

Evaluación de la respuesta inhibitoria de los compuestos activos de *Costus scaber* (Cañaflota) y *Cecropia peltata* (Yarumo) sobre *Klebsiella pneumoniae* y *Streptococcus mutans* presentes en la cavidad bucofaríngea

Dra. Diana Carolina Méndez Leal

Microbióloga Agrícola y Veterinaria. Laboratorio de Microbiología Ambiental, Departamento de Ciencias Básicas, Corporación Universitaria del Meta. Investigador Grupo Simul Ando. Asesor Semillero Biosearch. e-mail: caritovillao801@hotmail.com

Ing. Leonardo Alexis Alonso

Profesor Tiempo Completo Periodo Académico, Corporación Universitaria del Meta. Candidato a Magister en Ingeniería, Ingeniero Agroindustrial. Investigador Grupo Simul Ando. Asesor Semillero Biosearch. e-mail: leoalonso76@yahoo.com

Ing. Ramiro Hernán Polanco Contreras

Jefe Planeación y Control, Corporación Universitaria del Meta. Magister en Relaciones Internacionales, Especialista Tecnológico en Seguridad y Riesgos Profesionales, Ingeniero Industrial y Mecánico de Mantenimiento General. Investigador Grupo Simul Ando. Asesor Semillero Biosearch. e-mail: ramiropolanco@yahoo.com, ramiro.polanco@unimeta.edu.co o planeacion@unimeta.edu.co.

Elsmín Jimena Riapira Cano

Estudiante Programa Ingeniería Agroindustrial, Corporación Universitaria del Meta. Líder Semillero Biosearch. e-mail: jimeriapira_17@hotmail.com.

RESUMEN

Se realizó la identificación de los efectos sobre la actividad antimicrobiana y antimicótica que se pueden obtener a partir de extractos de plantas medicinales. Además, se describen las características y algunos resultados obtenidos a partir del uso de los dos principales métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y antimicótica: método de Kirby Bauer y el ensayo por difusión en placa.

Palabras clave:

Actividad antimicrobiana, Actividad antimicótica, Extractos de plantas, Método de Kirby Bauer, Difusión en placa.

Evaluation of the inhibitory response of the active compounds of *Costus scaber*(Cañaflota) and *Cecropia peltata* (Yarumo) on *Klebsiella pneumoniae* and *Streptococcus mutans* present in the oropharyngeal cavity

ABSTRACT

Was conducted to identify the effects on the antimicrobial and antifungal that can be obtained from extracts of medicinal plants. It also describes the characteristics and some results obtained from the use of the two main methods for assessing antimicrobial and antifungal activity: Kirby Bauer method and the diffusion plate assay.

Key words:

Antimicrobial activity, Antifungal activity, plant extracts, Kirby Bauer method, Petri-dish diffusion.

INTRODUCCIÓN

Colombia presenta un patrimonio y mega diversidad de plantas medicinales nativas, siendo uno de los pilares de la etnofarmacología y la medicina tradicional, desde la época de la colonización hasta el día de hoy, uno de sus logros en el transcurrir del tiempo ha sido utilizarla de forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud.

Desde hace unos años, el empleo de plantas medicinales y de productos derivados de las mismas se ha incrementado de manera significativa. Esto se debe a una serie de factores, entre los cuales debemos destacar en muchos casos el conocimiento preciso de su composición química, y el hecho de que en la actualidad dicha utilización se fundamenta en numerosos ensayos in vitro e in vivo.

Una planta medicinal es considerada como un compilado de síntesis y degradaciones en el que generalmente se compenentran los componentes con diversidad de estructuras químicas, y su

efecto en muchas ocasiones se debe a varios de estos componentes. Además de los principios activos que son en su mayoría son metabolitos secundarios, en las plantas se encuentran los metabolitos primarios y una serie de sustancias consideradas inertes con múltiples funciones.

