

## 20. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

### Actividad biológica de especies de *Acacia* frente a cepas de *Listeria* y *Staphylococcus*

Mohamed, Ana Mariel; marielmohamed@gmail.com; Cifuentes, Diego;  
diegocifuentes@gmail.com; Mattana, Claudia; cmmattan@gmail.com

Universidad Nacional de San Luis

#### Resumen

Las plantas son una valiosa fuente de productos bioactivos con potencial uso como antimicrobianos naturales. El propósito de este estudio fue evaluar la actividad inhibitoria de tres especies de *Acacia* frente a bacterias Gram positivas. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de *A. aroma*, *A. caven* y *A. furcatispina* mediante el método de microdilución en placa (CLSI) en caldo tripticasa suplementado con 0,01% de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio como indicador visual de crecimiento de *L. monocytogenes* y *S. aureus*. Se ensayaron combinaciones de extractos 1:1 para potenciar la actividad antibacteriana de los extractos que mostraron baja actividad. La CIM de la mezcla se comparó con las CIM de cada extracto por separado para obtener el índice de concentración inhibitoria fraccional (CIF). Las especies de *Acacia* ensayadas mostraron efecto inhibitorio en concentraciones que variaron entre 0,312 y 20 mg/ml. El extracto acuoso de *A. aroma* mostró la mayor actividad frente a cepas de *Listeria* y *Staphylococcus* (0,625 y 0,312 mg/ml respectivamente). *A. caven* y *A. furcatispina* presentaron menor actividad antibacteriana (valores entre 2,5 y 20 mg/ml). El resultado de la mezcla de ambas *Acacia* disminuyó a la mitad la concentración inhibitoria por un efecto aditivo (CIF= 0,75). Se determinaron valores bactericidas (CBM) 2 a 5 veces mayores a la CIM. Otros estudios determinaron ausencia de actividad citotóxica y/o genotóxica para estas especies vegetales por lo que podemos concluir que el potencial de las propiedades biológicas e inocuidad de estas plantas naturales de nuestra región, muestran resultados alentadores para actividad anti-*Listeria* y anti-*Staphylococcus*.

**Palabras clave:** *Acacia aroma*, *Acacia caven*, *Acacia furcatispina*, Actividad anti-*Listeria*, Actividad anti-*Staphylococcus*

## Introducción

La resistencia de las bacterias a los antibióticos es un problema de salud pública mundial que está en aumento (Mahmoud et al., 2016). Entre los factores que contribuyen al desarrollo de la resistencia se incluyen el diagnóstico erróneo, prescripciones innecesarias y el uso indebido de antibióticos por parte de los pacientes (Baos et al., 2006). En este sentido, la búsqueda de agentes antimicrobianos alternativos con nuevas propiedades farmacéuticas a partir de fuentes naturales es el creciente interés de los investigadores. Además, la tendencia promueve globalmente el uso declinante de aditivos sintéticos o productos con un impacto ambiental significativo a través del desarrollo de nuevos compuestos con actividades biológicas seguras de fuentes naturales que ofrecen alternativas efectivas y prometedoras, inocuas para los humanos y el medioambiente. Plantas y compuestos de derivados químicos podrían ser utilizados como agentes antibacterianos prometedores. Muchos fitoquímicos tienen actividad antioxidante y antibacteriana beneficiosa para la salud humana (Tan et al., 2015). Este problema mundial del desarrollo de resistencia microbiana a los antibióticos disponibles, ha llevado a los autores a investigar el actividad antimicrobiana de plantas medicinales (Scrivasan et al., 2001; Kumarasamy et al., 2002; Ali et al., 2001; Masika y Afolayan, 2002; Hamill et al., 2003).

