

STAPHYLOCOCCUS AUREUS SENSIBLE A EXTRACTOS METANÓLICOS OBTENIDOS DE PLANTAS NATIVAS DE LA PROVINCIA DE LA PAMPA, ARGENTINA

Toribio, M. S.¹; Oriani, S. D.²; Toso, R. E.¹; Tortone, C. A.²; Fernández, J. G.¹

¹Cátedra de Farmacología, ²Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam. Calle 5 y 116, (6360) General Pico, La Pampa. mtoribio@vet.unlpam.edu.ar

Resumen

El uso masivo e indiscriminado de los antimicrobianos trae consigo algunas consecuencias negativas como es la generación de cepas bacterianas resistentes. Considerando la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas y teniendo en cuenta que las plantas son un reservorio de principios activos aún no investigados en su totalidad, se realizó un estudio primario de 80 extractos vegetales provenientes de plantas silvestres recolectadas en diferentes áreas geográficas de la provincia de La Pampa con el objeto de detectar nuevas fuentes de agentes antimicrobianos. El 41,25% de la especies vegetales presentaron halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*.

Palabras claves: antimicrobianos, *Staphylococcus aureus*, extractos vegetales.

Abstract

The massive and indiscriminate use of antimicrobials brings about some negative consequences like the generation of resistant bacterial strains. Considering the need to get new therapeutic alternatives and having presented the idea that plants are active constituents reservoir not totally studied yet, a primary screening was performed in 80 of the vegetable extracts coming from wild plants collected in different geographic areas in the province of La Pampa. The purpose was to detect new sources of antimicrobial agents. 41,25% of the vegetable species showed an inhibition zone against *Staphylococcus aureus*.

Key words: antimicrobial, *Staphylococcus aureus*, vegetable extracts.

Introducción

La bacteria *Staphylococcus aureus* es un patógeno que aparece muy frecuentemente como agente etiológico en diversas patologías

de los animales, entre ellas la mastitis bovina (Calvinho et al., 2002), y las otitis y piodermias del canino (Watson and Rosin, 2002). La aplicación de antimicrobianos para el control de las estafilococias y otras enfermedades infecciosas en los animales y el hombre es una práctica habitual. El uso masivo e indiscriminado de estas drogas trae consigo algunas consecuencias negativas como es la generación de cepas bacterianas resistentes. La presentación de este fenómeno es preocupante por el alto porcentaje de bacterias resistentes a uno o más fármacos (Denamiel et al., 2004). Por otro lado, el descubrimiento de nuevas drogas antimicrobianas no es una tarea sencilla debido a que de cientos de moléculas que se investigan un número muy reducido de ellas llega a la fase de evaluación clínica y sólo algunas son comercializadas.

Entre otros métodos empleados para descubrir nuevas drogas, la industria farmacéutica centra su atención en la investigación de compuestos naturales, principalmente en los metabolitos secundarios de las plantas. Estos son utilizados por las plantas como mecanismo de defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros predadores, siendo varios de ellos útiles como compuestos medicinales. La investigación de esta fuente de recursos farmacológicos se viene desarrollando en diversos lugares del mundo y de nuestro país (Anesini and Pérez, 1993; Ali-Sahtayeh et al., 1998; Murillo Alvarez et al., 2001). En algunos casos identificaron componentes antimicrobianos, tales como terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, poliacetilos, lecitinas, polipéptidos, flavonoides, quinonas, flavonas, coumarinas y taninos (Cowan, 1999).

Estudios realizados en otras provincias argentinas, demostraron que algunas especies estudiadas, como la del género *Baccharis* y



Oxalis, poseen actividad antimicrobiana (Feresin et al., 2001). Sin embargo las condiciones edáficas y climáticas propias del lugar donde crecen las especies silvestres, podrían influir en la calidad y cantidad de principios bioactivos. Esta particularidad determina que en ocasiones la misma especie recolectada en distintas áreas geográficas genere resultados farmacológicos diferentes, al variar el contenido de principios activos responsables de la actividad biológica (Kuklinski, 2000). La medicina popular le ha asignado a varias plantas usos relacionados con la actividad antimicrobiana, como ejemplo puede citarse a *Eucalyptus* spp como antiséptico y para tratar las infecciones de las vías respiratorias superiores (Ahmad and Beg, 2001), propiedad que fue confirmada científicamente (Srinivasan et al., 2001) o a *Ephedra ochreatea* para afecciones urinarias (Del Vitto et al., 1997).