El **yarumo** o **yagrumo** (*Cecropia peltata*) es un árbol representativo de la zona intertropical americana y se extiende desde México hasta América del Sur. Es común en clima cálido, aunque puede llegar a crecer a alturas de más de 2.000 metros en las laderas montañosas, en zonas conocidas como selva nublada, bosque nuboso, bosques caducifolios, siempre verdes y morichales. Está incluido en la lista *100 de las especies exóticas invasoras más dañinas del mundo* de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza.

Es de crecimiento rápido, sus raíces son superficiales y su vida es corta. Es un árbol típico de la vegetación pionera,

crece en los rastrojos, por lo que es ideal para proyectos de reforestación.

En cuanto a sus propiedades: El látex es astringente y corrosivo, se usa en el control de verrugas, callos, herpes, úlceras disenteria y enfermedades venéreas. La corteza es antibleorrágico. Las hojas son analgésico, antiasmático, se usan en afecciones del hígado e hidropesía. En general se plantea que posee propiedades hipostenizantes, cardiovasculares, como febrífugo, diurético, suavizante de la piel, tónico-capilares y cicatrizantes.

En Colombia la consideran eficaz contra la Corea, el mal de Parkinson, los cogollos hervidos se usan contra el dolor de muelas. Facilita el parto, las menstruaciones.

El **cañaflota** (*Scaber costus*) es una especie de planta fanerógama Planta con flores y semillas visibles. Están constituidas por los siguientes órganos: raíz, tallo y hojas, que les sirven para alimentarse y respirar; y flor, fruto o semilla, que les sirven para multiplicarse; perteneciente a la familia *Costaceae*. Es originaria de América tropical.

MATERIALES Y METODOS

Recolección y preparación de las muestras

El material vegetal se recolecto en el municipio de Cumaral se encuentra ubicado a 20 km de Villavicencio, con una altura de 412 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 24°C, el material vegetal fue lavado y el proceso de extracción se realizo utilizando el equipo Soxhlet, se empleo como medio de arrastre alcohol y agua.

Imagen N°1. Preparación del material vegetal



Fuente: Los autores

Extracto

Los principios activos de las plantas medicinales se obtienen también por un tipo de extracción llamada "sólido-liquido". Este proceso consta de tres etapas:

1. Penetración del disolvente en los tejidos de los vegetales e hinchazón
2. Disolución de las sustancias extraíbles.
3. Difusión de las sustancias extraíbles disueltas fuera de la célula vegetal.

Imagen N°2. Montaje equipo Soxhlet



Fuente: Los autores

La forma de extracción más frecuente es por maceración, este proceso tiene algunas ventajas sobre la percolación y contracorriente. También se puede procesar la extracción mediante métodos que involucran el ultrasonido, el eléctrico, y el vórtice (turbo). La extracción de los extractos requiere un cierto equipamiento y conocimiento de procesos químicos.

Imagen N°3. Extractos del material vegetal



Fuente: Los autores

Tabla N° 1. Cantidades usadas en la extracción

CANTIDADES USADAS EN LA EXTRACCION	CAÑAFLOTA		YARUMO	
	Agua (H ₂ O)	Alcohol Etílico (C ₂ H ₆ O)	Agua (H ₂ O)	Alcohol Etílico (C ₂ H ₆ O)
Volumen Inicial	300 ml	300 ml	300 ml	300 ml
Volumen Salida	132 ml	232 ml	150 ml	167 ml
Peso Muestra Inicial	28 g	11,5 g	27,2 g	28,6 g

Fuente: Los autores

Imagen N°4. Residuos del proceso de extracción



Fuente: Los autores

Tabla N°2. Caracterización de la extracción

SUSTANCIAS DE INTERES EXTRAIDAS	AGUA (H ₂ O)		ALCOHOL ETILICO (95%)	
	BUENO	MALO	BUENO	MALO
CAÑAFLOTA	H ₂ O	X	H ₂ O	X
	PIGMENTOS	X	PIGMENTOS	X
	TERPENOS	X	TERPENOS	X
	CARBONOS	X	CARBONOS	X
	TANINOS		X	TANINOS
YARUMO	H ₂ O	X	H ₂ O	X
	PIGMENTOS		PIGMENTOS	X
	TERPENOS	X	TERPENOS	X
	CARBONOS	X	CARBONOS	X
	TANINOS		X	TANINOS

