

Efecto antibacteriano de *Virola sebifera* sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

Judith Velasco^{1*}, Elvis Contreras¹, Diolimar Buitrago² y Elsa Velasco¹

¹Departamento de Microbiología y Parasitología. ²Instituto de Investigaciones. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela.

Recibido: 02-03-05 Aceptado: 15-11-05

Resumen

En la actualidad, *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM) representa un reto significativo para la salud pública en muchos hospitales a nivel mundial, por ser esta bacteria agente etiológico de brotes y de fácil transmisión entre pacientes hospitalizados, con una elevada resistencia a los antibióticos de uso clínico y análogos semisintéticos. Numerosos estudios revelan el potencial de las plantas superiores como fuente de nuevas sustancias con actividad antimicrobiana. En este sentido, partiendo de estudios farmacológicos realizados con muestras de miembros del género *Virola*, en el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos acuoso, acetónico y etanólico de la especie *Virola sebifera* Aubl., contra 28 cepas SARM de origen nosocomial, por el método de difusión en agar con discos. Análisis de los resultados muestran que el extracto acuoso inhibió el mayor número de cepas de SARM (89,29%), con una CIM entre 100 y 600 mg/mL. En vista de estos resultados se concluye que el extracto acuoso de *Virola sebifera* presentó mayor actividad antibacteriana contra cepas estudiadas. De acuerdo a la literatura consultada, esta es la primera investigación sobre actividad antibacteriana descrita en esta especie vegetal.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana; Myristicaceae; SARM; *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; *Virola sebifera*.

Antibacterial effect of *Virola sebifera* against *Staphylococcus aureus* methicillin resistant

Abstract

Staphylococcus aureus methicillin-resistant (MRSA) represents a quite important aim for the public health now days, specially in hospitals around the world. This bacteria is an etiologic agent of easy transmission mainly within patients which have to remain at hospitals and it shows a very high resistance to both clinic antibiotics and semisynthetic analogous. A number of studies have revealed the potential use of the plants as source of new substances with antimicrobial activity. Based on the traditional uses and pharmacological studies carried out with the genus *Virola*, in the present investigation the antibacterial activity of aqueous, acetonic and ethanolic extracts botanical material of the species *Virola sebifera* Aubl was evaluated against 28 culture MRSA strains of nosocomial origin, using the disk agar diffusion method. Results analysis obtained showed that aqueous extract inhibited an important number of MRSA strains (89.29%) with a MIC at 100-600 mg/mL. The aqueous extract of *Virola sebifera* exhib-

* Autor para la correspondencia. E-mail: judithvelasco2005@yahoo.es

ited a significant antibacterial activity against MRSA strains. This is first report on antibacterial activity for this plant species.

Key words: Antimicrobial activity; methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; Myristicaceae; MRSA; *Virola sebifera*.

Introducción

Staphylococcus aureus resistente a Metilina (SARM) es una bacteria que representa un problema de salud pública a nivel hospitalario. Es endémico en muchas regiones, aumentando así la morbilidad, mortalidad y coste en los centros de atención sanitaria asociados a infecciones intrahospitalarias (1-4).

En los últimos años la resistencia antimicrobiana se ha incrementado para SARM, lo cual dificulta el manejo terapéutico de infecciones nosocomiales ocasionadas por este microorganismo (4-6).

Debido a la capacidad de las bacterias para desarrollar resistencia a los fármacos, se han realizado numerosas investigaciones para identificar sustancias con actividad antimicrobiana en plantas superiores, las cuales revelan el potencial de las mismas y representan una alternativa para erradicar las bacterias multirresistentes (7-12).

La especie *Virola sebifera* Aubl., pertenece a la familia Myristicaceae, en animales posee efectos alucinógenos debido a la presencia de alcaloides en su corteza (13), además es utilizada en productos y medicamentos veterinarios homeopáticos (14) y también es usada industrialmente en la elaboración de jabones (15). En otras especies del mismo género, se ha reportado efectos anti-leishmánicos (16), así como efectos antimicrobianos y antifúngicos (17).

Partiendo de los estudios farmacológicos realizados en miembros del género *Virola*, en el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos acuosos, acetónicos y etanólicos de esta especie vegetal contra cepas de SARM, de origen nosocomial, por el método de difusión en agar con discos.

Materiales y métodos

Material vegetal

V. sebifera fue recolectada en la localidad, Diques de la carretera rural Santa Bárbara de Barinas a orillas del río Zulia (Barinas, estado Barinas, Venezuela). El material fue identificado en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes (Mérida, Venezuela) y un voucher fue depositado bajo el N° DB019.

Preparación de los extractos

Veinticinco gramos (25 g) del material vegetal seco y molido (hojas), fue extraído por separado con 300 mL de etanol 95%, acetona y agua destilada, mediante maceración a temperatura ambiente durante 24 horas. Luego estos extractos se agitaron a 200 rpm durante 30 minutos sobre un baño de María a una temperatura de 60°C; se filtraron al vacío y concentraron a presión reducida a una temperatura no mayor de 40°C. Para la preparación de los distintos patrones el residuo completo se llevó a un volumen de 10 mL con el solvente empleado, rotulado extracto concentrado, a partir de este se preparó una dilución 1:10 (7).

Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en agar con discos, descrita por Rotman y col. (2003), modificada en el Laboratorio. Se ensayaron los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y 28 cepas de SARM provenientes de pacientes con infecciones nosocomiales de la Unidad de Alto Riesgo Neonatal del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (Mérida).

da, Venezuela), suministradas por el Laboratorio de Investigación de Bacteriología Clínica Anaeróbica "Dr. Roberto Gabaldón Parra", Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

El ensayo se realizó con un cultivo de 18 horas de cada microorganismo crecido en 2,5 mL de caldo Mueller-Hinton a 37°C. El inóculo bacteriano se ajustó con solución salina fisiológica al Patrón de Turbidez de Mac Farland N° 0,5 (10^{6-8} ufc/mL). Cada inóculo se sembró en forma confluyente con un hisopo sobre la superficie de una placa conteniendo agar Mueller-Hinton. Luego se colocó sobre la superficie un disco de papel de filtro (6 mm diámetro) previamente impregnado con 10 μ L del extracto y el control negativo respectivo (agua destilada, acetona y etanol 95%). Adicionalmente se colocó un disco estándar del antibiótico de referencia como control positivo (Ampicilina-Sulbactam 10/10 μ g, Oxoid) (9). El medio de cultivo inoculado se preincubó durante 18 horas a 4°C y luego se incubó a 37°C durante 24 horas (18). La lectura de los halos de inhibición se realizó a las 24 y 48 horas. Al cabo de este tiempo, se midió la zona de inhibición alrededor del disco, expresada en mm.

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) se determinó solo en las cepas SARM con las cuales se observaron zonas de inhibición positiva según el extracto con el cual se evidenció mayor actividad antibacteriana. Para determinar la CIM se preparó una dilución del extracto, en un rango de concentración de 50-650 mg/mL y se impregnaron los discos de papel de filtro con 10 μ L de cada dilución. La CIM fue definida como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano visible (19). Los ensayos se realizaron por duplicado.

Resultados y Discusión

El rendimiento obtenido de los extractos fue el siguiente: agua destilada 25,52 % (6,38 g), acetona 25,64% (6,41 g) y etanol 15,12 % (3,03 g); con una concentración fi-

nal de los extractos de 638 mg/mL, 641 mg/mL y 303 mg/mL, respectivamente.

La Tabla 1 representa los valores relativos de la actividad antibacteriana de los diferentes extractos concentrados de *V. sebifera* Aubl., frente a las 28 cepas SARM de origen nosocomial y la cepa de referencia. Tres de las cepas de SARM (MI 29, MD 14₁ y MD 15,2) mostraron resistencia a los extractos ensayados. El extracto acuoso de *Virola sebifera* Aubl., inhibió el mayor número de cepas de SARM, seguido de los extractos etanólicos y acetónicos concentrados, 89,29%, 67,86% y 39,29%, respectivamente. El valor de la CIM del extracto acuoso concentrado osciló entre 100 y 600 mg/mL.

Varios estudios han comprobado científicamente la eficacia terapéutica de diversas plantas partiendo del uso tradicional. En tal sentido, algunas especies pertenecientes al género *Virola* presentan dentro de su composición química compuestos como lignanos y neolignanos que han mostrado actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos (16, 17).

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran actividad antimicrobiana de *V. sebifera* Aubl., característica observada en otras especies pertenecientes al género, como son *V. surinamensis*, *V. oleifera* y *V. pavonis* (13).

Los extractos diluidos (1:10) de *V. sebifera* Aubl., no presentaron actividad antibacteriana frente a los aislados de SARM, resultado que se correlaciona con los reportados por Sanabria y col. (8), indicando que estudio realizado con diluciones seriadas de los extractos disminuyen la concentración de los principios activos y por consiguiente su actividad.

El extracto acuoso mostró mayor actividad antibacteriana, con un 89,29% de susceptibilidad de las cepas SARM evaluadas; por lo cual se infiere que los principios activos presentes en *V. sebifera* son compuestos de naturaleza polar.

Tabla 1
Actividad antibacteriana de los extractos concentrados de *Viola sebifera* Aubl frente a SARM

