

Inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* mediante extractos de cocolmeca (*Smilax* spp.)

Valle Sánchez, S. L.¹, Rodríguez Ramírez, R.^{1*}, Delgado Domínguez, J.¹, Ávila Villa, L. A.², Villa Lerma, A. G.¹, Wall Medrano, A.³, y González Córdova, A.F.⁴

¹Laboratorio de Biotecnología y Trazabilidad Molecular de los Alimentos. Instituto Tecnológico de Sonora. Calle 5 de Febrero, 818 Sur, Colonia Centro, 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México, Tel: +52(644)4100900 Ext. 2134. Autor de correspondencia: roberto.rodriguez@itson.edu.mx. ²Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Sonora, Blvd. Bordo Nuevo S/N, Ejido Providencia, 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México. ³Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Instituto de Ciencias Biomédicas. Anillo Envolvente del PRONAF y Estocolmo s/n, 32310, Ciudad Juárez, Chihuahua, Mexico. ⁴Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Carretera Gustavo Enrique Astiazarán Rosas, No. 46. Colonia La Victoria, 83304, Hermosillo, Sonora, México.

Palabras Clave: Antimicrobiano, Inhibición, Polifenoles

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son originadas por el consumo de alimentos contaminados por microorganismos patógenos o sus toxinas, y suelen producir síntomas como vómitos, diarreas, dolor de cabeza, fiebre, y en casos extremos el fallecimiento del individuo [1]. Generalmente la contaminación puede ser debida a la inadecuada higiene en la manipulación de alimentos y con ello también generar una intoxicación alimentaria. Particularmente *Staphylococcus aureus*, es un patógeno que ha tenido interés por ocasionar intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) debido a la producción de toxinas tales como citotoxinas, toxinas exfoliativas y enterotoxinas A-H, de las cuales la enterotoxina A, es la que comúnmente está implicada en brotes de IAE [2]. Por otra parte, el género *Smilax* lo conforma un grupo de plantas trepadoras y sus raíces han sido empleadas en herbolaria tradicional para tratar obesidad, disentería bacteriana, colitis, cáncer e infecciones en la piel. Asimismo, se ha destacado su efecto antimicrobiano debido a su contenido de sus constituyentes como polifenoles, flavonoides, saponinas y ácidos fenólicos [3, 4]. Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue demostrar la inhibición del crecimiento microbiano de *S. aureus* con extractos de *Smilax* spp. con el fin de prevenir las ETA y de este modo implementar los extractos como agentes antimicrobianos.

Metodología

Obtención de extractos de cocolmeca. Las raíces de cocolmeca (*Smilax* spp.) se obtuvieron en un mercado local de Ciudad Obregón, Sonora, México. Para obtener compuestos de *Smilax* spp. se realizaron extracciones con agua y etanol al 70 % con modificaciones [3, 5]. La extracción consistió en pesar 2 g de las raíces, las cuales se homogenizaron con 100 mL de agua milli-Q y se hirvieron a 100 °C durante 30 min, después la mezcla se filtró al vacío con papel Whatman #4 y se guardó en refrigeración a 4 °C protegida de la luz y de este modo se obtuvo un extracto acuoso (EA). Del mismo modo se pesaron 2 g y se homogenizaron con 100 mL de etanol al 70 % y la mezcla se calentó a 60 °C durante 30 min, después el extracto se filtró al vacío con papel Whatman #4 y posteriormente se calentó a 90 °C durante 10 min con el fin de evaporar el etanol de la mezcla, el residuo orgánico se resuspendió en 10 mL de agua milli-Q, se centrifugó a 4000 rpm por 20 min, se recuperó el sobrenadante y se guardó en refrigeración a 4 °C protegido de la luz y de este modo se obtuvo un extracto etanólico evaporado y soluble en agua (EEA). Por último, se realizaron diluciones 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 y 1:10 v/v de ambos extractos para evaluar la capacidad de inhibir el crecimiento de *S. aureus*.

Activación del agente patógeno. Se realizó la activación de una cepa liofilizada de *Staphylococcus aureus* ATCC 9144. Dicha cepa se sembró masivamente en agar Vogel-Johnson y se incubó a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se tomaron 3 colonias y se suspendieron en 1 mL de caldo TSB (Triptic Soy Broth) para incubarse a 37 °C durante 12 h. Posteriormente se sembró del caldo por agotamiento de estrías en placas de agar Vogel-Johnson y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Pasando dicho tiempo se tomaron 3 colonias para suspenderse en 1 mL de caldo TSB y dicho proceso se repitió una vez más.

