriormente se realizó el proceso de extracción macerando en hexano, acetato de etilo y metanol en un tiempo aproximado de 15 días en partes aéreas y tallo para obtener los diferentes compuestos propios de la planta de acuerdo a su polaridad. Los extractos obtenidos se concentraron por medio de un rotavapor y se dejaron secar para las pruebas microbiológicas.

Para estudiar la actividad antimicrobiana se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) en µg/mL por método de microdilución (M27-A3, M38-A) [6]. Se probó la sensibilidad de las cepas bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; hongos filamentosos *Penicillium notatum*, *Rhizopus*, *Aspegillus sp*, *Aspegillus nidulans*, *Aspegillus oryzae* y *Aspegillus niger*; y levaduras *Cándida albicans*, *Cándida parpsilosis*, *Cándida neoformans* y *Cándida tropicalis*, debido a su interés en el área clínica y en la industria alimenticia. Las cepas se estandarizaron con el tubo 0.5 del nefelómetro de McFarland equivalente a 1X10⁸ células/mL. Los resultados son el promedio de cuatro repeticiones para cada extracto.

Los medios utilizados para el manejo de las bacterias fueron Muller-Hilton y Dextrosa Saboraud para hongos y levaduras para optimizar su crecimiento y cubrir todas las necesidades nutritivas y ambientales de cada cepa. Todas las cepas estudiadas son propiedad del cepario de la Universidad la Salle, A. C.

Los extractos crudos se disolvieron en DMSO para una concentración de 2000 µg/mL (solución patrón), posteriormente se realizaron diluciones desde 500 a 15.625 µg/mL. [7] Cabe destacar que el DMSO, no presenta actividad antimicrobiana para todas las cepas estudiadas debido a que se encuentra a una concentración ≤ 12 % en las diluciones finales. El ensayo de Inhibición con DMSO al 12% de concentración se realizó anteriormente sin resultados positivos para inhibición parcial o total de los microorganismos.

A partir de las diluciones en tubo se procedió a la inoculación de las microplacas, una por cada microorganismo con tres posibles extractos por probar. La incubación se realizó en un periodo de 24-72 horas a 37°C. La figura 1 describe el llenado de las placas.

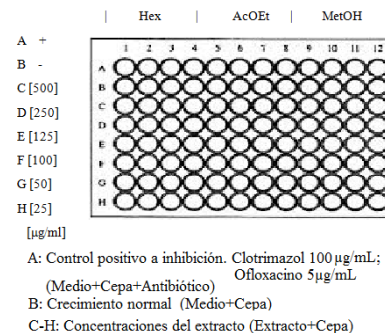


Figura I. Inoculación de microplaca.

Se tomó al control positivo (+) como inhibición dada por un antibiótico (Ofloxacino a 5 µg/mL para bacterias y Clotrimazol 100 µg/mL para hongos y levaduras) el cual contiene medio, cepa y antibiótico. El control negativo consta únicamente de medio y cepa mientras que las filas C a H cuentan con cepa y la concentración establecida de extracto.

La evaluación del crecimiento se realizó visualmente, apoyándose en la ausencia de turbidez en el medio en comparación con el control negativo (crecimiento normal) y corroborándose con un lector de placas Epoch de Biotek, el cual mide la absorbancia en cada pozo.

Debido al desconocimiento de la especie de la planta será identificada en el Instituto de Biología de la UNAM.

IV. RESULTADOS

A continuación se muestra un ejemplo de las valoraciones de los resultados de la sensibilidad de las cepas en la evaluación visual.

