

Sensibilidad *in vitro* de cepas de *Staphylococcus aureus* ante algunos antimicrobianos y tinturas de *Eucalyptus* sp

Bertha Velázquez Pérez, Guillermo Barreto Argilagos

Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Cuba

bertha.velazquez@reduc.edu.cu

RESUMEN

Se determinó la sensibilidad *in vitro* en cepas de *Staphylococcus aureus* ante algunos antimicrobianos y tinturas (20 y 80 %) obtenidas de corteza de *Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus saligna* Sm. como posibles desinfectantes mamarios. En la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizaron cepas de *Staphylococcus aureus* (referente y salvaje). La cepa salvaje era resistente a la penicilina, a la gentamicina e intermedia a la estreptomycinina. Las tinturas de *Eucalyptus citriodora* Hook (20 y 80 %) resultaron más efectivas ($P < 0,05$) que la tinturas de *Eucalyptus saligna* Sm. y ambas mostraron acción antimicrobiana superior a gentamicina, penicilina y estreptomycinina sobre *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: desinfectante, *Eucalyptus citriodora* Hook, *Eucalyptus saligna* Sm., mastitis

INTRODUCCIÓN

En cualquier sistema de producción animal la salud es un elemento decisivo; garantiza productos biológicamente aptos que, mediante una adecuada nutrición, responderán con los máximos índices productivos según su potencial genético. Unos de los problemas en las producciones bovinas lo constituyen las mastitis subclínicas, que no se expresan mediante síntomas, pero infringen cuantiosas pérdidas, por lo que se denominan síndromes de producción óptima disminuida (Hernández *et al.*, 2007).

La era antimicrobiana del pasado siglo abrió nuevas perspectivas para el control de los agentes microbianos no contemplados en los planes de vacunación. Sin embargo, lo que en un momento pareció una gran solución se ha convertido en un serio problema. Así, los antimicrobianos utilizados para el control de la mastitis bovina constituyen residuales con impacto en la calidad de la leche, sus derivados, e influyen en la salud pública, además de potenciar la emergencia de cepas antibiorresistentes (Armenteros, 2000).

En las últimas tres décadas la población ha adquirido microorganismos poli-resistentes a fármacos. Este fenómeno constituye un problema de salud pública extremadamente grave (Prescot *et al.*, 2004), casi tanto como las propias enfermedades que justifican su demanda (Barreto y Rodríguez, 2006). Los últimos diez años alarman por los fallos reiterados en los tratamientos a humanos y animales (Harbarth y Samore, 2005; WHO, 2007).

La generación de nuevos antimicrobianos sólo ha demostrado la rápida capacidad bacteriana de adaptarse, por usar un término conservador, ampliándose el rango de resistencia en patógenos humanos y animales (Jansen *et al.*, 2006; Falagas y Bliziotis, 2007) un fenómeno que ya excede los marcos hospitalarios y se constata en comunidades y en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) a niveles alarmantes (EARSS, 2005; EASAC, 2007; EFSA, 2008; SCENIHR, 2009). Se impone la adopción de estrategias alternativas que posibiliten la prevención de enfermedades, o su terapia, sin secuelas agresivas al consumidor y el entorno; los prebióticos, probióticos y las plantas constituyen opciones promisorias (Barreto y Rodríguez, 2009).

Los *Eucalyptus* constituyen un género bien distribuido en Cuba. Se ha empleado con diversos fines en medicina veterinaria y humana (Velázquez *et al.*, 1991; Barreto *et al.*, 2005; Barreto y Rodríguez, 2006). Posee propiedades antibacterianas *in vitro* frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus agalactiae* (Barreto *et al.*, 2005, 2006). Las especies mencionadas figuran entre los agentes con mayores potencialidades para provocar mastitis, fundamentalmente las dos últimas (Planas, 1979).

