

Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de *Capraria biflora* L. (esclaviosa)

Absence of antimicrobial activity in a lyophilized aqueous extract from *Capraria biflora* L. (goatweed)

Iovana Fuentes Cortés^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-3233-4887>

Iraida Spengler Salabarría² <https://orcid.org/0000-0002-2181-4535>

Virginia Leyva Castillo³ <https://orcid.org/0000-0002-3332-6475>

Yaumara Ferrer Marquez³ <https://orcid.org/0000-0002-0193-269X>

Trina H. García Pérez² <https://orcid.org/0000-0002-4044-0567>

¹Centro Nacional de Genética Médica. Cuba

²Universidad de La Habana, Facultad de Química. Centro de Estudios de Productos Naturales. Cuba.

³Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Cuba.

*Autor para la correspondencia. Correo electrónico: iovana@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: la especie *Capraria biflora* L. perteneciente a la familia Scrophulariaceae, presenta una larga historia en la medicina tradicional por tener gran aplicación en varios tratamientos: cuyas causas podrían estar relacionados con infecciones antimicrobianas.

Objetivo: Determinar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso liofilizado de la especie *Capraria biflora* L. frente a una batería mínima de microorganismos de interés clínico.

Métodos: la obtención del extracto se realizó por secado en horno, pulverización en un mortero, extracción por decocción y posterior liofilización. La actividad antibacteriana del extracto acuoso se evaluó *in vitro*, en dos concentraciones (10 y 50 mg/mL), mediante el sistema de ensayo de difusión en agar, con una batería mínima de cepas de microorganismos compuesta por cuatro bacterias Gram negativas: *Klebsiella neumoneae* (ATCC 10031), *Salmonella tiphymurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa*

(ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), una bacteria Gram positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), y dos levaduras *Cándida albicans* (ATCC 10231) y *Saccharomyces cerevisiae* (BCTP 20/agosto/2008).

Resultados: el extracto acuoso de las hojas de *Capraria biflora* L no presenta actividad antimicrobiana, a las concentraciones estudiadas, frente a las cepas de microorganismos de interés clínico utilizadas en el ensayo.

Conclusiones: se reporta por primera vez la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Capraria biflora* L. frente a cepas de bacterias y hongos de interés clínico a las concentraciones de 10 y 50 mg/mL. No se encontró un efecto inhibitorio y se recomienda realizar otros estudios de actividad antimicrobiana que inserten la temática de la virulencia microbiana, encaminados a evaluar el posible efecto bacteriostático que pueda presentar este extracto.

Palabras clave: extracto acuoso liofilizado; actividad antimicrobiana; actividad antibacteriana; *Capraria biflora* L.; actividad antifúngica; bacterias Gram positivas; bacterias Gram negativas; levaduras.

ABSTRACT

Introduction: the species *Capraria biflora* L., from the Scrophulariaceae family, has a long history of use in traditional medicine for the treatment of various disorders whose causes could be related to microbial infections.

Objective: determine the antimicrobial activity of lyophilized aqueous extract from the species *Capraria biflora* L. against a minimum set of microorganisms of clinical interest.

Methods: the extract was obtained by oven drying, pulverization in a mortar, decoction and lyophilization. *In vitro* antibacterial activity of the aqueous extract was evaluated at two concentrations (10 and 50 mg/ml) by the agar diffusion test with a minimum set of microorganism strains composed of four gram-negative bacteria: *Klebsiella neumoneae* (ATCC 10031), *Salmonella tiphymurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), one gram-positive bacterium: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), and two yeasts: *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Saccharomyces cerevisiae* (BCTP 20/08/2008).

Results: at the study concentrations, the aqueous extract of *Capraria biflora* L. leaves does not display antimicrobial activity against the strains of microorganisms of clinical interest evaluated in the assay.

Conclusions: this is the first evaluation of the antimicrobial activity of lyophilized aqueous extract from leaves of *Capraria biflora* L. against strains of bacteria and fungi of clinical interest at concentrations of 10 and 50 mg/ml. No inhibitory effect was found. It is recommended to conduct further antimicrobial activity studies incorporating the topic of microbial virulence, aimed at evaluating the potential bacteriostatic effect of the study extract.