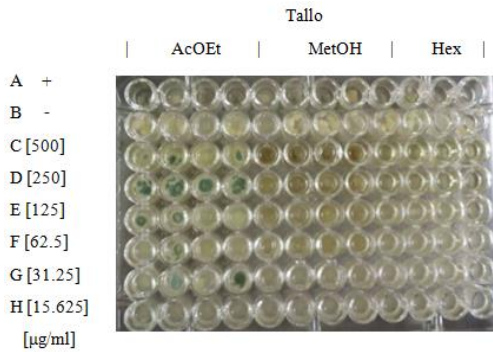


Figura II. Evaluación visual *P. notatum* Tallo

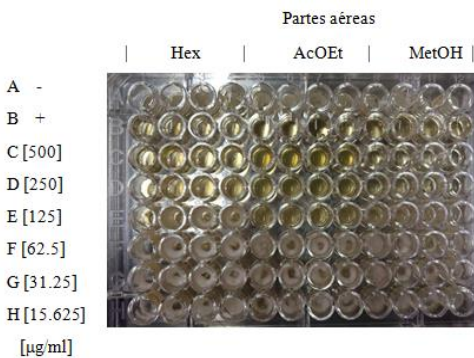


Figura III. Evaluación visual *P. notatum* Partes aéreas

Para *Penicillium notatum* de acuerdo al crecimiento observado en las Figuras 2 y 3 se definieron las concentraciones mínimas inhibitorias para los extractos con hexano y metanol de Tallo como 250 y 125 µg/mL respectivamente, el extracto con acetato de etilo no cuenta con actividad antimicrobiana. Las MIC para los extractos con hexano, acetato de etilo y metanol de las partes aéreas son 250, 125 y 250 µg/mL respectivamente. La morfología de todos los hongos filamentosos fue afectada notablemente, el cambio puede observarse las figuras 2 y 3. Debido a las variaciones morfológicas, la evaluación de actividad mediante

lector de placas no es un método consistente para evaluar la actividad del extracto.

V. RESULTADOS GLOBALES

Tabla I. Concentraciones mínimas inhibitorias [µg/mL] Extractos de Tallo

	Tallo		
	Hex	AcOEt	MetOH
<i>E. coli</i>	250	125	125
<i>S. aureus</i>	250	250	250
<i>P. notatum</i>	250	s/a	125
<i>Rhizopus sp</i>	250	s/a	125
<i>Aspergillus sp</i>	208.33	s/a	125
<i>A. nidulans</i>	500	s/a	250
<i>A. oryzae</i>	178.88	s/a	250
<i>A. niger</i>	125	s/a	250
<i>C. albicans</i>	100	100	125
<i>C. parapsilosis</i>	75	100	50
<i>C. neoformans</i>	75	50	75
<i>C. tropicalis</i>	25	75	100

s/a: sin actividad

Tabla II. Concentraciones mínimas inhibitorias [µg/mL] Extractos de Partes aéreas

	Partes aéreas		
	Hex	AcOEt	MetOH
<i>E. coli</i>	125	125	125
<i>S. aureus</i>	150	250	250
<i>P. notatum</i>	250	125	250
<i>Rhizopus sp</i>	250	125	125
<i>Aspergillus sp</i>	156.25	178.57	125
<i>A. nidulans</i>	125	62.5	250
<i>A. oryzae</i>	138.8	178.57	125
<i>A. niger</i>	138.8	138.8	250
<i>C. albicans</i>	100	100	125
<i>C. parapsilosis</i>	75	75	75
<i>C. neoformans</i>	25	25	50
<i>C. tropicalis</i>	25	25	50

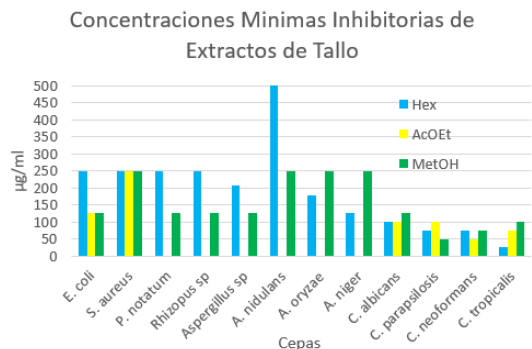


Figura IV. MIC Tallo

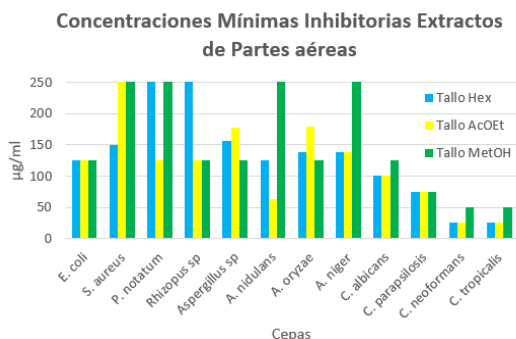


Figura V. MIC Partes aéreas.

