

Comparación del efecto antimicrobiano de partes aéreas y corteza de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* sobre *Brucella canis*

Comparison of antimicrobial effect of bark and aerial parts of Prosopis flexuosa var. *depressa* against *Brucella canis*

Ardoino, S.M.¹; Boeris, M.A.¹; Baruta, D.A.²; Toso, R.E.¹

¹CIDEF. FCV-UNLPam.

²Cátedra Enfermedades Infecciosas. FCV-UNLPam.

silviardoino@hotmail.com

Resumen

La brucelosis canina es una enfermedad zoonótica causada por *Brucella canis*. El tratamiento indicado con combinaciones de antibióticos suele no ser totalmente efectivo y se presentan recidivas. Los extractos vegetales de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* han demostrado tener actividad antimicrobiana in vitro sobre *Brucella canis*. Mediante extracción en sohxlet con solventes de polaridad creciente se obtuvieron diferentes fracciones las cuales se sometieron a pruebas de inhibición del crecimiento en diluciones en agar para evaluar en que fracción residía el efecto antimicrobiano. La fracción metanólica de las partes aéreas de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* demostró mantener la acción antibacteriana hasta diluciones de 1/80. Las reacciones de caracterización indican la presencia de taninos, lípidos, hidratos de carbono, núcleos esteroidales y triterpénicos, alcaloides, saponinas y proteínas y aminogrupos.

Palabras claves: *Prosopis* spp, *Brucella canis*, extractos vegetales, efecto antimicrobiano.

Abstract

Canine brucellosis is a zoonotic disease caused by *Brucella canis*. The treatment with antibiotics combinations is often not fully effective, with relapses. Plant extracts of *Prosopis flexuosa* var. *depressa* have

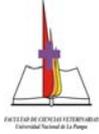
demonstrated antimicrobial activity in vitro over *Brucella canis*. By Soxhlet extraction with solvents of increasing polarity different fractions were obtained which were tested for growth inhibition in agar dilution to assess what fraction resided in the antimicrobial effect. The methanol fraction of the aerial parts of *Prosopis flexuosa* var. *depressa* showed antibacterial action up to dilutions of 1/80. Characterization reactions show the presence of tannin, lipids, carbohydrates, steroid nucleus and triterpene alkaloids, saponins, proteins and amino groups.

Key words: *Prosopis* spp, *Brucella canis*, plant extract, antimicrobial effect.

Introducción

La brucelosis canina causada por *Brucella canis* es una enfermedad infecciosa que causa problemas reproductivos, principalmente en los criaderos y además es una zoonosis (Center for Food Security & Public Health, 2009). El agente etiológico *Brucella canis* es un cocobacilo Gram negativo intracelular, los perros son su único huésped natural.

La sintomatología es principalmente reproductiva (Shin y Carmichael, 1999). En las hembras el síntoma más prominente es el aborto después de los 45-55 días de gestación en el 75% de los casos. Ocasionalmente ocurre muerte embrionaria temprana y reabsorción (Shin y Carmichael,



1999). En los machos la sintomatología preponderante incluye epididimitis, dermatitis escrotal e infertilidad (Briseño González et al., 2004). Las lesiones abarcan degeneración testicular, disconespondilitis, artritis, azoospermia, dificultad para eyacular, baja concentración y baja motilidad espermática, eyaculado sanguinolento (Shin y Carmichael, 1999; Borie et al., 2002; Briseño Gonzalez et al., 2004; Miranda et al., 2005).

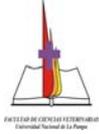
La eliminación de la bacteria en la hembra preñada se produce a partir del feto, la placenta, los fluidos fetales y la descarga vaginal posterior al aborto. En la hembra no preñada en las descargas vaginales normales, sobre todo en el estro y también por la leche. Los machos infectados eliminan brucellas por semen uno o dos meses post infección, y luego intermitentemente por años (Borie et al., 2002). El microorganismo ingresa principalmente por ingestión de excreciones y secreciones contaminadas, vía genital, oronasal y mucosa conjuntival. La enfermedad llega a los humanos de la misma forma, a través de ingestión, o por mucosas o piel lesionada (Center for Food Security & Public Health, 2009).