Este trabajo tiene como objetivo determinar la sensibilidad *in vitro* en cepas de *Staphylococcus aureus* ante algunos antimicrobianos y tinturas de *Eucalyptus* sp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las tinturas de corteza de E. citriodora Hook y E. saligna Sm

Para la elaboración de las tinturas (20-83 %) se empleó la técnica de tintura por percolación (NRSP-311-1992). El material vegetal se maceró 24 horas previas a la percolación, adicionándose solvente limpio hasta obtener los volúmenes deseados.

Cepas y medio de cultivo

En la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizaron dos cepas de *Staphylococcus aureus*: ATCC 29740 (referente) y una cepa salvaje aislada de una vaca con mastitis clínica. En todos los ensayos se empleó agar Mueller Hinton (OXOID, Gran Bretaña) a razón de 15 mL a placas de 100 mm de diámetro.

Ensayos de la sensibilidad in vitro

La actividad antimicrobiana de las tinturas se estableció mediante el método de difusión sugerido por Kirby y Bauer (Bio-Merieux, 1984). Se utilizaron discos de papel de filtro Watman 3 impregnados con cada tintura. Como controles se emplearon discos embebidos en tinturas al 20 y 83 %, respectivamente. A las dos cepas utilizadas se les determinó su sensibilidad frente a los antimicrobianos: cloranfenicol, ampicilina, penicilina, eritromicina, estreptomycin, gentamicina, kanamicina, tetraciclina y sulfametoxazol. A los resultados del estudio *in vitro*, se le aplicó un análisis de varianza simple.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayos de la sensibilidad in vitro

Los antibiogramas realizados demostraron que la cepa de *Staphylococcus aureus* salvaje resultó resistente a dos de los antimicrobianos: penicilina G y gentamicina e intermedia a estreptomycin. Por su parte, la cepa ATCC 29740 fue sensible a todos los quimioterapéuticos evaluados.

Este comportamiento, un resultado esperado, obedece a la mayor exposición de las cepas de *Staphylococcus aureus* salvajes a estos antimicrobianos, así como al contacto con bacterias que han experimentado estas interacciones y, mediante conjugación o transducción, les han conferido resistencia (Dewdney, 1999). Las cepas de referencia, mantenidas por años a nivel de laboratorio, no están expuestas a estos eventos, de ahí que ATCC 29740 cumpla el patrón de sensibilidad que le caracteriza (Bio-Merieux, 1984; Dewdney, 1999).

Desde el descubrimiento de los primeros antimicrobianos, los microorganismos, muy en especial las bacterias, han sido capaces de evadir su acción (Mediavilla *et al.*, 1997). La mayoría de las evidencias se corresponden con la experiencia adquirida en la quimioterapia humana. Así, en 1946, una gran parte de los aislamientos de *Staphylococcus aureus* eran sensibles a la penicilina; hoy, la casi totalidad de las cepas hospitalarias son resistentes a bencilpenicilina, metilicina, gentamicina, y sólo se pueden tratar con vancomicina (Prescot *et al.*, 2004).

Un análisis simplista conllevaría a pensar que, tanto la penicilina G, como la gentamicina y la estreptomycin, cuentan con una amplia y prolongada utilización en la terapia veterinaria y humana, factores que propician el desarrollo de antibiorresistencia (Dewdney, 1999; Barreto *et al.*, 2000 a, b).

El uso indiscriminado de antibióticos, desinfectantes y antimicrobianos en general, ha hecho que las bacterias, dotadas de múltiples mecanismos (bioquímicos, genéticos-moleculares y celulares), desarrollen estrategias inherentes y adquiridas, que les permiten evadir con efectividad su acción (French, 2005; Depardieu *et al.*, 2007). De ahí, y es lo más lamentable, la antibiorresistencia no sólo se genera y expande como respuesta al consumo de antibióticos, también responde, de forma cruzada, a contaminantes ambientales que cada vez se acumulan en mayor grado sobre el planeta (Suárez y Reyes, 2002; Depardieu *et al.*, 2007). Existe una tercera causa, a la que se presta poca atención: la forma en la que las bacterias se organizan al colonizar superficies, algo en lo que la cepa salvaje también supera a la referente, como se discutirá a continuación.