Los autores

Fuente:

Microorganismos

Se utilizaron los siguientes microorganismos: **Klebsiella pneumoniae, Candida albicans y Streptococcus mutans** los que fueron provistos por el Laboratorio de Microbiología de la Corporación Universitaria del Meta y el laboratorio de microbiología de la Universidad de los Llanos. Los mismos fueron conservados en medio Agar Sabouraud, Agar Nutritivo, Agar Eosina azul de metileno (EMB), Agar

Sangre a 37°C y repicados periódicamente. **Imagen N°6. *Streptococcus mutans***

Imagen N°5. Proceso de siembra



Fuente: Los autores

Cepas bacterianas:

1. A partir de muestras de saliva se aislaron cepas autóctonas de ***Streptococcus mutans* y *Candida albicans*** utilizando un medio selectivo: Agar Nutritivo posteriormente Agar Sangre,), incubándose a 37°C por 48 Horas. Las cepas se identificaron por pruebas bioquímicas (BioMérieux, Francia)



Fuente: Los autores

Imagen N°7. *Candida albicans*



Fuente: Los autores

2. Se analizaron 15 aislamientos de ***Klebsiella pneumoniae*** colectado de un brote en caballos de tiro, durante el mes de junio del 2011 en la unidad de hospitalización de la clínica de grandes de La Universidad de los Llanos, la cepa se identificó por pruebas bioquímicas.

Imagen N°8. *Klebsiella pneumoniae*



Fuente: Los autores

Evaluación de la actividad antifúngica y antimicrobiana

La actividad antifúngica y antimicrobiana de los extractos se evaluó por el método de dilución en agar. (Navarro García et al., 2003) Los extractos se ensayaron en el rango de diluciones seriadas, (10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6). La actividad del extracto tanto etanólico como en agua primero se homogeniza con el medio de cultivo y luego sembramos el microorganismos para observar las colonias bacterias y el numero de UFC viables en el medio.

Para las mismas muestras se utilizo el método de Kirby Bauer o antibiograma que consiste en el estudio de la sensibilidad o resistencia de determinado microorganismo (o grupo de ellos) a varios antibióticos y en este proceso a los extractos y en este caso a los extractos de las dos plantas, para los cuales se realizaron los sensidiscos para cada los cuatro extractos. Se puede utilizar para tratar un patógeno, añadir a alimentos, en definitiva para saber cómo se comporta un frente a determinado antibiótico.

En este caso se utilizo agar nutritivo, en el cual se difunde correctamente tanto los microorganismos como el extracto para poder observar los halos de inhibición de cada uno de los extractos, este diámetro se utiliza como indicativo de la sensibilidad o resistencia al antibiótico o extracto.

RESULTADOS

Tabla N°3. Método en sándwich

Técnica Sándwich				
Medio Agar Nutritivo Yarumo (<i>Cecropia peltata</i>) + Etanol				
Extracto	Dilución	<i>Klebisella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
2.0 ml	10^1	4 Colonias	Crecimiento masivo	2 Colonias
1.5 ml	10^2	17 Colonias	Crecimiento masivo	22 Colonias
1.0 ml	10^3	Crecimiento masivo	Crecimiento masivo	93 Colonias
Medio Agar nutritivo Yarumo (<i>cecropia peltata</i>) + Agua				
Extracto	Dilución	<i>Klebisella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
2.0 ml	10^1	Crecimiento masivo	Crecimiento masivo	Crecimiento masivo
1.5 ml	10^2	Crecimiento masivo	Crecimiento masivo	Crecimiento masivo
1.0 ml	10^3	Crecimiento masivo	Crecimiento masivo	Crecimiento masivo