Los resultados más alentadores al aplicar tratamientos con antimicrobianos se obtuvieron con combinaciones de drogas tales como tetraciclina, doxiciclina, minociclina y estreptomycin. Sin embargo la recrudescencia de la infección después de la cesación del tratamiento es común. Las mejores tasas de eliminación de la enfermedad en los criaderos se han obtenido mediante el sacrificio de los animales enfermos. Esta es la recomendación, sobre todo en reproductores de criaderos (Shin y Carmichael, 1999; Center for Food Security & Public Health, 2009).

En la medicina moderna las plantas tienen aplicaciones importantes que van mucho

más allá de ser fuente directa de agentes terapéuticos. Actualmente el estudio de la estructura química de los principios activos de plantas utilizadas tradicionalmente puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas (Bermúdez et al., 2005). En todo el mundo se han comenzado a investigar desde hace unos años aquellas plantas que tradicionalmente se utilizaban en el tratamiento de enfermedades con la intención de confirmar estos efectos y aislar los grupos químicos responsables de los mismos (Heinrich, 2003; Ozbay y Alim, 2009; Zuo et al., 2008). En nuestro país hay trabajos que muestran resultados altamente reproducibles del efecto antimicrobiano logrado con extractos obtenidos de plantas utilizadas por la medicina folclórica. Estudios posteriores permitieron la identificación de los compuestos químicos estables, responsables del efecto antibacteriano (Zampini et al., 2007; Penna et al., 2001). Los métodos de búsqueda incluyen la prospección al azar y la utilización de la información etnobotánica para seleccionar las plantas en busca de compuestos químicos con actividad biológica (Bermúdez et al., 2005).

El género *Prosopis* pertenece a la familia Fabaceae, las especies de este género se distribuyen por América en las regiones áridas y semiáridas. *Prosopis flexuosa* presenta las variedades *flexuosa*, *depressa* y *fruticosa*. Estas plantas han sido utilizadas por los pobladores del desierto desde épocas prehistóricas como alimento, para elaboración de bebidas y para uso medicinal por sus propiedades diuréticas, astringentes y anticatarrales (Álvarez y Villagra, 2009). En la actualidad se ha documentado la actividad antimicrobiana de principios activos obtenidos del género *Prosopis* frente a diversas bacterias (Salvat et al., 2004; Khan et al., 2010), entre otras *Brucella canis*



(Oriani et al., 2006).

Los metabolitos secundarios de las plantas, también denominados productos secundarios, o productos naturales no parecen tener una función directa en procesos respiratorios, fotosintéticos, de transportes, nutrición o síntesis en el metabolismo vegetal. Sin embargo, tienen un importante valor medicinal. Desde la antigüedad se usaban para combatir enfermedades. Se agrupan en cuatro clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides (Ávalos García y Pérez Urria-Carril, 2009). Actualmente se ha comprobado la actividad antibacteriana de los taninos, pertenecientes al grupo de los terpenos (Anderson et al., 2012), al igual que el de los núcleos esteroidales (Cuca Suárez et al., 2011) y los triterpenos (Frohlich et al., 2012); las saponinas, pertenecientes al grupo de los glicósidos (Hu, 2012; Kuklinski, 2000); los flavonoides, pertenecientes al grupo de los compuestos fenólicos (Li et al., 2012) y los alcaloides (Cuca Suárez et al., 2011; Zhou et al., 2012). Para lograr avances en la identificación de compuestos, los estudios bioguiados utilizando solventes de distinta polaridad han demostrado ser un método adecuado (Penna et al., 2001; Hage et al., 2010; Khan et al., 2010), unido a reacciones químicas (Domínguez, 1979) para caracterizar los compuestos presentes en las fracciones.

