



Revista Argentina de Microbiología

ISSN: 0325-7541

ram@aam.org.ar

Asociación Argentina de Microbiología
Argentina

Córdova-Guerrero, Iván; Aragon-Martinez, Othoniel H.; Díaz-Rubio, Laura; Franco-Cabrera, Santiago; Serafín-Higuera, Nicolas A.; Pozos-Guillén, Amaury; Soto-Castro, Tely A.; Martinez-Morales, Flavio; Isiordia-Espinoza, Mario
Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica
Revista Argentina de Microbiología, vol. 48, núm. 3, julio-septiembre, 2016, pp. 217-221
Asociación Argentina de Microbiología
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213047799008>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto



INFORME BREVE

Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica



Iván Córdova-Guerrero^a, Othoniel H. Aragon-Martinez^b, Laura Díaz-Rubio^a, Santiago Franco-Cabrera^c, Nicolas A. Serafín-Higuera^c, Amaury Pozos-Guillén^d, Tely A. Soto-Castro^e, Flavio Martínez-Morales^b y Mario Isiordia-Espinoza^{e,*}

^a Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Tijuana, B.C., México

^b Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P., México

^c Laboratorio de Microbiología, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, B.C., México

^d Laboratorio de Ciencias Básicas, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, S.L.P., México

^e Departamento de Farmacología, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, B.C., México

Recibido el 9 de febrero de 2016; aceptado el 18 de mayo de 2016

Disponible en Internet el 29 de agosto de 2016

PALABRAS CLAVE

Salvia apiana;
Bacterias gram
positivas;
Bacterias gram
negativas;
Levaduras

Resumen Debido a la gran problemática mundial de la resistencia bacteriana a los antibióticos, es necesaria la búsqueda continua de nuevas moléculas con características antimicrobianas. Este estudio evaluó el efecto antibacteriano y antifúngico de un extracto hexánico proveniente de la raíz de *Salvia apiana*. Los extractos de salvia a las concentraciones de 27; 13,5; 6,8 y 3,4 mg/ml causaron inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Sin embargo, no presentaron efecto significativo sobre *Escherichia coli* y *Candida tropicalis* al compararse con los valores del vehículo en las valoraciones de difusión en pozo. Se demostró que *S. apiana* tiene un efecto antimicrobiano significativo sobre patógenos de gran importancia clínica, lo que abre el campo para continuar evaluando a esta lamiácea en vistas a su posible empleo en el futuro como un agente terapéutico.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: mario.isiordia@uabc.edu.mx, mario.isiordia162@yahoo.com (M. Isiordia-Espinoza).

KEYWORDS

Salvia apiana;
Gram-positive
bacteria;
Gram-negative
bacteria;
Yeast

Antibacterial and antifungal activity of *Salvia apiana* against clinically important microorganisms

Abstract Due to the great global concern regarding bacterial resistance to antibiotics, an ongoing search for new molecules having antibacterial activity is necessary. This study evaluated the antibacterial and anticandidal effects of a hexane extract from the root of *Salvia apiana*. *Salvia* extracts at concentrations of 27, 13.5, 6.8 and 3.4 mg/ml caused growth inhibition of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. However, no significant effect was observed on *Escherichia coli* and *Candida tropicalis* in comparison to vehicle. It was here demonstrated for the first time that *Salvia apiana* has an important antimicrobial effect on human pathogens of great clinical value, thus opening the field to continue the evaluation of this lamiaceous plant for its future use as a therapeutic agent.

© 2016 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

La resistencia bacteriana a los antibióticos es una amenaza importante para la salud pública mundial, situación que se agrava por la carencia del desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos¹⁵. En México, el uso indiscriminado de antibióticos es identificado como uno de los factores que contribuyen a la aparición de la resistencia a los antimicrobianos¹. Recientemente, esta situación llevó al establecimiento de la venta de antibióticos por farmacias única y exclusivamente mediante la exhibición de receta médica¹³. Sin embargo, esta medida por sí sola no evita la aparición de resistencia bacteriana, ya que depende de muchos otros factores de acuerdo con estudios realizados en México y con lo observado en España^{1,15}.

Debido a esta problemática regional, nacional y mundial, se ha puesto especial atención a compuestos biológicamente activos extraídos de diversas especies de plantas tradicionales empleadas en la medicina herbal como una posible alternativa para el manejo de problemas infecciosos¹².