Considerando la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas para los tratamientos antimicrobianos y sabiendo que las plantas son un reservorio de principios activos aún no investigado en su totalidad, se propuso realizar un estudio primario de algunos recursos herbolarios de la provincia de La Pampa con el objeto de detectar especies vegetales con propiedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*.

Materiales y Métodos

Recolección y acondicionamiento del material vegetal

Se recolectaron 80 especies vegetales en diferentes Departamento de la provincia de La Pampa, Argentina. Cada ejemplar fue identificado, clasificado y desecado. Un ejemplar de referencia fue depositado en el Herbario de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa (SRFA).

A continuación se detallan las especies recolectadas, indicando nombre científico y vulgar:

Mitracarpus megapotamicus (Micus), *Artemisia annua* (Altamisa), *Althernanthera philoxeroides* (Lagunilla), *Verbena bonariensis* (Verbena), *Verbena litoralis* (Verbena), *Eragrostis pilosa* (Gramillón), *Rhynchosia senna* (Porotillo), *Ste-*

llaria pallida (Capiqui), *Eucalyptos cinerea* (Eucalyptos medicinal), *Tribulus terrestris* (Roseta francesa), *Datura ferox* (Chamico), *Cortadeira selloana* (Cortadera), *Phyla canescens* (Yerba del mosquito), *Amaranthus quitensis* (Yuyo Colorado), *Chenopodium multifidum* (Paico), *Muehlenbeckia sagitifolia* (Zarzaparrilla Colorado), *Anredera cordifolia* (Enredadera de papa), *Vinca major* (Pervinca), *Capsella bursa pastoris* (Bolsa de pastor), *Euphorbia helioscopia* (Lechetrés), *Chenopodium ambrosoides* (Paico macho), *Solidago chilensis* (Vara de oro), *Xanthium apinosum* (Abrojo. Ceba caballo), *Poligonum hydropiperoides* (Lagunilla), *Tessaria absinthioides* (Pájaro bobo), *Parkinsoniana aculeata* (Cina cina), *Melilotus albus* (Trébol de olor blanco), *Plantago lanceolata* (Siete venas), *Chenopodium album* (Quinoa), *Bidens subalternans* (Amor seco), *Schkurhia pinnata* (Matapulgas), *Thymophylla pentachaeta* (Perlita), *Schinus fasciculatus* (Molle negro), *Aloysia polistachya* (Té de burro), *Acmella decumbens* (Zuma), *Salix babilónica* (Sauce llorón), *Ambrosia tenuifolia* (Altamisa), *Marrubium vulgare* (Malva rubia), *Xanthium cavanillesii* (Abrojo grande), *Comelina erecta* (Flor de Santa Lucía), *Atriplex undulata* (Zampa blanca), *Solanum biflorum* (Tomatillo), *Oenothera grandiflora* (Yerba de San Juan), *Schoenoplectus californicus* (Junco de Laguna), *Senecio pinnatus* (Senecio), *Ailanthus altissima* (Árbol del cielo), *Rosa rubiginosa* (Rosa mosqueta), *Melia azederach* (Paraíso), *Ephedra ochreatea* (Solupe frutero), *Viola adorata* (Violeta), *Salix alba* (Sauce. Mimbres amarillo), *Grindelia chilensis* (Virreina. Melosa), *Clematis montevidensis* (Barba de viejo. Bejuco), *Iodina Rhombifolia* (Sombra de Toro), *Thelesperma megapotamicum* (Té pampa), *Lippia turbinata* (Poleo), *Gnaphalium gaudidraudianum* (Marcelita. Vira vira), *Aloysia gratissima* (Azar del monte), *Ruta chalepensis* (Ruda), *Salix fragilis* (Mimbrote. Sauce negro), *Euphorbia peplus* (Lechetrés), *Parietaria debilis* (Yerba fresca), *Rumex crispus* (Lengua de vaca), *Geranium molle* (Alfilerillo), *Equisetum giganteum* (Yerba del platero), *Taraxacum officinale* (Diente de León), *Cichorium intybus* (Achicoria), *Cucurbita máxima variedad andreana* (Zapallito amargo), *Pluchea sagittalis* (Lucera), *Bauhimia forficata*



(Pezuña), *Araujia hortorum* (Tasi), *Conyza bonariensis* (Yerba carnícer), *Urtica urens* (Ortiga), *Gomphrena martiana* (Yerba del pollo), *Physalis viscosa* (Camambu), *Amaranthus standleyanus* (Yuyo colorado), *Morrenia odorata* (Tasi), *Ibicella lutea* (Cuernos del diablo), *Salsola kali* (Cardo ruso), *Salix Humboldtiana* (Sauce criollo).