| Microorganismos Cepas SARM ^b | Halos de inhibición (mm) ^a discos 6 mm | | | CIM ^c mg/mL |
|---|---|--------------------|-----------------|------------------------|
| | Extracto Acetónico | Extracto etanólico | Extracto Acuoso | Extracto acuoso |
| 599,1 | R | 08 | 12 | 150 |
| FND 22,3 | 08 | 09 | 09 | 200 |
| MI 29 | R | R | R | - |
| FND 12 | R | 08 | 12 | 200 |
| 071 | R | 10 | 14 | 150 |
| 428 | 08 | 08 | 08 | 150 |
| 88 | 08 | 09 | 11 | 150 |
| MI 51 | R | R | 08 | 600 |
| 13 | R | R | 12 | 200 |
| 476 | R | 08 | 09 | 150 |
| MD 11 | R | 09 | 08 | 200 |
| 14 | R | 09 | 13 | 150 |
| FNI 13,1 | 09 | 09 | 08 | 200 |
| 114 | 08 | 09 | 13 | 600 |
| 49,5 | R | 08 | 12 | 600 |
| MD 141 | R | R | R | - |
| 526 B | R | 08 | 15 | 600 |
| FNI 201 | R | R | 13 | 600 |
| MI 151 | R | R | 12 | 600 |
| 548,1 | 09 | 08 | 09 | 600 |
| MD 52 | 09 | 08 | 09 | 200 |
| FND 17,1 | 08 | 09 | 08 | 200 |
| FNI 18,9 | 08 | R | 09 | 150 |
| MD 15.2 | R | R | R | - |
| MD 42 | R | 10 | 10 | 200 |
| MD 223 | R | R | 08 | 200 |
| FND 13.2 | 08 | 10 | 11 | 100 |
| MI 41 | 08 | 08 | 10 | 100 |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | 12 | 12 | 13 | 200 |

^a: media de dos ensayos consecutivos. ^b: Cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM)

CIM: Concentración inhibitoria mínima. ^c: Rango 50-650 mg/mL. R: Resistente

Control positivo: Ampicilina-Sulbactman 10/10 µg (33 mm).

Control negativo: discos con solventes (sin zonas de inhibición).

Conclusiones

Con base a estos resultados se concluye que el extracto acuoso de *Virola sebifera* presentó mayor actividad antibacteriana contra cepas de SARM, representando una alternativa terapéutica en infecciones causadas por SARM. De acuerdo a la literatura consultada, este es el primer reporte sobre actividad antibacteriana de esta especie vegetal y su evaluación sobre cepas SARM de origen nosocomial.

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT, Mérida, Venezuela, código N° FA-340-05-03-F) y al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT, código N° F-2000001633), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Caracas, Venezuela), por financiar esta investigación. Al Ing. Juan Carmona (Herbario MERF, Facultad de Farmacia y Bioanálisis) por la identificación del material botánico.

Referencias Bibliográficas

- VELAZCO E., NIEVES B., ARAQUE M., CALDERAS Z. *Enferm Infec Microbiol Clin* 20(7): 321-325, 2002.
- PICAZO J., BETRIU C., RODRÍGUEZ I., AZAHARES E., SÁNCHEZ B., GRUPO VIRA. *Enferm Infec Microbiol Clin* 20(10): 503-510, 2002.
- PICAZO J., BETRIU C., RODRÍGUEZ I., CULEBRAS E., GÓMEZ M., GRUPO VIRA. *Enferm Infec Microbiol Clin* 22(9): 517-525, 2004.
- KIM H., JANG H., NAM H., LEE Y., KI B., PARK W., LEE K., CHOI Y., PARK S., OH M., KIM E., CHOE K. *Antimicrob Agents Chemother* 48(4): 1124-1127, 2004.
- BOUCHILLON S., JOHNSON B., HOBAN D., JOHNSON J., DOWZICKY M., WU D., VISALLI M., BRADFORD P. *Int J Antimicrob Agents* 24: 119-124, 2004.
- HSUEH P., TENG L., CHEN W., PAN H., CHEN M., CHANG S., LUH K., LIN F. *Antimicrob Agents Chemother* 48(4): 1361-1364, 2004.
- GRACIA C., CORREA E., ROJAS N. *Rev Col Cien Quím Farm* 23: 42-48, 1995.
- SANABRIA A., MENDOZA A., MORENO A. *Rev Col Cien Quím Farm* 27: 47-51, 1998.
- RANGEL D., GARCÍA I., VELASCO J., BUITRAGO, D., VELAZCO E. *Rev Facultad Farmacia* 42: 43-46, 2001.
- RANGEL D., GARCIA I., VELASCO J., BUITRAGO D., VELAZCO E. *Fitoterapia* 73: 719-720, 2002.
- ROTMAN A., AHUMADA O., DEMO M., OLIVA M., TURINA A., LOPEZ M., ZYGADLO J. *Flavour Fragr J* 18: 211-214, 2003.
- MANENZHE N., POTGIEBER N., VAN REE T. *Phytochemistry* 65(16): 2333-2336, 2004.
- FERNANDES A., PRADO A., BARATA L., PAULO M., AZEVEDO N., FERRI P. *Phytochem Anal* 8: 18-21, 1997.
- EMEA. The European Agency for Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit. 1999. (En red). Disponible en: www.eudra.org/emea.html.
- DANELUTTE A., CAVALHEIRO A., KATO M. *Phytochem Anal* 11: 383-386, 2000.
- BARATA L., SANTO L., FERRI P., PHILLIPSON J., PAINE A., CROFT S. *Phytochemistry* 55: 589-595, 2000.
- SANTORELLI P., MARX M., KATO M. *Phytochemistry* 47 (6): 1003-1006, 1998.
- DE LOS RIOS C., HIDALDO D., QUINTERO M., MARQUES G. CRESENTE O. *Rev Facultad Farmacia* 36: 2-5, 1999.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; MIC testing*. Document M 100-S12. Wayne, PA, 2002.