México tiene una amplia variedad de plantas. Presenta alrededor de 25.000 especies registradas y aproximadamente unas 30.000 no descritas¹². *Salvia* es un género importante de plantas que comprende aproximadamente 900 especies de la familia *Lamiaceae*, de las cuales algunas especies se cultivan alrededor del mundo para su empleo en la medicina herbal o como aditivos en productos alimenticios⁹. Varias especies de *Salvia* han demostrado algún grado de efecto antibacteriano y antifúngico. Sin embargo, *Salvia apiana*, especie nativa de California, no ha sido valorada en este sentido^{6,14}.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el potencial efecto antibacteriano y antimicótico *in vitro* de *S. apiana* frente a algunos patógenos de importancia clínica.

Las raíces de *S. apiana* fueron recolectadas en 2012 en la localidad de San Antonio de las Minas (Ensenada, Baja California, México) por un taxónomo experimentado. El material colectado fue lavado de inmediato y secado a temperatura ambiente, para continuar posteriormente con el proceso de extracción.

El material seco fue triturado para obtener trozos de aproximadamente 5 cm de largo por 1 cm de ancho y 5 mm de espesor. Después, 301 g de este material fueron

sometidos a maceración etanólica (95%) durante 48 h. El solvente del macerado fue luego eliminado a presión reducida en un rotavapor (modelo R-210, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza), con lo que se obtuvo al final 16,4 g de extracto crudo y seco. Todo el extracto fue disuelto en 410 ml de una solución de metanol:agua (2:3), continuando con su partición en *n*-hexano. Finalmente, el extracto hexánico fue llevado a sequedad bajo presión reducida.

Se utilizaron cepas bacterianas gram positivas de colección (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) y una cepa de *Enterococcus faecalis* obtenida del laboratorio de microbiología de un hospital local. Se utilizó también un microorganismo gram-negativo: *Escherichia coli* ATCC 25922. Por otra parte, se obtuvieron 2 levaduras (*Candida albicans* y *Candida tropicalis*) del laboratorio de microbiología de la Facultad de Odontología Mexicali de la Universidad Autónoma de Baja California.

Se empleó agar tripteína de soja preparado siguiendo las indicaciones del fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). Bajo condiciones de esterilidad, el medio fundido y a una temperatura entre los 45 °C y los 50 °C fue colocado en placas de Petri y después estas placas fueron llevadas a temperatura ambiente, para su posterior empleo en la evaluación microbiológica. Se empleó CHROMagar CANDIDA BD BBL MEX 1-LOTE 4315788 como medio de cultivo para *C. albicans* y *C. tropicalis*; dicho medio ya venía preparado en placas de Petri por el fabricante.

Primeramente, el extracto hexánico de *S. apiana* (RSAH) se redisolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y se obtuvo una solución de 27 mg/ml, a partir de la cual se prepararon las diluciones subsiguientes: 27; 13,5; 6,75 y 3,37 µg/10 µl; dichas soluciones fueron usadas en los experimentos bajo la denominación de 2, 3, 4 y 5, respectivamente. Posteriormente, se prepararon suspensiones de los microorganismos que se iban a evaluar; estas tuvieron una turbiedad de 0,5 (bacterias) o 1,0 (levaduras) en la escala de McFarland. Estas suspensiones fueron diseminadas en cajas de Petri empleando hisopo estéril. En una misma caja de Petri fueron realizados 5 pozos de 5 mm, uno central y 4 más siguiendo los puntos cardinales, cada uno de estos ubicados a 2 cm del