Las infecciones bacterianas producidas por *Staphylococcus aureus* resultan difíciles de tratar. Éste es un gran patógeno humano que está involucrado en una gran variedad de infecciones, pudiendo causar infecciones graves como bacteriemia, neumonía, endocarditis aguda, meningitis, osteomielitis, síndrome de toxicidad y malestares invasivos (Honeyman et al., 2002; Saliba et al., 2003; Herwalt, 2003; Valencia et al., 2004) . La aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (SARM), primeramente en cepas hospitalarias y de modo más reciente en cepas de la comunidad (SARM-AC) dejó a la vancomicina como el antibiótico de último recurso contra patógenos grampositivos. Sin embargo, ya se ha informado la emergencia de cepas con sensibilidad disminuida a la vancomicina (VISA y h-VISA) (Howden et al., 2010; Holmes et al., 2012) y el hallazgo reciente de los primeros casos de *S. aureus* resistente a vancomicina (SARV) dificultan la terapia (Rossi et al., 2014; Chang et al., 2003). A este panorama de resistencia a los antimicrobianos por transferencia genética o mutaciones se le asocia la producción de biopelículas o biofilms, lo que significa una barrera para un correcto control de la proliferación de microorganismos. Más del 60% de las infecciones microbianas son causadas por especies productoras de biofilm (Lasa et al., 2005; Donlan et al., 2001), entre ellas, además de *Staphylococcus aureus*, se encuentra *Listeria monocytogenes*, otro

patógeno Gram positivo que puede causar listeriosis y otras infecciones severas como meningitis, meningoencefalitis y bacteriemias graves.

La flora argentina presenta una gran diversidad de especies que se utilizan con fines comerciales, entre ellas las más requeridas son las plantas aromáticas y medicinales (Ordoñez et al., 2006; Barboza et al., 2009). Especies del género *Acacia* son plantas utilizadas en medicina folclórica en el tratamiento de trastornos gastrointestinales, como antisépticos o para la cicatrización de heridas (Del Vitto et al., 1997). La corteza, flores, hojas, vainas, semillas y raíces de *Acacia* se usan tradicionalmente para el tratamiento de varias dolencias por muchas culturas (Bargali, 2009; Agunu et al., 2005; Lassak et al., 2011). Sus especies son una fuente rica de compuestos bioactivos que incluyen fenoles, alcaloides, saponinas, terpenoides, esteroides, polisacáridos, aminoácidos no proteicos, ácidos grasos, y ácidos orgánicos diversos. (Seigler, 2003; Wink et al., 2013). El género *Acacia* pertenece a la familia Fabaceae y comprende aproximadamente 1450 especies (Luckow, 2005) de los cuales veintiuno son nativos de Argentina (Cialdella, 1997). Tres especies nativas de la provincia de San Luis: *A. aroma*, *A. caven* y *A. furcatispina* son usadas en la medicina folclórica como agentes astringentes y antisépticos. Sin embargo, son pocos los estudios relacionados a su actividad antibacteriana.

## Objetivo

El propósito de este estudio fue evaluar la actividad inhibitoria de tres especies de *Acacia*: *A. aroma*, *A. caven* y *A. furcatispina* frente a bacterias Gram positivas: *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, y determinar el efecto de sus combinaciones.

## Materiales y Métodos

### Material vegetal

El material vegetal fue recolectado en el norte de la provincia de San Luis, Argentina. Se trabajó con la parte aérea (hojas) de *A. aroma*, *A. caven* y *A. furcatispina*. Las muestras fueron depositadas en el herbario de la Universidad Nacional de San Luis (UNSL). Las mismas fueron secadas en horno de flujo de aire a no más de 50°C y triturada en molinos de cuchillas hasta granulometría fina.

### Preparación de extractos acuosos

Las decocciones se prepararon de acuerdo con la Farmacopea Argentina (1978). El material seco y en polvo se hirvió con agua durante 20 minutos, luego fue enfriado y filtrado.

### Microorganismos y medios de cultivo

En este estudio se utilizaron las cepas de referencia: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* CLIP 74904. Las mismas fueron mantenidas en caldo cerebro-corazón, que contiene un 20% de glicerol a -80°C hasta su uso. Los inóculos se prepararon ajustando la turbidez de la suspensión para que coincida con el 0,5 de Mc Farland.

### Ensayo de microdilución en placa

La Concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos se determinó por el método de microdilución en placa según el método de la CLSI (2017). Se utilizó placa de 96 pocillos fondo plano, colocando 95 µl de caldo tripticasa soya (Britania, Argentina) pH 7.2 suplementado con 0,01 % de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolium como indicador visual de crecimiento, 5 µl del inóculo bacteriano ( $10^5$  ufc/ml) y 100 µl de las diluciones de los extractos, con un volumen final de 200 µL por pocillo. Se partió de una concentración de 20 mg/ml y se realizaron sucesivas diluciones seriadas de dos en dos, obteniendo así concentraciones de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 y 0,312 mg/ml. Se realizó la experiencia por duplicado. La placa fue incubada a 37°C durante 24 h. Se incluyeron controles de medio, de cepas y de extractos. Se realizó una observación visual del cambio de color, donde el color rojo indicó presencia de crecimiento.