Fuente: Los autores

Tabla N°4. Antibiograma

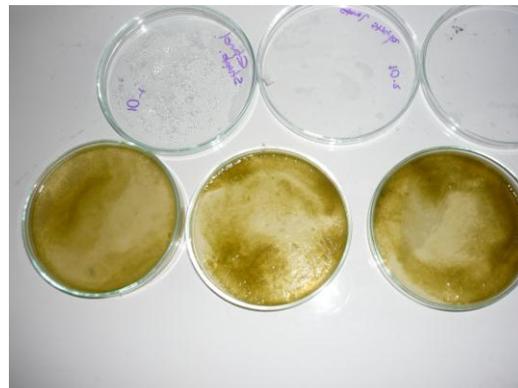
Extracto	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Cañaflota costus scaber + agua 2 ml	2 mm	Resistente	1 mm
Cañaflota costus scaber + etanol (95%) 2 ml	resistente	Resistente	Resistente
<i>Cecropia peltata</i> (yarumo)+ Agua 2 ml	2 mm	1 mm	2 mm
<i>Cecropia peltata</i> (yarumo)+ etanol (95%) 2 ml	Resistente	Resistente	Resistente

Fuente: Los autores

Agua			
Dilución seriadas	<i>Klebisella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
101	Crecimiento masivo	23 colonias	Crecimiento masivo
103	Crecimiento masivo	12 colonias	Crecimiento masivo

Fuente: Los autores

Imagen N°9. Muestras para conteo de colonias



Fuente: Los autores

Tabla N°5. Método aislamiento en placa

Método de Aislamiento en Placa			
Medio Agar Nutritivo Yarumo (<i>Cecropia peltata</i>) + Etanol 95%			
Dilución seriadas	<i>klebisella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
101	45 colonias	3 colonias	57 colonias
103	Crecimiento masivo	No hubo crecimiento	27 colonias
Medio Agar Nutritivo Yarumo (<i>Cecropia peltata</i>) + Agua			
Dilución seriadas	<i>Klebisella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
101	Crecimiento masivo	6 colonias	13 colonias
103	Crecimiento masivo	3 colonias	9 colonias
Medio Agar Nutritivo Cañaflota (<i>Costus scaber</i>) + Etanol 95%			
Dilución seriadas	<i>Klebisella pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Streptococcus mutans</i>
101	95 colonias	6 colonias	25 colonias
103	45 colonias	Crecimiento masivo	12 colonias
Medio Agar nutritivo Cañaflota (<i>costus scaber</i>) +			

Las plantas tienen una casi ilimitada habilidad de sintetizar sustancias aromáticas, gran cantidad de ellas son fenoles o sus derivados de oxígenos sustituidos. Muchos son metabólicos secundarios de los cuales por lo menos 12.000 han sido aislados, un número estimado menor en un 10% del total.

En numerosos casos estas sustancias sirven como mecanismos de defensa de las plantas contra la predación por microorganismos, insectos y herbívoros. Algunos, tales como los terpenoides, dan a las plantas sus olores; otros (quinonas y

taninos) son responsables del pigmento de las plantas (Madigan, y col 2003).

Con este estudio se demostró que la actividad microbiana se inhibe por la presencia de derivados de fenoles, parte de los flavonoides in vitro el crecimiento de *Streptococcus* sp, *Candida albicans* y otras bacterias. Los flavonoides también exhiben actividad antiviral; los taninos presentan actividad astringente. (Font, 1976).

Se considera que la acción de los fenoles y polifenoles contra los microorganismos se debe a la inhibición enzimática posiblemente por acción sobre los grupos sulfhidrilos de sus aminoácidos de cisteína o por medio de reacciones más inespecíficas con proteínas bacterianas.

Los compuestos fenólicos que poseen una cadena lateral a nivel de C3 en un bajo nivel de oxidación y que no contienen oxígeno, son clasificados como aceites esenciales y a veces se citan como agentes antimicrobianos bacteriostáticos contra hongos y bacterias (Cowan, 1999).