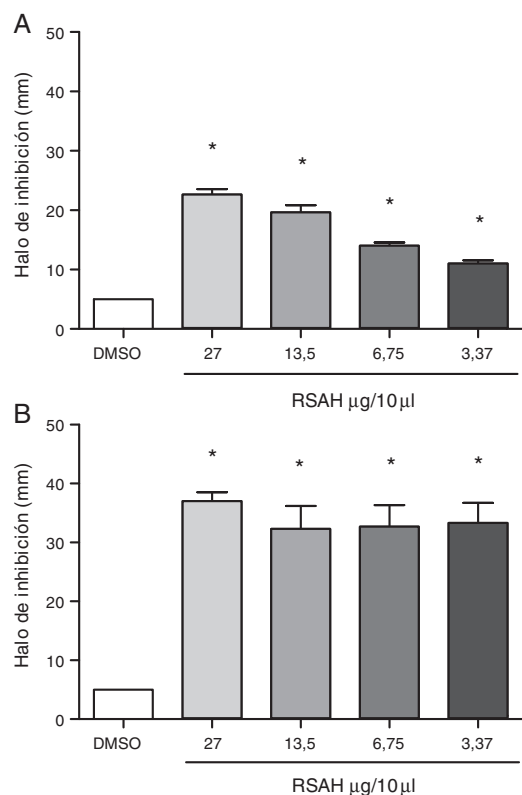


Figura 1 Efecto inhibitorio del extracto RSAH de *S. apiana* en el crecimiento de *S. aureus* (A) y *S. pyogenes* (B).

* $p < 0,0001$ vs. DMSO.

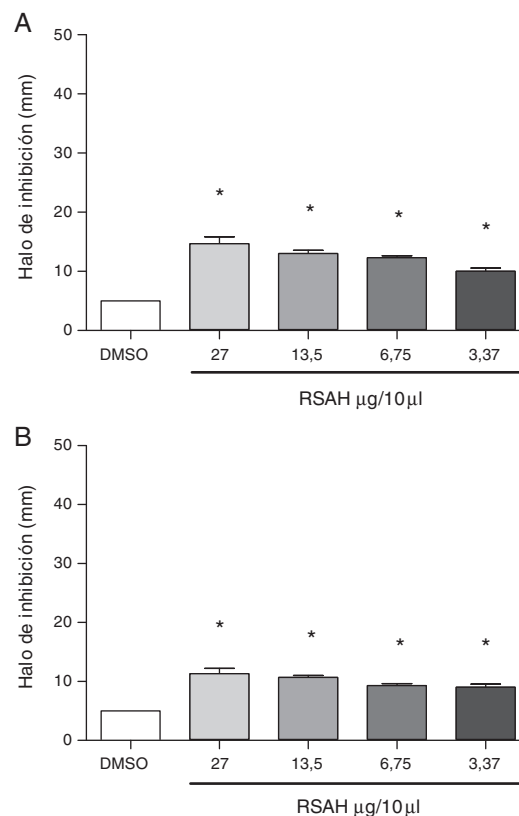


Figura 2 Efecto inhibitorio del extracto RSAH de *S. apiana* sobre *E. faecalis* (A) y *C. albicans* (B).

* $p < 0,0001$ vs. DMSO.

pozo central. El pozo central siempre fue ocupado por $10\mu\text{l}$ del vehículo, mientras que $10\mu\text{l}$ de las soluciones 2, 3, 4 o 5 fueron colocados en los diferentes pozos circundantes. Las cajas de Petri fueron luego incubadas a 37°C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se midió el diámetro de los halos de inhibición.

Los datos se presentan como las medias de los halos de inhibición, cada uno con su respectivo error estándar ($n = 3$). Los datos de cada microorganismo fueron evaluados usando un análisis de varianza (ANOVA) de un factor. En los casos en que se observó diferencia estadística con la prueba mencionada, se empleó una posprueba de Tukey para identificar entre qué grupos estaba tal diferencia, considerando una $p < 0,05$. Para este análisis se empleó el paquete estadístico GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, EE. UU.).

Todas las concentraciones del extracto RSAH inhibieron significativamente el desarrollo de las bacterias gram positivas al compararse con el vehículo. Los resultados muestran halos de inhibición de 10 a 24 mm, de 28 a 40 mm y de 9 a 17 mm frente a *S. aureus* (figura 1A), *S. pyogenes* (figura 1B) y *E. faecalis* (figura 2A), respectivamente, con un efecto dependiente de la dosis excepto en el caso de *S. pyogenes*. De esta manera, se evidencia el efecto antibacteriano de *S. apiana* contra estos microorganismos en coincidencia con los halos de 0 hasta 16 mm producidos por otras especies de *Salvia*, como son *Salvia palaestina*, *Salvia ceratophylla*, *Salvia multicaulis*, *Salvia syriaca*, *Salvia officinalis*, *Salvia lavandulifolia*, *Salvia sclarea* y *Salvia triloba*^{8,11}.

Es importante mencionar que la cepa clínica de *E. faecalis* presentó sensibilidad a ampicilina, gentamicina, linezolid, levofloxacina, norfloxacina, nitrofurantoína, estreptomycin y vancomicina, y resistencia solo a tetraciclina. Un patrón similar se observó en cepas obtenidas de pacientes en hospitales del área metropolitana de la Ciudad de México².