Ajuste de inóculo bacteriano. Después de la activación de la cepa de *S. aureus* se realizó una cinética de crecimiento con el fin de establecer el tiempo en el cual el microorganismo alcanza la concentración celular de $1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL según lo establecido por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2012) para pruebas de susceptibilidad contra patógenos. Además, se corroboró dicha concentración con un recuento en placas siguiendo lo indicado por las normas NOM-110-SSA1-1994 y NOM-092-SSA1-1994. Para ello, la cepa activada se sembró en agar Vogel-Johnson y se incubó a 37 °C durante 24 h, después del tiempo establecido se tomaron 6 colonias aisladas y se suspendieron en 20 mL de caldo TSB, el cual se incubó a 37 °C durante 4 h 30 min y en cada 30 min de dicho intervalo de tiempo se tomaron 100 µL del inóculo y se realizaron diluciones seriadas 1:10 (10^{-1} hasta 10^{-7}) con caldo TSB estéril. Después se transfirieron 100 µL de cada dilución a placas con agar Vogel-Johnson y se sembró por expansión por duplicado utilizando un asa de vidrio. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y cumplido el tiempo se contaron aquellas placas que tuvieron entre 25 y 250 colonias, se consideró el factor de dilución y la cantidad de inóculo agregado para obtener la concentración celular de referencia para el ensayo.

Microdilución en placa. La capacidad de inhibir el crecimiento de *S. aureus* de los extractos de *Smilax* spp. se realizó de acuerdo con Chalas-Vega, 2020 [6]. Se evaluaron los extractos EA y EEA con sus respectivas diluciones, en una microplaca de 96 pocillos Corning® F-bottom. Se transfirieron a cada pocillo 100 µL de inóculo en medio TSB con una concentración celular $\sim 2 \times 10^8$ UFC/mL y 50 µL de cada extracto a evaluar. Se utilizaron diversos controles entre ellos: un control de crecimiento bacteriano (100 µL de inóculo + 50 µL de agua Milli-Q estéril), un control de inhibición positivo (100 µL de inóculo + 50 µL de oxitetraciclina a 10 µg/mL) y un control de esterilidad (100 µL de medio TSB estéril + 50 µL de agua Milli-Q estéril). La microplaca por evaluar se transfirió a un espectrofotómetro UV-Visible (Multiskan GO, Thermo Scientific, EUA) donde se midió la turbidez a 600 nm cada hora durante 16 h y se incubó a 37 °C aplicando agitación de fondo cada 0.05 s. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(Abs_0 - Abs_m)}{Abs_0} \times 100$$

Donde Abs_0 es la absorbancia de cada punto del intervalo de tiempo (0 – 16 h) de la curva de crecimiento bacteriano y Abs_m es la absorbancia de cada muestra a analizar en cada tiempo. Además, a cada muestra de extracto que se evaluó, se le restó su absorbancia intrínseca a 600 nm para que no interfiriera en el ensayo y se consideró Abs_m en cada tiempo sin el valor de absorbancia de la muestra a la misma longitud de onda. El ensayo de microdilución en placa se realizó por triplicado.

Resultados y discusión

Las curvas de crecimiento de *S. aureus* con los extractos acuosos y sus respectivos controles se visualizan en la Figura 1. En dicha figura se observa que *S. aureus* presenta un incremento exponencial y constante, mientras que el control de esterilidad con agua Milli-Q y el control con oxitetraciclina no presentan incremento de la absorbancia. También, los extractos acuosos ralentizan el crecimiento de *S. aureus* al observar que la absorbancia disminuye alrededor del 50 % con respecto a la curva de *S. aureus*. Del mismo modo, el EA y su dilución 1:2 son los que mayor efecto inhibitorio presentaron.

Por otra parte, las curvas de crecimiento de *S. aureus* con los extractos etanólicos evaporados y solubles en agua, así como sus respectivos controles se visualizan en la Figura 2. Se observa el mismo comportamiento en la curva de *S. aureus* y los controles con respecto a la Figura 1. Y caso contrario al EA, el EEA y su dilución 1:2 y 1:4, presentan una curva de crecimiento semilineal sin tendencia a la inhibición del crecimiento bacteriano en el mismo tiempo establecido. Sin embargo, los EEA con sus diluciones 1:6, 1:8 y 1:10 son las que presentaron descenso en la absorbancia alrededor del 50 % con respecto a la curva de *S. aureus*.

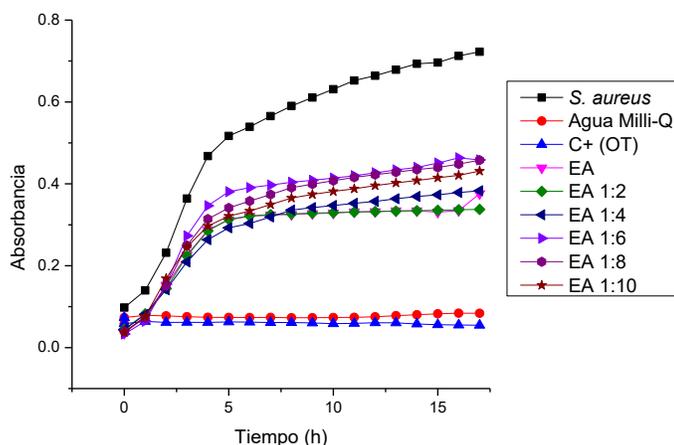


Figura 1. Curvas de crecimiento de *S. aureus* en presencia de extractos acuosos (EA) y sus diluciones. OT: oxitetraciclina.