Materiales y Métodos

Extracción en soxhlet

Para la extracción se partió de 20 g de materia seca molida que fue colocada en un cartucho de papel de filtro en el soxhlet. Se realizaron extracciones sucesivas durante 8 horas para cada solvente, siendo utilizados solventes de polaridad creciente: hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol y agua. El volumen final de cada solvente fue llevado a sequedad en rotavapor a presión

reducida y el residuo se almacenó a -20° hasta su utilización en las pruebas de actividad antimicrobiana. Este proceso se realizó por separado para partes aéreas y corteza de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*.

Efecto antimicrobiano

Las pruebas de actividad antimicrobiana se llevaron a cabo en placas de Petri de 60 mm con 10 ml de agar Müller Hinton con sangre ovina al 10% al cual se le adicionaron 100 μ l de la fracción del extracto. Cada placa se sembró con una solución de *Brucella canis* RM 6/66 con una concentración equivalente al 0,5 de Mc Farland. Se incubó a 37°C durante 72 horas y se realizó la lectura. Se realizaron 3 repeticiones para cada extracto.

CIM

Preparación de las placas:

Se utilizaron placas de 60 mm en las cuales se colocaron 9 ml de agar Müller Hinton con 10% de sangre ovina y a cada una se le agregó 1 ml de cada dilución de extracto.

Preparación de las diluciones de los extractos:

Tubo N° 1: 9 ml de agua destilada + 1 ml de extracto. Dilución obtenida: 1/10.

Tubo N° 2: 5 ml de agua destilada + 5 ml de tubo 1. Dilución obtenida: 1/20.

Tubo N° 3: 5 ml de agua destilada + 5 ml de tubo 2. Dilución obtenida: 1/40.

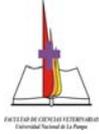
Tubo N° 4: 5 ml de agua destilada + 5 ml de tubo 3. Dilución obtenida: 1/80

Las placas se sembraron con *Brucella canis* RM6/66 equivalente a una solución 0,5 de Mc Farland. Se incubó durante 72 horas a 37° y se procedió a la lectura.

Se realizaron tres repeticiones para cada dilución.

Reacciones de caracterización

Reacción de la gelatina (para determinación taninos): a 0,2 ml de la fracción problema se le agregaron 0,2 ml de solución acuosa de gelatina al 0,5%. Se comparó la turbidez o



volumen de precipitado con el producido en las mismas condiciones por 0,2 ml de una solución acuosa de ácido tánico.

Reacción de Cloruro férrico (para determinación de taninos y oxhidrilos fenólicos): a una alícuota de 0,2 ml de la muestra se agregó solución acuosa o etanólica de FeCl₃ al 1% y se mezcló. La aparición de color verde evidencia la presencia de un derivado de catecol y un color azul de un derivado de pirogalol. Se comparó el color con el producido en las mismas condiciones por 0,2 ml de una solución acuosa de ácido tánico.

Reacción de Shinoda (para determinación de flavonoides): a una solución etanólica de 0,2 ml se le agregó la mitad del volumen de ácido clorhídrico concentrado, se mezcló y se agregó limaduras de magnesio. Se mezcló nuevamente y se dejó 5 minutos, se le agregó 2 ml de agua y se trasvasó a un tubo agitando con 0,4 ml de alcohol amílico. Se dejó decantar para comparar el color de la fase amílica con el producido en las mismas condiciones por 0,2 ml de una solución metanólica de rutina. Al extracto alcohólico incoloro o ligeramente amarillo se le colocó un pequeño trozo de magnesio y unas pocas gotas de HCl concentrado, el desarrollo inmediato de color se tamará como indicativo de la presencia de flavonas y flavonoides (amarillo a rojo), flavanololes (rojo a magenta), flavanonas (rojo, magenta, violeta, azul), isoflavonas (amarillo).

Reacción de la Ninhidrina (para determinación de aminas): se realizó sobre papel colocando una gota de extracto y se dejando a secar, se le agregó una cantidad similar de solución etanólica de ninhidrina al 0,2% y paralelamente se realizó un ensayo en blanco. Se calentó el papel en estufa a 110-120°C hasta aparición de ligero color en el blanco. Se comparó la mancha azul violácea con la de una solución testigo de triptofano en etanol al 50%.