### Concentración inhibitoria mínima (CIM) y Concentración bactericida mínima (CBM)

La CIM se definió como la menor concentración de extracto que inhibió el crecimiento bacteriano. Los pocillos que mostraron inhibición de crecimiento se sometieron a un subcultivo en placa para evaluar el crecimiento bacteriano. Así, luego de la determinación de la CIM se determinó la CBM por transferencia de una alícuota de 10 µl a placas conteniendo agar tripticasa soja. Las placas fueron incubadas en las mismas condiciones que en la determinación de la CIM. La presencia o ausencia de desarrollo bacteriano se determinó por inspección visual. La CBM se definió como la menor concentración que mostró ausencia de crecimiento bacteriano luego de 24 h de incubación a 37°C.

### Concentración inhibitoria fraccional (CIF)

En placas de 96 pocillos se colocaron 95 µl de caldo nutritivo, 5 µl del inóculo bacteriano y 100 µL de la mezcla 1:1 de cada extracto a ensayar. Se determinó el efecto de tres combinaciones de los extractos evaluados por separado. Controles de medio de cultivo, cepas y extractos se incluyeron en el experimento. Las placas se incubaron a 37° C durante 24 h. Los ensayos se realizaron por duplicado. Valores de CIM se determinaron para cada una de estas combinaciones. El valor de CIM de cada mezcla se comparó con el valor CIM

de cada extracto por separado para obtener la concentración inhibitoria fraccional (CIF). El valor CIF se calculó como  $CIF_1 + CIF_2$ :

$$CIF_1 = \frac{CIM_1 \text{ combinación}}{CIM_1 \text{ solo}} \quad CIF_2 = \frac{CIM_2 \text{ combinación}}{CIM_2 \text{ solo}}$$

donde "1" y "2" representan los diferentes extractos de las combinaciones probadas.

Los resultados se interpretaron como: sinergismo ( $CIF \leq 0,5$ ), adición ( $0,5 \leq CIF \leq 1$ ), indiferencia ( $1 < CIF \leq 4$ ) o antagonismo ( $CIF > 4$ ).

## Resultados y Discusión

La actividad antibacteriana de los extractos acuosos de las especies de *Acacia* fue ensayada en condiciones in vitro por el método de microdilución en placa contra cepas de *Listeria* y *Staphylococcus*. Los resultados de CIM, CBM y CIF se observan en la **Tabla 1**. Las tres especies de *Acacia*: *A. aroma*, *A. caven* y *A. furcatispina* mostraron efecto inhibitorio en concentraciones que variaron entre 0,312 y 20 mg/ml. El extracto acuoso de *A. aroma* mostró la mayor actividad frente a cepas de *Listeria* y *Staphylococcus* (0,625 y 0,312 mg/ml respectivamente). *A. caven* y *A. furcatispina* presentaron menor actividad antibacteriana (valores entre 2,5 y 20 mg/ml). El resultado de la mezcla de ambas *Acacia* disminuyó a la mitad la concentración inhibitoria por un efecto aditivo ( $CIF = 0,75$ ). Se determinaron valores bactericidas (CBM) 2 a 5 veces mayores a la CIM.

**Tabla 1.** Valores mínimos de concentración inhibitoria (CIM) y bactericida (CBM) de *A. aroma*, *A. caven* y *A. furcatispina* frente a bacterias grampositivas. Concentración inhibitoria fraccional (CIF) para *A. caven* y *A. furcatispina* combinadas.

	<i>A. aroma</i>	<i>A. caven</i> (A)	<i>A. furcatispina</i> (B)	A+B
	CIM/CBM (mg/ml)	CIM/CBM (mg/ml)	CIM/CBM (mg/ml)	CIF
<i>L. monocytogenes</i>	0,312/5	10/20	20/20	0,75 (Efecto aditivo)
<i>S. aureus</i>	0,625/1,250	2,5/2,5	5/10	0,75 (Efecto aditivo)