Key words: lyophilized aqueous extract; antimicrobial activity; antibacterial activity; *Capraria biflora* L.; antifungal activity; gram-positive and gram-negative bacteria; yeasts

Recibido: 17/10/2018

Aceptado: 30/01/2019

Introducción

La proliferación de enfermedades causadas por microorganismos patógenos es una preocupación generalizada, que constituye un factor de riesgo para la salud pública. Razón por la cual, se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento bacteriano, entre ellas se reportan plantas, extractos y/o compuestos bioactivos obtenidos a partir de estas.⁽¹⁾

Los efectos antimicrobianos de los compuestos aislados de las diferentes especies vegetales pueden ser medidos por métodos in vitro frente a cepas de diferentes microorganismos de interés clínico, causantes de muchas enfermedades del tipo infecciosas.⁽²⁾

La especie *Capraria biflora* L., pertenece a la familia Scrophulariaceae, es una planta silvestre, común en terrenos calcáreos y cercanías de las costas. No es endémica de Cuba, pero puede encontrarse en casi toda la isla. También puede localizarse desde Bahamas y el Sur de la Florida, pasando por la Indias Occidentales, hasta Suramérica, y desde el Norte de América Central hasta el noroeste de México.⁽³⁾

Esta especie presenta una larga historia en la medicina tradicional, por tener gran aplicación en varios tratamientos en forma de infusión según el país. Se refiere su uso para la dispepsia, como tónico digestivo; así como por su actividad antipirética, diurética, estimulante y digestiva cuando se combina con otras plantas.^(4,5) En la población brasileña utilizan la infusión de la raíz de esta planta para tratar diferentes dolencias relacionadas con desórdenes menstruales.^(6.)

En estudios de actividad antibacteriana “*in vitro*” ante cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), se reporta actividad de los flavonoides luteolina, quercetina y resveratrol.⁽⁷⁾ SouzaI y colaboradores en el año 2012, demostraron la actividad larvicida del aceite esencial de sus hojas contra el *Aedes aegypti*⁽⁸⁾

Estudios farmacológicos realizados por diferentes investigadores a los extractos acuosos de las hojas de *Capraria biflora* L., reportan diferentes tipos de actividades biológicas. Viset, en el año 2009, demostró la actividad antiinflamatoria y analgésica;⁽⁹⁾ Cárdenas y colaboradores en el 2006, reporta la actividad diurética⁽¹⁰⁾ y posteriormente, Burrows en el 2009, estudia la actividad de este extracto para el tratamiento y prevención de las cataratas.⁽¹¹⁾

Algunos campesinos con reconocido prestigio en el cultivo y empleo del uso de plantas medicinales para la población, como el Gallego Otero (Cuba), han recomendado el uso de la infusión de las hojas de la planta para inflamaciones pélvicas, desórdenes menstruales, fibromas uterinos, fluidos vaginales y algunos casos de infertilidad, mezclada con otras plantas.⁽¹²⁾

Tomando en consideración que una de las causas que pudieran provocar algunas de las afecciones para la cual la población emplea la infusión de las hojas de *Capraria biflora* L. puede deberse, entre otras, a infecciones del tipo microbiana y a la no existencia en la literatura de estudios sobre la determinación de la actividad antimicrobiana del extracto acuoso liofilizado de las hojas de esta especie, este trabajo se propone como objetivo determinar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso liofilizado de la especie *Capraria biflora* L. frente a una batería mínima de microorganismos de interés clínico.

Métodos

Material vegetal

El material vegetal (hojas de *Capraria biflora* L.) se recolectó en la finca La Sierrita de la provincia de Cienfuegos, Cuba, en enero de 2016. Fue recolectado e identificado por el ingeniero agrónomo Lázaro Otero. Los órganos de la planta fueron separados y todo el material vegetal se secó a la sombra. Se seleccionaron las hojas para su estudio fitoquímico.