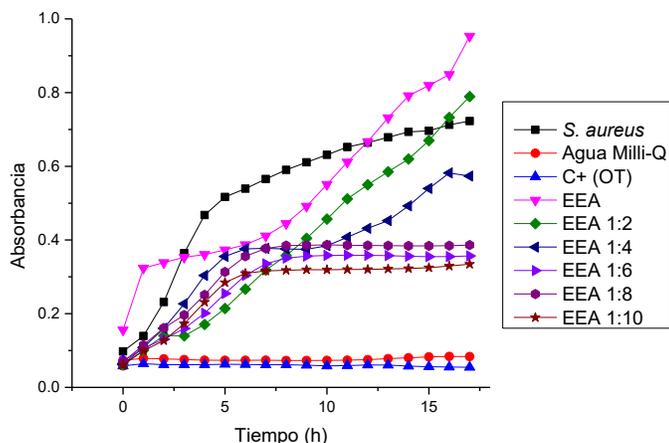


Figura 2. Curvas de crecimiento de *S. aureus* en presencia de extractos etanólicos evaporados y solubles en agua (EEA) y sus diluciones. OT: oxitetraciclina.

Los porcentajes de inhibición del crecimiento de *S. aureus* para los extractos acuosos visualiza en la Figura 3. El EA presentó mayor porcentaje de inhibición con un máximo de 51.22 % y con tendencia a incremento, mientras que el EA y su dilución 1:2 presentaron el mismo comportamiento e inhibición, y se observa de manera general que los extractos más diluidos presentaron menor inhibición que el extracto sin diluir. Se ha reportado que los principales compuestos encontrados en extractos acuosos de *Smilax cordifolia* son algunos polifenoles como ácido rosmarínico y hesperidina, así como β -sitosterol [3], los cuales son los que pueden estar implicados en inhibir el crecimiento bacteriano de este ensayo.

Por otro lado, los porcentajes de inhibición del crecimiento de *S. aureus* para los extractos etanólicos evaporados y solubles en agua se visualizan en la Figura 4. El EEA y su dilución 1:2 demostraron incremento en el crecimiento bacteriano en las primeras 2 h, pero a su vez un máximo de inhibición del 48.16 y 70.55 %, respectivamente. Sin embargo, conforme se incrementó el tiempo, el porcentaje de inhibición disminuía hasta propiciar el crecimiento bacteriano. Mientras que las diluciones 1:6, 1:8 y 1:10 presentaron inhibición constante siendo ésta última la que mayor porcentaje inhibió con un 57.9 % a las 3 h y una inhibición continua alrededor del 56 % a las últimas horas del estudio. Lo anterior se puede basar en un estudio donde

encontraron ácido 5-O-cafeoilshikímico, astilbina, neoastilbina e isoastilbina como los principales compuestos en extractos etanólicos de *Smilax glabra* [4] que también pueden estar involucrados en este ensayo. Además, en otro estudio donde se emplearon extractos etanólicos solubles en acetato de etilo de *Smilax china* L., lograron inhibir la fase exponencial de *S. aureus* dando un efecto bacteriostático [7] como lo reportado en este ensayo. En este sentido, es ampliamente conocido que los polifenoles de origen vegetal pueden actuar como agentes antimicrobianos provocando muerte celular al comprometer la membrana y la pared celular. Un componente fenólico individual podría ser suficientemente eficaz para exhibir actividad antibacteriana, pero puede alterar su propiedad y comportamiento en el extracto debido a la presencia de otros compuestos [7], lo que podría explicar el crecimiento de *S. aureus* con el EEA y a su vez inhibición del crecimiento con sus diluciones 1:6, 1:8 y 1:10.

Los polifenoles han recibido atención debido a su amplio espectro y mayor actividad antimicrobiana debido al hecho de que la mayoría de ellos son capaces de suprimir una serie de factores de virulencia como la inhibición de la formación de biopelículas, toxinas bacterianas, reducción de la adhesión de ligandos del huésped [8]. y que en estudios previos se han reportado estar presente en *Smilax* spp. Con base en lo anterior los compuestos presentes en los extractos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano de *S. aureus* podrían ser los polifenoles. Por ello la importancia del empleo de extractos vegetales que contengan polifenoles debido a que se han propuesto sea para desarrollar nuevos conservadores alimenticios, o desarrollar terapias innovadoras para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas considerando el aumento de la resistencia microbiana frente a la terapia con antibióticos [8].