Preparación de los extractos vegetales

Se maceraron 20 g de partes aéreas desecadas de cada una de las plantas en 100 ml de una solución etanol:agua (1:1 v/v) durante 24 h a temperatura ambiente. Se filtró el producto de la extracción y con el marco se repite el procedimiento anterior dos veces más. Los extractos hidroalcohólicos se juntaron y fueron llevados a sequedad en rotavapor a una temperatura de 75° C. El extracto hidroalcohólico seco se sometió a extracción metanólica tres veces consecutivas con 60 ml de solvente en cada oportunidad. El producto obtenido se filtro por papel del filtro. Los extractos metanólicos se juntaron y llevaron a sequedad a presión reducida a 75° C. Los extractos vegetales metanólicos secos se conservaron a -20° C hasta el momento del ensayo. Antes del mismo se resuspendieron

con 5 ml de agua destilada.

Microorganismo

Se utilizó una cepa de colección de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Prueba de sensibilidad

Se utilizó en la experiencia la técnica de difusión, según el método de Kirby Bauer (Bauer et al., 1966) la cual fue modificada, sustituyéndose el disco de papel por pocillos (Ahmad et al., 1998) en el medio de cultivo agar Muller Hinton solidificado. En cada pocillo se colocó 60 µl de la solución del extracto vegetal proveniente de 20 g de partes aéreas secas de cada una de las plantas recolectadas. Se utilizó como referencia estándar discos de Azitromicina. Las placas se incubaron a 37° C y se examinaron a las 24 h, registrándose los halos de inhibición del crecimiento bacteriano. Las pruebas se realizaron por duplicado.

Resultados

Tabla 1. Extractos vegetales provenientes de plantas de la provincia de La Pampa que inhibieron el desarrollo "in vitro" de *Staphylococcus aureus* (ATCC25923).

Extractos vegetales	Nombre vulgar	Diámetro de inhibición en mm ^a
<i>Ailanthus altissima</i>	Árbol del cielo	16
<i>Aloysia gratissima</i>	Azar del monte	17
<i>Aloysia polistachya</i>	Te de burro	15
<i>Ambrosia tenuifolia</i>	Altamisa	15
<i>Bidens subalternans</i>	Amor seco	24
<i>Clematis montevidensis</i>	Barba de viejo. Bejuco	14
<i>Ephedra ochreate</i> Solupe.	Solupe frutero	17
<i>Eucaliptos cinerea</i>	Eucalipto medicinal	16
<i>Euphorbia peplus</i>	Lechetrés	15
<i>Geranium molle</i>	Alfilerillo	14
<i>Grindelia chilensis</i>	Virreina. Melosa	12
<i>Ibicella lutea</i>	Cuernos del diablo	16
<i>Lippia turbinata</i>	Poleo	20
<i>Mitracarpus megapotamicus</i>	Micus	20
<i>Muehlenbeckia sagitifolia</i>	Zarzaparrilla colorada	19
<i>Oenothera grandiflora</i>	Yerba de San Juan	19
<i>Physalis viscosa</i>	Camambu	15
<i>Plantago lanceolata</i>	Siete venas	11
<i>Poligonum hidropiperoides</i>	Lagunilla	20



Rhynchosia senna	Porotillo	15
Rosa rubiginosa	Rosa mosqueta	20
Rumex crispus	Lengua de vaca	16
Ruta Chalepensis	Ruda	16
Salix alba	Sauce mimbre	12
Salix fragilis Mimbrote.	Sauce negro	15
Salix humboldtiana	Sauce criollo	16
Schinus fasciculatus	Molle negro	20
Schoenoplectus californicus	Junco de laguna	14
Solidago chilensis	Vara de oro	14
Thelesperma megapotamicum	Te pampa	18
Urtica Urens	Ortiga	15
Verbena litoralis	Verbena	11
Xanthium cavanillesii	Abrojo grande	22
Azitromicina ^b		20

^aDiámetro de la zona de inhibición de los extractos vegetales (incluye el tamaño de los pocillos). ^bDiámetro de la zona de inhibición de la Azitromicina (incluye el tamaño del disco).