Procesamiento del material vegetal

Siguiendo las indicaciones del Gallego Otero,⁽¹²⁾ las hojas fueron secadas a la sombra y luego en la estufa a 40 °C hasta conseguir una masa constante. Posteriormente, se trituraron y molieron en un mortero hasta lograr un polvo fino (250 g), para disminuir el tamaño de partículas. El material vegetal seco y molido, se sometió a un proceso de extracción por decocción tres veces durante 4 horas con agua destilada. Posteriormente, el extracto acuoso fue liofilizado a una temperatura de -80 °C.

Ensayo de susceptibilidad bacteriana

Se utilizó el método de difusión en agar (Kirby-Bauer),⁽¹³⁾ prueba de susceptibilidad “*in vitro*” que se emplea para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico.

El ensayo se realizó para el extracto acuoso liofilizado del material vegetal, el cual fue disuelto en agua destilada estéril para obtener dos disoluciones con concentraciones de 10 y 50 mg/mL, respectivamente.

Cepas de microorganismos: Las cepas utilizadas en el ensayo de actividad antimicrobiana son de referencia internacional, depositadas en el American Type Culture Collection (ATCC) y forman parte de una batería mínima de cepas que se emplean para este tipo de estudio. Fueron utilizados cuatro bacterias Gram negativas: *Klebsiella neumoneae* (ATCC 10031), *Salmonella tiphymurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), una bacteria Gram positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), y dos levaduras *Cándida albicans* (ATCC 10231) y *Saccharomyces cerevisiae* (BCTP 20/agosto/2008).

Controles: Como control negativo se utilizó agua destilada estéril. El control positivo empleado para el estudio con las bacterias fue la Gentamicina (10 µg). No se incorporó control positivo para el estudio con levadura, por no estar disponible en el laboratorio.

Medios de cultivo: Las cepas liofilizadas, para el estudio con las bacterias, se replicaron en tubos con agar Múeller-Hilton y para las levaduras en tubos con agar Saboreaud-Dextrosa. Las pruebas de actividad antimicrobiana, se realizaron por el método Kirby-Bauer.⁽¹³⁾

Preparación del inóculo: Al cultivo de las cepas posterior a la incubación, se le agregó 5 mL de suero fisiológico estéril (0,85 %) para obtener una suspensión microbiana con una concentración según la escala de Mc Farland de $1,5 \times 10^8$ cel/mL, esto se realizó comparando la turbidez del tubo patrón de la escala con la suspensión obtenida a partir del microorganismo crecido.

Método Kirby-Bauer: Se empleó el método de placa vertida. A cada placa estéril se le agregó 1 mL de la suspensión antes referida (según el tipo de microorganismo) y 20 mL de cada medio fundido y atemperado a 45 ± 1 °C, se realizó la homogenización del inóculo mediante ligeros movimientos de rotación en el sentido de derecha a izquierda (aproximadamente 5 veces), dejando solidificar el medio. Después de este proceso, fueron abiertos pocillos de 1 cm de diámetro aproximadamente en condiciones asépticas. Por cada placa, se realizó la siguiente distribución de pocillos (Fig. 1):

- Tres pocillos se inocularon con la disolución del extracto acuoso a diferentes concentraciones (estudio por triplicado).
- Un pocillo se inoculó con 100µL de agua destilada estéril como control negativo.
- Un pocillo se inoculó con el disco de Gentamicina (control positivo para las bacterias).