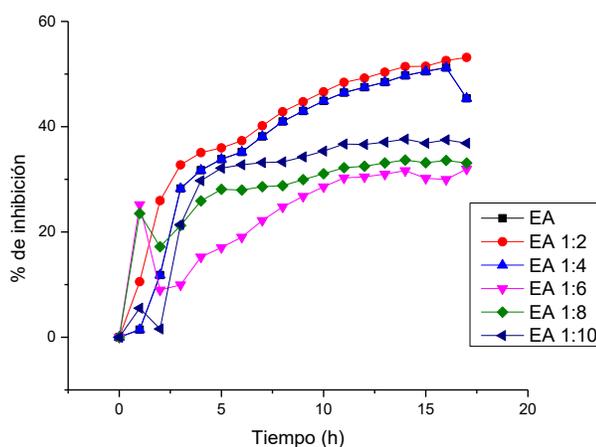


Figura 3. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *S. aureus* para los extractos acuosos (EA) y sus diluciones.

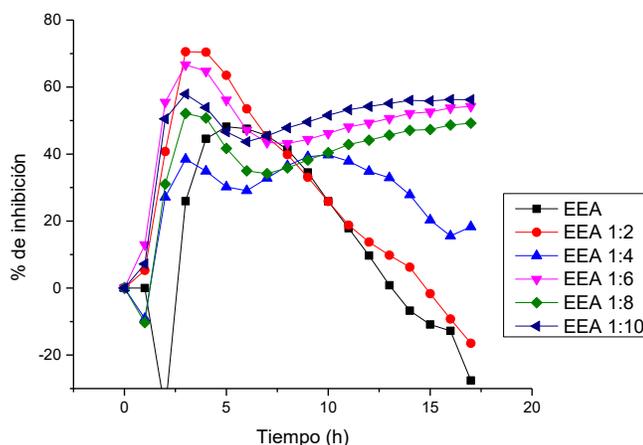


Figura 4. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *S. aureus* para los extractos etanólicos evaporados y solubles en agua (EEA) y sus diluciones.

Conclusiones

Los extractos acuosos de *Smilax* spp. lograron inhibir el crecimiento de *S. aureus* hasta un 51.22 % a las 16 h, mientras que los extractos etanólicos evaporados y solubles en agua mostraron inhibición de hasta un 70.55 % a las primeras 2 h, pero a su vez propiciaron el crecimiento de *S. aureus* hasta las 16 h. Por lo que los extractos acuosos podrían ser considerados como un antimicrobiano, sin embargo, hacen falta estudios complementarios que sustenten lo anterior, así como ensayos de inhibición con polifenoles individuales.

Referencias

- Alarcón-Lavín M. P., Oyarzo C., Escudero C., Cerda-Leal F. y Valenzuela F. J. (2017). Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico tipo A, en frotis nasofaríngeos en manipuladores de alimentos. *Rev med Chile*. **145**(12): 1559-1564.
- Zendejas-Manzo G. S., Avalos-Flores H. y Soto-Padilla M. Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed*. **25**: 129-143.
- Pérez-Ramírez, I. F., Enciso-Morena, J. A., Guevara-González, R. G., Gallegos-Corona, M. A., Loarca-Piña, G. y Reynoso-Camacho, R. (2016). Modulation of renal dysfunction by *Smilax cordifolia* and *Eryngium carlinae*, and their effect on kidney proteome in obese rats. *Journal of Functional Foods* **20**: 545-555.
- Xu S., Shang M. Y., Liu G. X., Xu F., Wang X., Shou C. C. y Cai S. Q. (2013). Chemical Constituents from the Rhizomes of *Smilax glabra* and Their Antimicrobial Activity. *Molecules*. **18**: 5265-5287.
- Lu C. L., Zhu W., Wang M., Xu X. J. y Lu C. J. (2014). Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Phenolic-Enriched Extracts of *Smilax glabra*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. **14**: 1-8.
- Chalas-Vega Z. G. Tesis de Maestría (2020). Capacidad antimicrobiana y antiinflamatoria de proteínas extraídas de tejido conectivo de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) glicadas vía reacción de Maillard. Instituto Tecnológico de Sonora. Ciudad Obregón, Sonora, México.
- Xu M., Xue H., Li X., Zhao Y., Lin L., Yang L. y Zheng G. (2019). Chemical composition, antibacterial properties, and mechanism of *Smilax china* L. polyphenols. *Appl Microbiol Biotechnol*. **103**: 9013-9022.
- Daglia M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. **23**: 174-181.