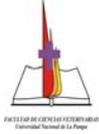
Reacción de Liebermann Burchard (para determinación de núcleos esteroidales y triterpénicos): a 0,2 ml de solución clorofórmica del extracto se agregó 0,2 ml de anhídrido acético, se mezcló y agregó una gota de ácido sulfúrico concentrado. Se consideró positiva la aparición de color azul, verde o naranja. La coloración azul o verdosa se comparó con el producido por una solución de colesterol en cloroformo. La coloración naranja se comparó con el producido por diferentes soluciones de progesterona en cloroformo.

Reacción de Borntrager (para determinación de antraquinonas): sobre la muestra seca en polvo se colocó 1 g de material pulverizado en tubo de ensayo, se agregó 15 ml de hidróxido de sodio al 5% en agua y calentó a 100°C durante 20 minutos, se enfrió, filtró y se llevó a volumen. Se acidificó con ácido clorhídrico concentrado y agitó con 5 ml de benceno. Se dejó decantar, se tomó 2,5 ml de la fase bencénica, se pasó a otro tubo, se agitó con 0,5 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio al 5%. Se consideró positiva la reacción cuando la fase acuosa tomó color rojo. Se comparó el color con el de una solución alcalina de 1-8-dihidroxiantraquinona.

Reacción de Kedde (para determinación de cardenólidos): se colocó una microgota de la fracción problema en papel de filtro, se dejó secar y se agregó el reactivo de Kedde. Se dejó 5 minutos y se leyó. Se comparó con el color producido en las mismas condiciones por diferentes soluciones de digitoxina en etanol.

Reacción de Bertrand (para determinar la presencia de alcaloides): se agregó el reactivo silico túngstico a la fracción problema. Se consideró positiva la presencia de alcaloides cuando se observó precipitado

Reacción de Guignard (para determinación de glucósidos cianogenéticos) a partir del extracto desecado en polvo, se colocaron



0,5g de droga seca recién pulverizada en un tubo de fondo chato, se humectó con cantidad suficiente de agua, se agregó una gota de cloroformo y se mezcló. El tubo se tapó con un disco de papel picrosódico de tamaño adecuado, sostenido por un portaobjeto. Se calentó a 35°C durante 3 h y se observó el color desarrollado. Se consideró positiva la reacción frente a la presencia de color rojo.

Prueba de la espuma (para determinación de saponinas): se colocó 1 ml de la solución problema en un tubo de ensayo, se tapó y se agitó fuertemente durante 15 segundos. Se realizó la lectura de la altura de la espuma a los 15 minutos, se consideró negativa la reacción cuando la altura es menor a los 5 mm y muy positiva si supera los 15 mm.

Resultados

La fracción metanólica de extractos de partes aéreas de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* presentaron actividad inhibitoria completa sobre el crecimiento bacteriano. En tanto que la fracción de dicloro metano presentó una inhibición leve.

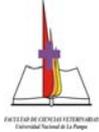
De los extractos obtenidos de corteza de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* solo presentó inhibición completa el extracto metanólico.

Al realizar las pruebas de CIM el extracto metanólico de partes aéreas mantuvo la inhibición del crecimiento bacteriano hasta concentraciones de 1/80, en tanto que el extracto metanólico de corteza no presentó inhibición del crecimiento bacteriano en ninguna concentración.

Las reacciones de caracterización realizadas sobre el extracto metanólico de partes aéreas de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* evidenciaron la presencia de taninos, lípidos, hidratos de carbono, núcleos esteroidales y triterpénicos, alcaloides, saponinas y proteínas y aminogrupos.