Karadjov *et al.* (1979) de manera premonitoria, comunican que los contaminantes ambientales (sobre todo los metales pesados) inducen la producción de cápsula en bacterias, incluso en aquellas que usualmente no la expresaban. Dado el rechazo que originó esa hipótesis, se realizaron diversas experiencias que confirmaron su validez, así como la producción de cápsula frente a la presencia de otros contaminantes como antibióticos y herbicidas (Barreto, 1986 y Barreto y Rodríguez, 2009). Una cápsula hexopolisacárida puede asumirse como la contribución individual de cada bacteria a la gran matriz que engloba las poblaciones (microcolonias) engendradas sobre super-

ficies diversas como, perfectamente, puede ser un medio de cultivo artificial. Esa matriz es lo que en los últimos años se ha dado en denominar *biofilms*, y confiere a las poblaciones bacterianas que contiene, fuerte antibiorresistencia (Donlan, 2002).

La capacidad de formar *biofilm* no parece restringirse a ningún grupo bacteriano específico y, en la actualidad, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas, la inmensa mayoría de las bacterias, independiente de la especie, puede existir dentro de *biofilms* adheridos a superficies en una interfase sólido/líquida, incluyendo patógenos como *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Klebsiella* y *S. aureus* (Anderl *et al.*, 2000; Chole y Faddish, 2003; Post *et al.*, 2004; Thomas y Nakaishi, 2006). La adhesión a una superficie húmeda (inanimada o viviente), es de carácter irreversible; el *biofilm* no logra ser removido mediante lavado suave (Fergie *et al.*, 2004; Ramadan *et al.*, 2005).

En el caso que se discute, si bien no era demostrable la formación de *biofilms* por las cepas estudiadas, sí vale aclarar que la cepa salvaje producía abundante cápsula, aspecto evidente en sus colonias muy mucoides, a diferencia de la referente, totalmente acapsular.

El mayor efecto antibacteriano de las tinturas, tanto al 20 % (Tabla 1) como al 83% (Tabla 2) correspondió a los elaborados con *Eucalyptus citriodora* Hook.; sus efectos fueron significativamente superiores ($P < 0,05$) a los de *Eucalyptus saligna* Sm. En ambos casos, la acción antibacteriana no estuvo asociada al alcohol, como evidencia el comportamiento de los blancos, sino a los metabolitos (o metabolito) extraídos por la mezcla hidroalcohólica. En estudios previos a ambas especies de *Eucalyptus*, los tamizajes fitoquímicos pusieron de manifiesto la presencia de compuestos vegetales diversos con demostrada actividad antimicrobiana como es el caso de: taninos, flavonoides y quinonas (Miranda y Pérez, 1989; Soto *et al.*, 2007).

Si los efectos obtenidos dependieran del alcohol, resulta probado que la mayor acción bactericida se alcanza en mezclas hidroalcohólica al 70 %, concentración a la que se consigue el máximo efecto coagulante de las proteínas bacterianas (Planas, 1979). Sin embargo, los resultados obtenidos van más allá de lo exclusivo al alcohol. Al parecer, la polaridad de las mezclas hidroalco-

hólicas, en el rango evaluado, posibilitó la extracción de metabolitos (o metabolito) asociados con los resultados alcanzados, siendo más efectivos los obtenidos a partir de la corteza de *Eucalyptus citriodora* Hook, sin importar la mayor o menor concentración de alcohol en estas mezclas, ni la cepa utilizada (Tablas 1 y 2).

En estudios desarrollados a partir de infusiones y decocciones de estas dos especies de *Eucalyptus*, y tinturas de otras especies del género, se manifestó la influencia de la especie y el método de extracción sobre la viabilidad bacteriana (Barreto y Campal, 2001; Barreto *et al.*, 2005).