La actividad biológica de las plantas medicinales reflejan el efecto de sus componentes fitoquímicos. Estudios fitoquímicos previos de estas plantas revelan la presencia de carbohidratos, taninas, flavonoides, saponinas y alcaloides (Martinez et al., 2014). En este



sentido, serían algunos de estos compuestos los responsables de la actividad anti-*Listeria* y anti-*Staphylococcus* demostrada. En nuestro laboratorio, estudios previos reportaron actividad antimicrobiana de flavonoides y sapogeninas presentes en plantas regionales contra *S. aureus* (Praveen et al., 2012 ; Alcaraz et al., 2012). Además, otros estudios determinaron ausencia de actividad citotóxica y/o genotóxica para estas especies vegetales, mostrando el potencial de las propiedades biológicas e inocuidad de estas plantas naturales de nuestra región (Mohamed et al., 2016).

Por otro lado, el efecto aditivo encontrado entre las especies *A. caven* y *A. furcatispina* es de destacar, ya que su efecto inhibitorio resulta más efectivo que el observado por separado y podrían utilizarse combinaciones de estos extractos para diseñar nuevos antimicrobianos.

Según la bibliografía, no hay abundante información científica sobre la actividad antibacteriana de las plantas utilizadas en el presente estudio, por lo tanto, nuestros resultados apoyan el uso popular de estas plantas para el tratamiento de enfermedades infecciosas.

## Conclusiones

A partir del estudio presentado, se puede concluir que las plantas medicinales seleccionadas pertenecientes al género *Acacia*: *A. aroma*, *A. caven* y *A. furcatispina* tienen potencial para inhibir a los antimicrobianos, en particular se demostró su actividad anti-*Listeria* y anti-*Staphylococcus*. Por lo tanto, este estudio permitiría el desarrollo de compuestos biológicamente activos que puedan emplearse en la formulación de nuevos antibióticos antimicrobianos como alternativa frente al problema de resistencia antimicrobiana que se observa a nivel mundial.

## Bibliografía

1. Mahmoud, M. F., S. A. Alrumman and L. Heshamael. 2016. Biological activities of some *Acacia* spp. (Fabaceae) against new clinical isolates identified by ribosomal RNA gene-based phylogenetic analysis. *Pak. J. Pharm. Sci.* 29(1): 221-229.
2. Baos, V., A. Barbero, E. Diogène, A. Eguilleor, T. Eyaralar, Ibañez J, A. Mediavilla, I. Mora, V. Palop and R. Pastor Sánchez. 2006. Documento de consenso sobre la utilización de antibióticos en atención primaria. *Pediatr. Atención Prima.* 38(3): 174-177.
3. Tan, J. B. and Y. Y Lim. 2015. Critical analysis of current methods for assessing the in vitro antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *F. Chem.* 172: 814-822.
4. Scrinivasan, D., Nathan, S., Suresh, T., Perumalsamy, O., 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 217–220.

5. Kumarasamy, Y., Cox, P., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S., 2002. Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 83, 73–77.
6. Ali, N.A.A., Julich, W.D., Kusnick, C., Lindequist, U., 2001. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 113–123.
7. Masika, P.J., Afolayan, A.J., 2002. Antimicrobial activity of some plants used for the treatment of livestock disease in the Eastern Cape, South Africa. *Journal of Ethnopharmacology* 83, 129–134.
8. Hamill, F.A., Apio, S., Mubiru, N.K., Bukonya-Ziraba, R., Mosango, M., Maganyi, O.W., Soejarto, D.D., 2003. Traditional herbal drugs of Southern Uganda, II: literature analysis and antimicrobial assays. *Journal of Ethnopharmacology* 84, 57–78.
9. Honeyman, A.L., Friedman, H., and Bendinelli, M. 2002. *Staphylococcus aureus* Infection and Disease. Klurver Academic Publishers: New York. 342.
10. Saliba WR, Goldstein LH, Raz R, Mader R, Colodner R, and Elias MS. 2003. Subacute necrotizing fasciitis caused by gas-producing *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*; 22:612-14.
11. Herwaldt, LA. 2003. *Staphylococcus aureus* nasal carriage and surgical-site infections. *Surgery*, 134 (suppl.5); 2-9.
12. Valencia IC, Kirsner RS. & Kerdel FA. 2004. Microbiologic evaluation of skin wounds: alarming trend toward antibiotic resistance in an inpatient dermatology service during a 10-year period. *JAm Acad Dermatol.* 50,845–849.
13. Howden B, Davies J, Johnson P, Stinear T, Grayson M. 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.*; 23:99-139.
14. Holmes N, Johnson P, Howden B. 2012. Relationship between vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin intermediate *S. aureus*, high vancomycin MIC, and outcome in serious *S. aureus* infections. *J Clin Microbiol.*; 50:2548-52.
15. Rossi F, Diaz L, Wollam A, Panesso D, Zhou Y, Rincon S, Narechania A, Xing G, Di Gioia TS, Doi A, Tran TT, Reyes J, Munita JM, Carvajal LP, Hernandez-Roldan A, Brandão D, van der Heijden IM, Murray BE, Planet PJ, Weinstock GM, Arias CA. 2014. Transferable vancomycin resistance in a community-associated MRSA lineage. *N Engl J Med*, 370 (16):1524-31.
16. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the vanA resistance gene. *N Engl J Med.*; 348: 1342–1347.