VI. DISCUSIÓN

Las Concentraciones mínimas inhibitorias resultantes tienen gran relevancia debido a que se trata de extractos crudos, en el caso específico de los extractos de las partes aéreas (flor, hojas y semillas) se puede observar mayor actividad contra los microorganismos descritos. Por otra parte en las pruebas realizadas con hongos filamentosos se observó que en los diferentes extractos existieron cambios morfológicos notables, en especial el extracto con acetato de etilo del tallo con el cual se observó una estimulación de crecimiento y producción de pigmento en comparación con los controles negativos.

Los antecedentes existentes sobre el uso de esta planta son únicamente de uso etnobotánico, por lo cual únicamente se tiene reportado su uso como tratamiento para el “mal de orín.” La información indica que se emplea como una infusión, [2] sin embargo no existen estudios formales donde se demuestre la actividad antimicrobiana de los extractos de esta planta.

Todos los resultados lograron ser reproducibles debido a que cada prueba es el resultado de dos estudios independientes con diferencia de tiempo considerable, en el caso de las cepas del género *Candida* se probó hasta cuatro ocasiones con cada extracto. El estudio fue evaluado con un Lector de placas Epoch de Biotek, el cual midió la absorbencia en cada pozo, arrojando valores estadísticos en donde se destaca la variación en comparación con el blanco y el control de crecimiento positivo. Los resultados expuestos en las Tablas 1 y 2 corresponden a la evaluación visual en conjunto de las lecturas de absorbencia, en donde el porcentaje de inhibición fuese mayor al 50%.

Los extractos de partes aéreas y tallo de diferentes polaridades en conjunto muestran el gran potencial de la planta *Simsia sp.*, que responde a una alternativa para el uso de antimicrobianos debido a las nuevas resistencias que están generando algunas cepas en general, como el caso de las cepas causantes de infecciones urinarias como *E. coli*, [8] con el plus de ser de origen natural. Otra de las posibles aplicaciones para esta nueva alternativa, es en el desarrollo de nuevas tecnologías en alimentos, donde existe una constante preocupación por el crecimiento de hongos filamentosos y levaduras que puedan afectar a los alimentos desde la producción hasta el consumo, considerando un conservador alimenticio de origen natural y de bajo costo.

Diversos estudios muestran nuevas alternativas para combatir enfermedades bacterianas [9] a partir de extractos naturales de plantas utilizadas en la medicina tradicional. [10] Este estudio propone un aprovechamiento de explotación para estas especies con fines etnobotánicos, que no cambiará su vocación arvense, sino que plantea una explotación de especies no cultivadas que deberá ser estandarizado en lugar de la eliminación de la competencia que representan para los cultivos. El impacto dentro de la comunidad sería de gran importancia debido a que los recursos invertidos en la eliminación de este tipo de vegetación, se verían reemplazados por un beneficio al dejar que la planta se desarrolle para su aprovechamiento como antimicrobiano dentro de la industria clínica y alimenticia.

VII. CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que *Simsia sp.* posee inhibición contra diferentes cepas, en especial *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans*, *C. tropicalis* y *E. coli* (Desde 25 µg/mL) las cuales son causantes del “mal de orín”. Los resultados preliminares indican que la especie puede resultar útil como está indicada en el uso etnobotánico para dar tratamiento a este padecimiento. De la misma manera, al poseer inhibición en hongos filamentosos con el potencial de afectar a los alimentos desde la producción hasta el consumo, se considera el desarrollo de un posible conservador alimenticio de origen natural y de bajo costo. La validación del tratamiento clínico y la aplicación en la industria alimentaria requiere más investigaciones de la especie, así como de la descripción de su actividad biológica y de los compuestos presentes en los extractos. Con el fin de generar un impacto social sobre la comunidad de Calpulalpan, Tlaxcala, donde se utiliza esta planta, desarrollando proyectos donde pueda generarse algún beneficio para la comunidad. Se propone continuar su estudio de sus propiedades biológicas así como los efectos sobre la morfología de hongos, pruebas de actividad antimicrobiana con más cepas del género *Candida* y así dar uso con valor agregado a una planta considerada como plaga.

SOBRE LOS AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la dirección administrativa y de laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas por brindar la oportunidad a los alumnos de participar en proyectos de investigación en las modalidades de los programas de Invierno y Verano de Investigación, así como también el fomento de las mismas y permitir las largas jornadas de trabajo asegurando la calidad de los instrumentos y laboratorios.