La sensibilidad de ambas cepas a las tinturas resultó similar en todos los ensayos, pese a su distinto perfil antibiorresistente. Este resultado denota que en los extractos, independientemente de la especie de *Eucalyptus*, existen metabolitos (o algún tipo particular de metabolito) extraíbles con las polaridades empleadas, que afectan la viabilidad de grampositivos como *Staphylococcus*, incluso en el caso de cepas polirresistentes, como la cepa autóctona utilizada en el experimento. Este resultado es de gran interés, pues ofrece una variante a partir de productos naturales con la que enfrentar el fenómeno de la antibiorresistencia, con justicia catalogado como “epidemia silente” del siglo XX (Barreto y Rodríguez, 2006).

Al respecto de los resultados obtenidos, cabría evaluar, en futuras experiencias, la naturaleza aniónica o catiónica de las tinturas. Esta valoración, más allá de lo que puedan ofertar los estudios *in vitro*, constituye un dato esencial al abordar enfermedades infecciosas bacterianas, asumidas desde la óptica de los *biofilms*. Se ha documentado profusamente, el retardo que provocan las matrices polisacáridas, dado su carácter aniónico, aspecto que les posibilita comportarse como resinas de intercambio, que brindan protección frente a antimicrobianos diversos (Iáñez, 1998).

CONCLUSIONES

Se obtuvieron tinturas de *Eucalyptus citriodora* Hook y *Eucalyptus saligna* Sm. con efecto antimicrobianos *in vitro*, frente a *Staphylococcus aureus*, superiores a la Penicilina, Gentamicina y Estreptomycinina; las de *Eucalyptus citriodora* Hook. resultaron más efectivos ($P < 0,05$).