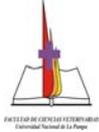
Discusión y Conclusiones

La extracción por solventes de polaridad creciente, es un método que permite obtener fracciones a partir de las cuales se pueden identificar quienes son las responsables de los efectos estudiados. Así lo han demostrado trabajos, como los de Hage (2010) y Wu (2012), en diferentes plantas que se han usado tradicionalmente con fines medicinales. Por otra parte Khan (2010) usó el mismo método sobre otra especie del género *Prosopis*, combinando la extracción por solventes de polaridad creciente y la determinación de CIM frente a cepas multirresistentes de *Candida* y *Streptococcus*. La extracción en Soxhlet permitió concluir que en la fracción metanólica reside el efecto antimicrobiano contra *Brucella canis*. El mantenimiento de la capacidad de inhibición del crecimiento microbiano se mantuvo hasta diluciones del extracto de 1/80 por parte de la fracción metanólica de partes aéreas de *Prosopis flexuosa* var. *depressa*. La presencia de taninos, saponinas, flavonoides, núcleos terpénicos y alcaloides, puestos en evidencia mediante las reacciones químicas de caracterización podrían justificar en forma separada o en asociaciones el efecto antimicrobiano. Esta especulación es consistente con estudios llevados a cabo por otros autores que encontraron actividad antibacteriana en taninos (Anderson et al., 2012), en núcleos esteroidales (Cuca- Suárez et al., 2011), en triterpenos (Fröhlich et al., 2012), en saponinas (Hu, 2012) y en alcaloides (Cuca Suárez et al., 2011; Zhou et al., 2012). Serán necesarios nuevos estudios para relacionar los grupos químicos encontrados en la fracción metanólica de *Prosopis flexuosa* var. *depressa* con la actividad antimicrobiana sobre *Brucella canis*.



Bibliografía

- Álvarez, J.; Villagra, P.** 2009. Prosopis flexuosa DC. (Fabaceae, Mimosoideae) Kurtziana. Tomo 35 (1): 47-61.
- Anderson, R.C.; Vodovnik, M.; Min, B.R.; Pinchak, W.E.; Krueger, N.A.; Harvey, R.B.; Nisbet, D.J.** 2012. Bactericidal effect of hydrolysable and condensed tannin extracts on *Campylobacter jejuni* in vitro. *Folia Microbiol (Praha)*. 57(4):253-8. Epub 2012 Apr 20.
- Ávalos García, A.; Pérez Urria-Carril, E.** 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal*. 2(3): 119-145.
- Bermúdez, A.; Oliveira Miranda, M.; Velásquez, D.** 2005. La Investigación Etnobotánica sobre Plantas Medicinales: Una revisión sobre sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*. 30 (8): 453 – 459.
- Borie, C.; Cepeda, R.; Villarroel, M.; De Los Reyes, M.** 2002. Descripción de características reproductivas en tres perros seropositivos a *Brucella canis*. *Arch. Med. Vet.* [online], 34 (1): 111-116. Consultado 17-05-2011.
- Briseño González, H.; Páramo Ramírez, R.; Flores Castro, R.; Suárez Güemes, F.** 2004. Problemas reproductivos en perros machos infectados con *Brucella canis*. *Veterinaria México*. 35:121-128.
- Center for Food Security & Public Health. Iowa State University.** 2009. Canine Brucellosis: *Brucella canis*. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/brucellosis_canis.pdf. Consultado el 20 mayo de 2010.
- Cuca Suárez, L.E.; Coy Barrera, C.A.; Coy, E.D.; Lozano Moreno, J.M.** 2011. Actividad antibacteriana de terpenoides y alcaloides aislados de tres plantas colombianas. *Rev Cubana Farm*;45(2): 275-282.
- Domínguez X. A.** 1979. Métodos de investigación fitoquímica, 1a. ed., Ed. Limusa, México. México. Pág.1-281.
- Fröhlich, J.K.; Froeder, A.L.; Janovik, V.; Venturini, T.P.; Pereira, R.P.; Boligon, A.A.; de Brum, T.F.; Alves, S.H.; da Rocha, J.B.; Athayde, M.L.** 2012. Antioxidant capacity, antimicrobial activity and triterpenes isolated from *Jatropha isabellei* Müll Arg. *Nat Prod Res*. 2012 Jul 13. [Epub ahead of print] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22788721> Consultado: 01-10-2012.
- Hage, S.; Kienlen-Campard, P.; Octave, J.; Quentin-Leclercq, J.** 2010. In vitro screening on β -amyloid peptide production of plants used in traditional medicine for cognitive disorders. *J. Ethnopharmacol*. 131(3):585-91.
- Heinrich, M.** 2003. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures? *Curr Top Med Chem* 3(2):141-54.
- Hu, J.L.; Nie, S.P.; Huang, D.F., Li, C.; Xie, M.Y.; Wan, Y.** 2012. Antimicrobial activity of saponin-rich fraction from *Camellia oleifera* cake and its effect on cell viability of mouse macrophage RAW 64.7. *J Sci Food Agric*. 92(12):2443-9. doi: 10.1002/jsfa.5650. Epub 2012 Mar 19.
- Khan, R.; Zakir, M; Afaq, S.H. ; Latif, A; Khan, A.** 2010. Activity of solvent extracts of *Prosopis spicigera*, *Zingiber officinale* and *Trachyspermum ammi* against multidrug resistant bacterial and fungal Straits. *J. Infect. Dev. Ctries*. 4(5):292-300.
- Kuklinski C.** 2000. *Farmacognosia* 1a ed. Ed. Omega, Barcelona, España. pág. 15171.
- Miranda, A.; Cejas, M.; Báez, E.** 2005. *Brucella canis* en el perro: sintomatología más frecuente y relación con el diagnóstico de laboratorio. XXVI Sesión de Comunicaciones Científicas 2005. 85