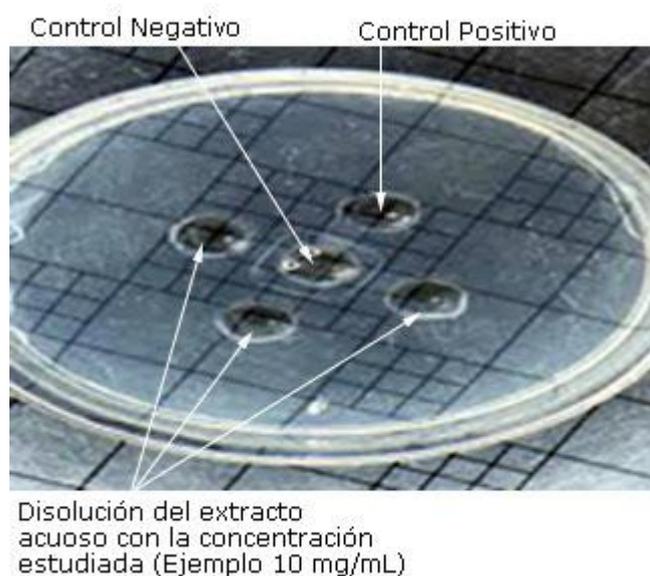


Fig. 1 - Distribución de los pocillos en la placa

Las placas fueron incubadas, en el caso de las bacterias por 24 horas a una temperatura de 35 ± 2 °C y para las levaduras a una temperatura de 25 ± 2 °C por 48 horas. Posteriormente, fueron medidos los halos de inhibición mediante la lectura en milímetros del diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos. Los resultados se expresaron como: sensible, moderadamente sensible o resistente.

Resultados

Evaluación de la actividad antibacteriana

Debido a que varias de las enfermedades para las cuales ha sido tradicionalmente utilizado el extracto acuoso de esta planta⁽¹²⁾ y a su actividad antiinflamatoria comprobada,⁽⁹⁾ pueden ser consecuencia de infecciones bacterianas y fungicidas, se decidió realizar un estudio de actividad antibacteriana y antifúngica, frente a cepas de microorganismos de interés clínico. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1 - Halos de inhibición expresados en milímetros (mm) de dos concentraciones del extracto acuoso liofilizado de *Capraria biflora* L., frente a cepas Gram positivas y Gram negativas.

| Microorganismo (cepas de Bacterias) | 10 mg/mL | | | 50 mg/mL | | |
|--|------------------|---------|---------|------------------|---------|---------|
| | Liofilizado (mm) | CP (mm) | CN (mm) | Liofilizado (mm) | CP (mm) | CN (mm) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) | 00 | 18 | 00 | 00 | 18 | 00 |
| <i>Klebsiella neumoneae</i> (ATCC 10031) | 00 | 22 | 00 | 00 | 22 | 00 |
| <i>Salmonella</i> spp (ATCC 14028) | 00 | 18 | 00 | 00 | 17 | 00 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) | 00 | 15 | 00 | 00 | 13 | 00 |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) | 00 | 15 | 00 | 00 | 14 | 00 |

CP= Control positivo, CN= Control negativo, 00 = sin actividad.

En el estudio con las cepas de bacterias, las disoluciones del extracto a las diferentes concentraciones no mostraron efecto inhibitorio en comparación con el control positivo (Gentamicina), el cual mostró halos de inhibición entre 13 y 22 mm. De igual modo, las levaduras tuvieron el mismo comportamiento, al no existir halo de inhibición con las diferentes cepas estudiadas, a pesar de no haberse incorporado un control positivo, por no estar disponible en el laboratorio.

Los resultados obtenidos indican que el extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Capraria biflora* L., con las concentraciones utilizadas (10 y 50 mg/mL), no posee efecto inhibitorio sobre los microorganismos estudiados, por lo que se reportan como resistentes.

Discusión

En la literatura solamente aparecen reportados en este extracto estudios de actividad diurética por Franco⁽¹⁴⁾ y de actividad antiinflamatoria y analgésica por Viset,⁽⁹⁾ por lo que este resultado es novedoso, en el estudio de esta planta.

Los resultados de la actividad antimicrobiana sugieren que el éxito del uso etnomedicinal de este extracto para curar diversas dolencias, no está relacionado con la presencia de actividad bactericida o fungicida, sino a otro posible mecanismo de acción de los metabolitos presentes en ella.

Una evaluación biológica adicional podría basarse en estudios de la virulencia microbiana, los cuales demuestran que, aunque los enfoques tradicionales para combatir las infecciones microbianas permanezcan eficaces, el dirigirse al estudio de la modulación de los factores de virulencia, podrían conducir a una presión evolutiva más leve en el desarrollo de la resistencia de las bacterias, por lo que se logra además, un resultado más confiable cuando se combinan estos estudios con los antimicrobianos convencionales.⁽¹⁵⁾

En este estudio, se demostró por primera vez la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Capraria biflora* L. frente a cepas de interés clínico, a las concentraciones de 10 y 50 mg/mL. No se encontró efecto inhibitorio y se recomienda realizar otros estudios de actividad antimicrobiana que inserten la temática de la virulencia microbiana, encaminados a evaluar el efecto bacteriostático que pueda presentar este extracto.