17. Lasa I, J.L del Pozo, J.R. Penades, J.Leiva. 2005. Biofilms Bacterian e Infection. Revista Anales del Sistema Sanitario de Navarra. 28:153-298.
18. R M Donlan, J. M Miller, R Murga. 2001. Biofilm formation by gram-negative bacteria on central venous catheter connectors: effect of conditioning films in a laboratory model. Journal of Clinical Microbiology; 39: 2294-7.
19. Ordoñez, A. A., J. G. Gomez, M. A. Vattuone and M. I. Isla. 2006. Antioxidant activities of *Sechium edule* swart extracts. Food Chem. 97: 452-458.
20. Barboza, G. E., J. J. Cantero, C. Nuñez, A. Paccioaroni and L. Ariza Espinar. 2009. Plantas medicinales: Revisión y "screening" fitoquímico y etnofarmacológico de la flora nativa de Argentina. Kurtziana. 34(1-2): 7-365.
21. 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.
22. K. Bargali, S.S. Bargali, Nature Sci. 7 (2009) 11–19.
23. A. Agunu, S. Yusuf, G.O. Andrew, A.U. Zezi, E.M. Abdurahman, J. Ethnopharmacol. 101 (2005) 27–30.
24. E.V. Lassak, T. McCarthy, Australian Medicinal Plants, second ed., Reed, Kew, VIC, 2011.
25. Seigler, D.S., 2003. Phytochemistry of *Acacia*- sensu lato. Biochemical Systematics and Ecology, 845–873.
26. M. Wink, S. Afr. J. Bot. 89 (2013) 164–175.
27. Luckow, M., 2005. Tribe Mimoseae. In: G. Lewis et al. (Eds.), Legumes of the World, pp. 163–183.
28. Cialdella, A.M., 1997. *Acacia*. In: Hunziker, A.T. (Ed.), Flora Fanerogámica, vol. 5, Argentina, pp. 3-21.
29. Farmacopea Nacional Argentina. 1978. Codex Medicamentarius Argentine. Sexta Edición. Bs. As. Editorial Codex, S.A.
30. CLSI. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
31. Martinez M. A.; Mattana, C. M.; Satorres, S. E.; Sosa, A.; Fusco, M. R.; Laciari, A. L.; Alcaraz, L. E. 2014. Screening phytochemical and antibacterial activity of three San Luis native species belonging at the *Fabaceae* family. Vol.3 1-6
32. Praveen Dahiya and Sharmishtha Purkayastha. 2012. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants Against Multi-drug Resistant Bacteria from Clinical Isolates. Indian J PharmSci. 74(5): 443–450.
33. Alcaráz LE, Mattana CM, Satorres SE, Petenatti E, Petenatti M, Del Vitto Land Laciari A.



2012. Antibacterial activity of extracts obtained from *Senna corymbosa* and *Tipuana tipu*. Pharmacologyonline. 3:158-161.

34. Mohamed AM, Cangiano MA, Alcaráz LE, Satorres SE, Laciari AL, Mattana CM. 2016. Comet assay application in evaluation the safe use of medicinal plants. Emirates Journal of Food and Agriculture. 28(x): 1-4

### Financiamiento

**Proyecto UNSL:** PROICO 2-2014 (22/Q413) titulado “Bacterias de relevancia en la salud pública y la industria alimentaria. *L. monocytogenes* y *S. aureus*”, Directora: Dra. Lucía E. Alcaráz. Directora de Línea: Dra. Claudia Mattana.