APÉNDICES

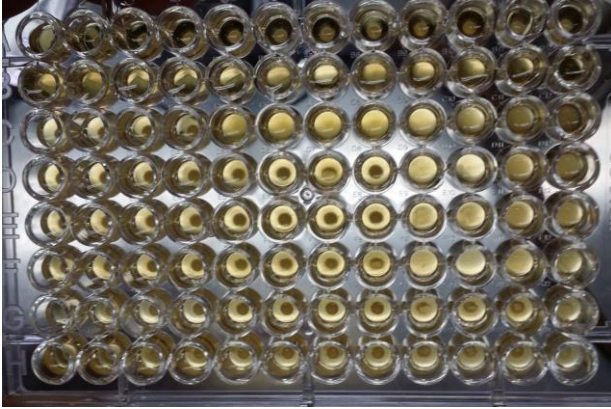


Figura VI. Diferenciación visual de crecimiento/inhibición.

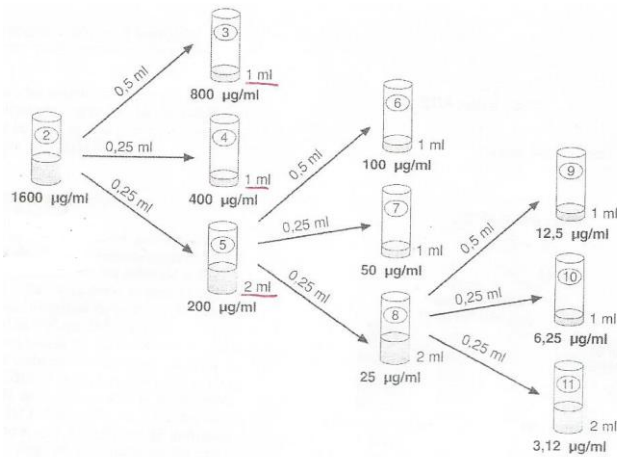


Figura VII.3. Esquema para las diluciones de antifúngicos insolubles en agua. Diluyente dimetil sulfoxido (DMSO).

Figura VII. Diluciones-Metdología-Ejemplo [7]

REFERENCIAS

- [1] Villegas, M. de Gante, "Malezas de la cuenca de México: especies arvenses," Instituto de Ecología. Galache, 1979
- [2] C. Zolla, A. Argueta, Mata, S, Biblioteca Digital de la medicina tradicional mexicana. [En línea]. 2009. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/>
- [3] C. Guédeza, L. Cañizaleza, L. Avendaño, J. Scorzab, C. Castilloa, R. Olivarc, L. Sáncheza, "Actividad antifúngica del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis* L.) sobre hongos postcosecha en frutos de lechosa (*Carica papaya* L.)," Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 34, 81-85., 2014
- [4] UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO. Departamento de Microbiología y Parasitología. [En línea] Julio 2014. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/glosario.html#letra>.
- [5] G. Honra Quintana, M. Silva Diaz, W. Vicente Taboada, J. Tamariz Ortiz, "Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas," Revista Medica Herediana, pp. 16:39-45, 2009
- [6] E. Cantón Lascasa, E. Martín Mazuelos, A. Espinel-Ingroff, "Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos" (documentos M27-A3, M38-A y M44-A), Revista Iberoamericana de Micología, pp. 15a1-15a17, 2007
- [7] M. Cuenca-Estrella, J. Rodríguez-Tudela, "Método estandarizado por el EUCAST para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos" (documento 7.1), Revista Iberoamericana de Micología, pp. 15b1-15b5, 2007
- [8] GUAJARDO-LARA, Claudia Elena; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, Pedro Mario; AYALA-GAYTÁN, Juan Jacobo. Resistencia antimicrobiana en la infección urinaria por *Escherichia coli* adquirida en la comunidad: ¿Cuál antibiótico voy a usar?. Salud pública de México, 2009, vol. 51, no 2, p. 155-159.
- [9] S.G Deans, G Ritchie, "Antibacterial properties of plant essential oils" International Journal of Food Microbiology, 5, 165-180. 1987
- [10] J. L. Rios, M. C. Recio, "Medicinal plants and antimicrobial activity". Journal of ethnopharmacology, 100(1), 80-84, 2005