En este estudio, *S. apiana* demostró una gran actividad antibacteriana contra *S. pyogenes*, incluso a las concentraciones del extracto más bajas; esto marca una diferencia con los escasos efectos registrados a las concentraciones altas con extractos de *S. palaestina*, *S. ceratophylla*, *S. multicaulis* y *S. syriaca* frente a la misma especie de estreptococo⁸. La única diferencia entre ambas evaluaciones es que en ese estudio se empleó agar Mueller-Hinton, mientras que nosotros utilizamos agar triptéina de soja; ambos ensayos emplearon los medios de cultivo sin suplementación de sangre bajo un período de incubación a 37°C de 24 h⁸.

Cabe señalar que el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomienda que las pruebas de sensibilidad de *Streptococcus* spp. a los antimicrobianos sean realizadas con agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero y a una temperatura de incubación de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 20 a 24 h⁴. Por lo tanto, las evaluaciones de la sensibilidad de *S. pyogenes* frente a *Salvia* tienen la limitación de que han sido realizadas en condiciones de crecimiento no óptimas para el estreptococo.

Un dato interesante es que el crecimiento de la bacteria gram-negativa (*E. coli* ATCC 25922) no se vio modificado por el extracto RSAH si se compara con el efecto que tuvo el vehículo (ausencia de variación en el halo de inhibición, $p > 0,05$). Esta falta de actividad frente a *E. coli* contrasta con los halos de inhibición de 7,9 a 20 mm reportados para otras especies de *Salvia*, como *S. palaestina*, *S. ceratophylla*, *S. multicaulis*, *S. syriaca*, *S. officinalis*, *S. lavandulifolia*, *S. sclarea* y *S. triloba*^{8,11}. De la misma manera, *S. apiana* en otros estudios no demostró una actividad larvicida apropiada en mosquitos vectores de patógenos de valor clínico^{6,9}. Estas observaciones indican que *S. apiana* presenta un espectro muy específico de actividad antimicrobiana.

Por otra parte, el extracto RSAH produjo un aumento significativo en el halo de inhibición de *C. albicans* en comparación con el vehículo. En la figura 2B se observa un efecto antimicótico dependiente de la dosis, con halos de inhibición que van desde 8 mm hasta 13 mm. Estos resultados concuerdan con los efectos antifúngicos reportados para *S. officinalis*, cuyos extractos produjeron halos de inhibición de 0 a 31,5 mm. Es importante mencionar que el efecto antimicótico mostrado por *S. apiana* en el presente estudio fue observado incluso en las concentraciones más bajas que se evaluaron en los ensayos microbiológicos, a diferencia de lo comunicado para *S. officinalis*¹⁴. Por otra parte, el crecimiento de *C. tropicalis* no presentó modificaciones importantes por la presencia del extracto (0-40% de aumento en el halo comparado con el vehículo, $p > 0,05$). Esta insensibilidad fúngica concuerda con la actividad nula de *Salvia potentillifolia* frente a este microorganismo, ya informada³.

Es bien sabido que los terpenoides aislados de los brotes y raíces del género *Salvia* presentan una considerable actividad antimicrobiana⁶. Por ejemplo, en *S. officinalis* esta actividad es atribuida a la presencia de cineol, tujona y alcanfor⁷. El daño a la integridad de la membrana celular, la actividad antimetabolito y la lisis celular son los mecanismos descritos en vinculación con los efectos antibacterianos y antifúngicos de este tipo de compuestos^{3,5}.

Estos compuestos han mostrado actividad antibacteriana y antimicótica en investigaciones previas. Las diferencias observadas en los efectos de *S. apiana* comparados con los de otras lamiáceas se deben probablemente a la distinta composición química y abundancia de los componentes del extracto, los cuales dependen a su vez de la especie y del ambiente ecológico, entre otros factores⁵.

Para los ensayos microbiológicos se emplearon cepas de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *E. coli*, *C. albicans* y *C. tropicalis*, que son patógenos humanos de gran importancia clínica debido a que causan una amplia variedad de enfermedades infecciosas; se pueden mencionar entre ellas endocarditis, síndrome de shock tóxico, infección del tracto urinario, septicemia, estomatitis bucal y candidiasis^{8,14}.