- Aniversario. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste. Presentación de Posters. Pág 66-67.
- Oriani S, Ardoino S, Toso R.** 2006. Actividad antimicrobiana de extractos metanólicos de plantas nativas y naturalizadas de la provincia de La Pampa, frente a *Brucella canis*. Congreso SADEBAC 2006- 25 aniversario. IV Actividad Científica Anual de la Sociedad Argentina de Microbiología. Buenos Aires 31 de Octubre y 1 de Noviembre de 2006.
- Ozbay, H.; Alim, A.** 2009. Antimicrobial activity of some water plants from the nothesatern Anatolian region of Turkey. *Molecules*. 14(1):321-8.
- Penna, C.; Marino, S.; Vivot, E.; Cruañes, M.C.; de D Muñoz, J.; Cruañes, J.; Ferraro, G.; Gutkind G.; Martino V.** 2001. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *J. Ethnopharmacol*. 77(1):37-40.
- Salvat, A.; Antonacci. L.; Fortunato, R.; Suarez, E.; Godoy, H.** 2004. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phytomedicine*. 11(2-3):230-4.
- Shin, S.; Carmichael, L.** 1999. Brucellosis canina causada por *Brucella canis*. En:Recent Advances in Canine Infectious. Diseases. Carmichael, L. Ed. International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA. Traducido por C. Di Lorenzo y C. Gobello, Fac. De Ciencias Veterinarias, UNLP, Argentina. Documento on line: A0101.1199.ES. Consultado 20 de mayo de 2010.
- Wu, W.T.** 2012. Evaluation of anti-inflammatory effects of *Brousonettia papyrifera* stem bark. *Indian J Pharmacol*. 2012 Jan;44(1):26-30.
- Zampini, I.; Cudmani, N.; Isla, M.** 2007. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 41 (3): 385-93.
- Zhou, X.Z.; Jia, F.; Liu, X.M.; Yang, C.; Zhao, L.; Wang, Y.J.** 2012. Total alkaloids from *Sophora Alopepecuroides* L. Increase susceptibility of extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* isolates to cefotaxime and ceftazidime. *Chin J Integr Med*. 2012 Apr 11. [Epub ahead of print].
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Zhou>. Consultado: 01-10-2012.
- Zuo, G.Y.; Wang, G.C.; Zhao, Y.B.; Xu, G.L.; Hao, X.Y.; Han, J.; Zhao, O.** 2008. Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Ethnopharmacol*. 120 (2):287-90.