Se pudo medir la sensibilidad de las cepas bacterianas, este fue el efecto que pudimos observar la eficacia in vivo de un tratamiento infeccioso de este tipo siendo uno de los más importantes el bucofaringeo, pudimos observar la actividad antibacteriana, en el cual el espectro comprende a las bacterias que pueden llegar a resistir a las bacterias en su forma natural, en este proyecto pudimos observar la presión de la selección por una cepa determinada como en el caso de *Klebsiella pneumoniae*,

streptococcus mutans, el extracto de cañafloa con agua inhibió el crecimiento del microorganismo, mostro un halo de inhibición depara la primera 1 mm y para el segundo 2 mm en el caso de *candida albicans* fue resistente a el producto, en la mayoría de los casos se observó una resistencia natural de la cepa, El conocimiento de las resistencias naturales permite prever la inactividad de la molécula frente a bacterias identificadas (después del crecimiento) o sospechosas.(Alef y col, 1995)

En ocasiones, constituye una ayuda para la identificación, puesto que ciertas especies se caracterizan por sus resistencias naturales. Uno de los ejemplos más llamativos para muchos estudios ha sido la resistencia natural de la *Klebsiella pneumoniae* a las penicilinas, ampicilina, amoxicilina y algunos extractos de plantas.(Atlas, 2002)

En el método de aislamiento en placa se pudo observar que hubo un crecimiento representativo, de los microorganismos ya que pudimos observar macroscópicamente las características morfológicas de las tres bacterias, este método fue puntual en el momento de realizar las pruebas bioquímicas en las cuales determinamos con certeza de un 99.9% que las bacterias que aislamos eran las que encontramos en el medio de cultivo.

Se observa que los extractos etanólicos y acuosos de hojas, tienen un metabolito secundario (mayor en frutos) que se agrupa dentro de los glicósidos. Las hojas

presentaron actividad antimicrobiana y antifúngica.

CONCLUSIONES

- La eficacia de la Plantas medicinales contra la cepa de *streptococcus mutans* y *klebsiella pneumoniae* es del 65%, por lo que puede ser utilizado como una alternativa para el tratamiento de enfermedades bucofaríngeas.
- La mayoría de extractos carecen de actividad antifúngica frente a la levadura *Candida albicans*.
- La prueba de sándwich fue efectiva a concentraciones altas del extracto, evita el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*.
- Se debe aumentar la concentración de los sensidiscos de 2 ml, con el fin de observar si los microorganismos son resistentes o sensibles a los extractos.
- El método de aislamiento en placa demostró que luego de realizar diluciones seriadas, por ejemplo para la confrontación de Yarumo tanto en agua como etanol y Cañaflota en agua y etanol, demostraron que podían inhibir el crecimiento de bacterias a diferentes concentraciones, logrando determinar que Yarumo mas agua es más efectivo para que no se produzca biomasa, ya que controlo el crecimiento de los tres microorganismos.

BIBLIOGRAFIA

- Aleff, K. Y y P. Nannipieri. 1995. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press Inc., N. Y.
- Alexander, M.1980. Introducción a la Microbiología del Suelo.AGT Editor, S.A. México.
- Atlas, R. y R.Bartha. 2002. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. 4ª Ed. Pearson Educación.
- Brock, M. T. Madigan. 1993. Microbiología, T. Prentice Hall Hispanoamericana.
- Coyne, M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. Ed. Paraninfo. 416 pp.
- Haynes, R.J 1986. Mineral nitrogen in the plant soil system. Acad. Press Inc., N.Y.
- Font Quer P. 1976. Plantas Medicinales. Barcelona. Labor. 1033 p.
- Fores, R. 1997. Atlas de las plantas medicinales y curativas; la salud a través de las plantas. Madrid. Culturam. 111 p.
- Garcia RH. (1991) Plantas curativas Mexicanas. México. Ed. Panorama. 263 p.
- Girault L., 1987. Kallawayas Curanderos Itinerantes de los Andes de Bolivia.
- GIRÓN LM. FREIRE AV. ALONZO A. CÁCERES A. (1991) Ethnobotanical

survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. J. Ethnopharmacol 34:173

- Lengerer, J.W., Drwes, G., H. Schlegel. 1999. Biology of the Prokaryotes. Thieme, N.Y.
- RGA C. Lastra J. 1988. Plantas de uso común en Chile. Tomo I. Santiago. SOPRAMI. 119 p.