REFERENCIAS

- ANDERL, J. N.; FRANKLIN, M. J. and STEWART, P. S. (2000). Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella Pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 1818-1824.
- ARMENTEROS, M. (2000). Con talento de mujer. *Revista Radio*, 19-24, nov.-dic.
- BARRETO, G. (1986). *Estudio comparativo del agente causal de la colibacteriosis porcina en cerdos en Bulgaria y Cuba con vistas a su terapia y profilaxis*. Trabajo de doctorado en Ciencias Veterinarias. Instituto Superior de Zootecnia y Medicina Veterinaria de Stara Zagora, Bulgaria.
- BARRETO, G.; GANDARILLA, B.; LORET DE MOLA, M. E. y RODRÍGUEZ, B. (2000a). *Microbiología Farmacéutica* (Tomo I). Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Camagüey, Cuba.
- BARRETO, G.; GANDARILLA, B.; LORET DE MOLA, M. E. y RODRÍGUEZ, B. (2000b). *Microbiología Farmacéutica* (Tomo II). Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Camagüey.
- BARRETO, G. y CAMPAL, A. (2001). Efectos de extractos de *Eucalyptus saligna* Hook y *Eucalyptus citriodora* Sm sobre la viabilidad y adhesión fimbrial (K 88 y CFA/1) de ECET. *Rev. Prod. Animal*, 13 (2), 71-82.
- BARRETO, G.; CAMPAL, A. y ABREU, O. (2005). *Opciones para el bloqueo de la adhesión fimbrial de Escherichia coli: empleo de extractos de plantas*. Extraído en febrero 2007 desde <http://www.monografias.com/trabajos30/bloqueo-escherichia-coli/bloqueo-escherichia-coli.shtml>.
- BARRETO, G.; CAMPAL, A. y ABREU, O. (2006). *Eucalyptus saligna* y *Eucalyptus citriodora*. *Evaluación de extractos diversos de ambos en la viabilidad y expresión fimbrial de Escherichia coli enterotoxigénica*. Extraído en febrero de 2007 desde <http://www.monografias.com/trabajos39/eucalyptus-extractos/eucalyptus-extractos.shtml>.
- BARRETO, G. y RODRÍGUEZ, H. (2006). *Impacto del ecosistema en la virulencia bacteriana*. Extraído en febrero 2007 desde <http://www.monografias.com/trabajos37/virulencia-bacteriana/virulencia-bacteriana2.shtml>.
- BARRETO, G. y RODRÍGUEZ, H. (2009). *Biofilms bacterianos vs. contaminación ambiental*. Memorias de EcoCamagüey, 3 de junio, Camagüey.
- BIO-MERIEUX. (1984). *Bacteriología. Productos y reactivos para laboratorio* (pp. 63-69). Lyon, Francia: Universidad de Lyon.
- CHOLE, R. A. y FADDIS, B. T. (2003). Anatomical Evidence of Microbial *Biofilms* in Tonsillar Tissues: A Possible Mechanism to Explain Chronicity. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 129, 634-636.
- DEPARDIEU, F.; PODGLAJEN, I.; LECLERCQ, R.; COLLATZ, E. y COURVALIN, P. (2007). Modes and Modulations of Antibiotic Resistance Gene Expression. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20, 79-114.
- DEWDNEY, J. M. (1999). The Effects of Antibacterial Antibiotics on Immune Reactions and Host Resistance to Infection (pp. 407-427). En Lessof M, (ed.) *Immunological and Clinical Aspects of Allergy*, MTT Press.
- DONLAN, R. M. (2002). *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*. *Emerg. Infect. Dis.*, 8 (9), 881-90.
- EARSS (2005). *Annual Report of European Antimicrobial Resistance Surveillance System*. Extraído en junio de 2009 desde <http://www.rivm.nl/earss/>.
- EASAC (2007). *Tackling Antibacterial Resistance in Europe*. European Academies Science Advisory Council. Extraído en junio de 2009 desde <http://www.easac.eu/document.asp?id=68&pageno=1&detail=1&parent=31>.
- EFSA. (2008). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a Request from the European Food Safety Authority on Foodborne Antimicrobial Resistance as a Biological Hazard. *The EFSA Journal*, 765, 1-87.
- FALAGAS, M. E. y BLIZIOTIS, I. A. (2007). Pandrug-Resistant Gram-Negative Bacteria: the Dawn of the Post-Antibiotic Era? *Int. J. Antimicrob. Agents*, 29, 630-636.
- FERGIE, N.; BAYSTON, R.; PEARSON, J. y BIRCHALL, J. (2004). Is Otitis Media with Effusion a Biofilm Infection? *Clin. Otolaryngol.*, 29, 38-46.
- FRENCH, G. L. (2005). Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Adv. Drug. Deliv. Rev.*, 57, 1514-1527.
- HARBARTH, S. y SAMORE, M. H. (2005). Antimicrobial Resistance Determinants and Future Control. *Emerg. Infect. Dis.*, 11, 794-801.
- HERNÁNDEZ, R.; ARMENTEROS, M.; ABELEDO, M. A.; AGÜERO, F.; ÁLVAREZ, A.; ÁLVAREZ, J. L.; FELIPE, L.; FUNES, F.; GARCÍA, R.; MARTÍNEZ, R.; MEJÍAS, R.; PONCE, P.; RODRÍGUEZ, J.; SIMÓN, L. y UFFO, O. (2007). Manual de lechería. Una mirada a la cadena productiva. *ACPA*, 84-104.
- IAÑEZ, E. (1998). *Curso de Microbiología General. Estructuras superficiales de la célula bacteriana*. Extraído en febrero de 2008 desde http://www.ugr.es/eianez/Microbiologia/04_capsula.htm.
- JANSEN, W. T.; VAN DER BRUGGEN, J. T.; VERHOEF, J. y FLUIT, A. C. (2006). Bacterial Resistance: a Sensitive Issue Complexity of the Challenge and Containment Strategy in Europe. *Drug Resist. Updat.*, 9, 123-33.
- KARADJOV, Y.; BRATANOV, B.; KOLALOVSKI, B.; MIJAILOV, C.; MONOD, G.; NEDELICHEVA, K.; DELEV, P. (1979). *Aspectos higiénico-veterinarios*