El método de difusión en pozo ha demostrado una correlación apropiada con el método de referencia en microdilución descrito por el Comité Nacional para Estándares del Laboratorio Clínico (NCCLS, por sus siglas en inglés, actualmente CLSI), haciéndolo una alternativa válida para evaluar la sensibilidad de *Candida* spp. frente a diversos fármacos antifúngicos¹⁰. Sin embargo, se requieren más ensayos bacteriológicos para dar continuidad a la evaluación de la actividad antimicrobiana y de esta manera

confirmar lo observado en este trabajo. Nuestros hallazgos abren el campo para la realización de más estudios con esta especie de lamiácea, que no había sido considerada hasta este momento para su posible uso terapéutico frente a patógenos de importancia clínica.

Por primera vez se reporta la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* de un extracto (hexánico) de la raíz de *S. apiana* frente a patógenos de relevancia clínica como son *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. faecalis* y *C. albicans*; se demuestra un efecto inhibitorio incluso a bajas concentraciones del extracto.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Este estudio fue parcialmente financiado por la SEP a través del Apoyo a la Incorporación de Nuevos PTC, Folio asignado al Profesor: UABC-PTC-490; número de oficio de la Carta de Liberación: DSA/103.5/15/6766.

Bibliografía

1. Amábile-Cuevas C. Antibiotic resistance in Mexico: A brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries*. 2010;4:126–31.
2. Castillo-Rojas G, Mazari-Hiriart M, Ponce de León S, Amieva-Fernández RI, Agis-Juárez RA, Huebner J, López-Vidal Y. Comparison of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from water and clinical samples: Antimicrobial susceptibility and genetic relationships. *PLoS One*. 2013;8:e59491.
3. Celik A, Ergin C, Arslan I, Kartal T. Anticandidal activity of endemic *Salvia potentillifolia* Boiss. and Heldr. ex Benth. and *Origanum hypericifolium* Schwartz and P.H. Davis in Turkey. *J Nat Sci Biol Med*. 2010;1:22–4.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17 [ISBN 1-56238-625-5]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.
5. Cui H, Zhang X, Zhou H, Zhao C, Lin L. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. *Bot Stud*. 2015;56:16.
6. Firuzi O, Miri R, Asadollahi M, Eslami S, Jassbi AR. Cytotoxic antioxidant and antimicrobial activities and phenolic contents of eleven salvia species from Iran. *Iran J Pharm Res*. 2013;12:801–10.

7. Fournomiti M, Kimbaris A, Mantzourani I, Plessas S, Theodoridou I, Papaemmanouil V, Kapsiotis I, Panopoulou M, Stavropoulou E, Bezirtzoglou EE, Alexopoulos A. Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*) sage (*Salvia officinalis*) and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:23289.
8. Karataş H, Ertekin S. Antimicrobial activities of the essential oils of four *Salvia* species from Turkey. *J Med Plant Res*. 2010;4:1238–40.
9. Lu Y, Foo LY. Polyphenolics of *Salvia*-a review. *Phytochemistry*. 2002;59:117–40.
10. Magaldi S, Mata-Essayag S, Hartung de Capriles C, Perez C, Colella MT, Olaizola C, Ontiveros Y. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *Int J Infect Dis*. 2004;8:39–45.
11. Pierozan MK, Pauletti GF, Rota L, Santos ACA, Lerin LA, di Lucio M, Mossi AJ, Atti-Serafini L, Cansian RL, Vladimir Oliveira J. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. *Ciênc. Tecnol Aliment*. 2009; 29:764–70.
12. Salazar-Aranda R, Pérez-López LA, López-Arroyo J, Alanís-Garza BA, Waksman de Torres N. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2011:536139.
13. Secretaría de Salud. Acuerdo por el que se determinan los lineamientos a los que estará sujeta la venta y dispensación de antibióticos, 2010. *Diario Oficial de la Federación*. Distrito Federal, México.
14. Sookto T, Srithavaj T, Thaweboon S, Thaweboon B, Shrestha B. In vitro effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3:376–80.
15. Vazquez-Lago JM, Lopez-Vazquez P, López-Durán A, Taracido-Trunk M, Figueiras A. Attitudes of primary care physicians to the prescribing of antibiotics and antimicrobial resistance: A qualitative study from Spain. *Fam Pract*. 2012;29: 352–60.