Referencias bibliográficas

1. Bueno, J. Metabolomics in antimicrobial drug discovery: the success of the chemical diversity. *Journal Microb. Biochem. Technol.* 2015. 7, 380-3
2. Sharma, A., Flores Vallejo, RC., Cardoso, A., Villarreal, ML. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology.* 2017, 208, 264-329
3. Ganther, A.R., Verlag, K.G. Flora de la República de Cuba. Serie A Plantas Vasculares. 2010, 16, Editorial Ruggell, Liechtenstein, 9491.
4. Longuefose, J.L. *Plantes Medicinales Caribéennes.* 2016, 3, Editorial Orphic, France

5. Lemus, Ch., Grougnet, R., Njoh, E., Tian, W., Lecso-Bornet, M. "Phytochemical study of *Capraria biflora* L. aerial parts (Scrophulariaceae) from Martinique island (French West Indies). *Phytochemistry Letters*. 2015, 13,94–199.
6. Yazbek, P.B., Tezoto, J., Rodrigues, CE. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures. [Journal of Ethnopharmacology](#). 2016, 179, 310-31
7. Yanli, S., Liyan, M., Yan W., Hong, W. and Shuwen, Z. "Studies of the in vitro antibacterial activities of several polyphenols against clinical isolates of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". *Molecules*.2014.
8. SouzaI, G. L., Almeida M. C., Monte F. J., Santiago G. M., Braz-Filho R., Lemos T. L., Gomes C., do Nascimento R. F. "Chemical constituents of *Capraria biflora* (Scrophulariaceae) and larvicidal activity of essential oil". *Química Nova*. 2012, 35 (11)
9. Viset, L. "Contribución a la farmacología antiinflamatoria de la especie *Capraria biflora*, L. "Tesis para optar por el grado Científico de Doctor en Ciencias de la Salud. 2009, La Habana.
10. Cárdenas, M.B., Monteagudo, G.L., Jiménez, E.M., Oryarzum, M.S., Chavian, Y.M., Matos, J.J. and Loy, S. "Diuretic activity of five medicinal plants used popularly in Cuba". *Pharmacology online*. 2006, 3, 435–41.
11. Burrows, A. "Use of extracts of *Capraria biflora* in the prevention and/or treatment of senile cataracts". United States patent. 2009, US 20090280204 A1 20091112.
12. Arencibia, R. *Un científico popular*. 2008, Editorial Pueblo y Educación, La Habana
13. Bauer, A.W., Kirby, W.M. "Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method". *American Journal of Clinical Pathology*. 1966,45,493.
14. Franco, M. A. "Evaluación fitoquímica, actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de *Capraria biflora* L. (SCROPHULARIACEAE) de la localidad de Guaranche. Cumaná, Estado Sucre". Trabajo de grado para optar al título de Licenciada en Bioanálisis, 2012, Venezuela.
15. Nunes, S.L., Rigon, K., Macedo, A.J., and Silva, D. "Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors". *Chemical. Reviews*. 2016.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Contribución de los autores

Iovana Fuentes Cortes: realización del análisis fitoquímico del extracto acuoso de *Capraria biflora L.*, análisis de los resultados y redacción del artículo científico

Iraida Spengler Salabarría: participación en la obtención del material botánico, autora del proyecto en el que se inserta el artículo. Coordinó toda la investigación y realizó revisión de la redacción final.

Virginia Leyva Castillo: realización de ensayos de actividad antimicrobiana y análisis de los resultados.

Yaumara Ferrer Marquez: realización de ensayos de actividad antimicrobiana y análisis de los resultados.

Trina H. García Pérez: análisis de los resultados y realizó revisión de la redacción final