En la Tabla I se detallan los extractos vegetales metanólicos que presentaron halos de inhibición frente al crecimiento bacteriano. El criterio utilizado para determinar la actividad antimicrobiana fue la presencia o ausencia de halo de inhibición producido por los extractos frente al microorganismo, sin considerar el tamaño de los mismos como indicador de grado de sensibilidad. En el ensayo se utilizó Azitromicina como droga de referencia positiva.

El método sistematizado de búsqueda desarrollado, estudio primario al azar, permitió determinar la actividad antimicrobiana in vitro contra *Staphylococcus aureus* en el 41,25% de las especies evaluadas. Este resultado sugiere que el método es válido y que las plantas de la provincia de La Pampa, que se desarrollan en un hábitat ecológico particular, pueden ser un recurso antimicrobiano de interés para ser investigado en profundidad.

Discusión y Conclusiones

De un total de 80 especies vegetales estudiadas, treinta y tres de ellas presentaron halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*. Cabe destacar que las especies vegetales que no exhibieron actividad antimicrobiana podrían presentarla si se utilizara un método o solvente de extracción diferente. En un trabajo realizado por Recio and Ríos (1989) sobre especies vegetales de uso antiséptico, demostraron que *Capsella bursa pastoris* y *Tribulus terrestris* presentan actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* utilizando como solvente de extracción cloroformo, mientras que los extractos metanólicos presentaron resultados negativos, en concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo.

Bibliografía

- Ahmad, I., Beg, A. Z. 2001.** Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal Ethnopharmacology*, 74: 113-123.
- Ahmad, I., Mehmood, Z., Mohammad, F. 1998.** Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *Journal Ethnopharmacology*, 62: 183-196.
- Ali-Shtayeh, M. S., Yaghmour, R. M., Faidi, Y. R., Salem, K.; Al Nuri, M. A. 1998.** Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestin area. *Journal Ethnopharmacology*, 60: 265-71.
- Anesini, C., Perez, C. 1993.** Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal Ethnopharmacology*, 39: 119-128.
- Bauer, A. W., Hirby, W. M. M., Sherris, J. C., Truck, M. 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal Clinical Pathology*, 45: 493-496.
- Calvinho, L. F., Toselli, F. G., Weimann, W. R., Canavesio, V. R., Nede, V. E., Iguzquiza, I. A. 2002.** Susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de estafilococos coagulasa positivos aisladas de mastitis bovina en la cuenca lechera central de la Argentina. *Anuario. Producción Animal. Sanidad. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)*.
- Cowan, M. M. 1999.** Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564-582.
- Del Vitto, L. A., Petenatti, E. M., Petenatti, M. E. 1997.** Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina). Primera Parte: Plantas Nativas. *Multequina*, 6: 49-66.
- Denamiel, G., Mas, J., Puigdevall, T., Gentilini, E. 2004.** Resistencia fenotípica a eritromicina en *Staphylococcus* spp aislados en infecciones de perros. *InVet*, 1: 29-33.
- Feresin, G. E., Tapia, A., López, S. N., Zacchino, S. A. 2001.** Antimicrobial activity of plants used in tradicional medicine of San Juan province, Argentina. *Journal Ethnopharmacology*, 78: 103-107.
- Kuklinsky, C. 2000.** Farmacognosia. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Omega. Barcelona, España.
- Murillo Alvarez, J. I., Encarnación, D. R., Franzblau, S. G. 2001.** Antimicrobial and cytotoxic activity of some medicinal plants from Baja California Sur (Mexico). *Pharmaceutical Biology*, 39: 445-449.
- Recio, M. C., Rios. J. L. 1989.** Antimicrobial activity of selected plants employed in the spanish mediterranean area. Part II. *Phytotherapy Research*, 3: 377-380.
- Srinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T., Lakshmana Perumalsamy, P. 2001.** Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal Ethnopharmacology*, 74: 217-220.
- Watson, A. D. J., Rosin, E. 2002.** Empleo de fármacos antimicrobianos en caninos y felinos. En *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria*. J. F. Prescott, J. D. Baggott, R. D. Walker. Tercera edición. Intermédica. Buenos Aires, Argentina. p 466-492.