- de la contaminación del medio ambiente*. Sofía: Zemisdad.
- MEDIAVILLA, A.; FLOREZ, J. y GARCÍA-LOBO, J. M. (1997). Farmacología de las enfermedades infecciosas: principios generales, selección y asociación de antibióticos (pp. 1061-1083). En J. Florez, J. A. Armijo Mediavilla (Dir.). *Farmacología Humana*. Barcelona, España: Ed. Masson S. A.
- MIRANDA, M. y PÉREZ, J. R. (1989). Contribución al estudio farmacognóstico de *Eucalyptus citriodora* Hook. que crece en Cuba. Trabajo de doctorado en Ciencias Químicas, La Habana, Cuba.
- MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA. (1992). *Extractos fluidos y tintura. Tinturas por percolación*. Norma ramal de salud pública (NRSP-311). La Habana, Cuba: Ministerio de Salud Pública.
- PLANAS, A. (1979). *Microbiología especial veterinaria* (Tomo I). La Habana, Cuba: CENSA.
- POST, J. C.; STOODLEY, P.; HALL-STOODLEY, L. y EHRLICH, G. D. (2004). The Role of Biofilms in Otolaryngologic Infections. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 12, 185-190.
- PRESCOT, L. M.; HARLEY, J. P. y KLEIN, D. A. (2004). *Microbiología* (5ª ed.). Madrid: McGraw Hill Interamericana.
- RAMADAN, H. H.; SANCLEMENT, J. A.; THOMAS, J. G. (2005). Chronic Rhinosinusitis and *Biofilms*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 132, 414-7.
- SCENIHR (2009). *Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides*. The SCENIHR Adopted this Opinion at the 28th Plenary on 19 January 2009 after Public Consultation, Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, Scientific Committee. Extraído el 10 junio de 2009 desde http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf.
- SOTO, S.; YORDY, M.; VELÁZQUEZ, B. y BARRETO, G. (2007). Tratamientos alternativos para la mastitis con extractos de *Eucalyptus saligna* Sm y *Eucalyptus citriodora* Hook. *Rev. Prod. Animal*, 19 (2), 147-153.
- SUÁREZ, P. y REYES, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*, 7 (4), 160-164.
- THOMAS, J. G. y NAKAISHI, L. A. (2006). Managing the Complexity of a Dynamic Biofilm. *J. Am. Dent. Assoc.*, 137 (suppl), 10S-15S.
- VELÁZQUEZ, B.; BARRETO, G.; IZQUIERDO, N. y PALACIOS, L. (1991). Diagnóstico y tratamiento de la colibacilosis porcina. *Rev. Prod. Anim.*, 6 (2), 139-144.
- WHO (2007). *A Safer Future: Global Public Health Security in the 21st century*. WHO, the world health report. Extraído el 25 de junio de 2009 desde <http://www.who.int/whr/2007/en/index.htm>

Tabla 1. Comparación de las tinturas y el etanol al 20 % frente a las cepas

	Cepa salvaje		ATCC 29740	
	X	D.E	X	D.E.
Extractos	1,64	0,207	1,62	0,342
<i>E. citriodora</i>	1,06	0,089	0,96	0,089
<i>E. saligna</i>	0	0	0	0
Etanol al 20 %				
Probabilidad	0,0102		0,0148	

X: media aritmética; D.E.: desviación estándar; probabilidad $P < 0,05$, difieren significativamente

Tabla 2. Comparación de las tinturas y el etanol al 83 % frente a las cepas

Extractos	Cepa salvaje		ATCC 29740	
	X	D.E	X	D.E
<i>E. citriodora</i>	1,58	0,13	1,56	0,23
<i>E. saligna</i>	1,1	0,141	1,12	0,209
Etanol al 83 %	0,08	0,086	0,26	0,083
Probabilidad	0,021		0,038	

X: media aritmética, Probabilidad $P < 0,05$ difieren significativamente

D.E: desviación estándar