

## **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE EXTRACTOS OBTENIDOS POR HIDRODESTILACIÓN DE ACICULAS DE PINOS, PROBADOS EN *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*.**

Maritza Nataly Amaya Gutiérrez<sup>1</sup>, Sandra Luz Toledo González<sup>2</sup>, Christian Alan Ruiz García<sup>2</sup>, Maria Magdalena Flores Machuca<sup>2</sup>, Josefina Casas Solís<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular y Molecular, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jal., 45101, México, <sup>2</sup>Departamento de Producción Forestal, Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jal., 45101, México  
Correo-e: [natalie\\_bsbcarter@hotmail.com](mailto:natalie_bsbcarter@hotmail.com)

### **Introducción**

Debido al uso indiscriminado de antibióticos en la actualidad, se ha generado una resistencia de los microorganismos patógenos a dichos agentes bactericidas. Esto ha despertado el interés y la necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamientos de la medicina natural, que sean más eficaces contra bacterias y hongos, que son los principales agentes que desencadenan infecciones en humanos. Las plantas medicinales de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1979), se define como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyo principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Oliveira M. et al. 2005). Su desarrollo depende de factores como el suelo, el agua, el clima, la altitud, latitud, humedad y temperatura.

Los extractos naturales provenientes de plantas medicinales, ejercen una acción antimicrobiana, por lo que en México se han hecho investigaciones probando la efectividad de los aceites de varias plantas que se encuentran en nuestro territorio, y han demostrado una actividad antimicrobiana. Hay especies de pino, tales como *Pinus douglasiana* y *Pinus pseudostrobus*, de la Sierra Occidental de Jalisco, así como otras especies de pinos de diferentes sitios sus extractos tienen actividad antimicrobiana, sin embargo no existen documentos que evidencien las dosis eficaces contra algunas cepas de microorganismos patógenos. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar la sensibilidad de bacterias *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. coli*, y la levadura *C. albicans* a diferentes concentraciones de extractos de *Pinus pseudostrobus*, *Pinus douglasiana* y *Pinus spp.*

### **Materiales y Métodos**

#### *Selección de especies de pinos*

Se obtuvieron extractos de muestras de follaje de 2 Pinos de la Sierra Occidental de Jalisco: *Pinus douglasiana* y *Pinus pseudostrobus*. El *Pinus douglasiana* el cual fue identificado por el Dr. Jorge Alberto Pérez de la Rosa y las muestras se encuentran en el herbario del instituto botánico del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias; el *Pinus pseudoestrobis* fue identificado por el personal del despacho de consultoría de Mascota Jalisco y las muestras se encuentran en el herbario de dicha empresa.

El extracto de *Pinus spp.*, fue proporcionada por una casa comercial etiquetado como aceite de pino de origen canadiense con uso como desinfectante.

#### *Obtención de extractos de pinos*

Se colecta el follaje en los sitios determinados y se traslada al laboratorio para la obtención del extracto. Los extractos se obtienen del follaje de *Pinus pseudostrobus*, *Pinus douglasiana* mediante el proceso de hidrodestilación.

El follaje se desfibra en un molino cuyas partículas deben tener un tamaño menor de 1 cm, el follaje desfibrado se coloca en un recipiente de cristal con una placa de cerámica perforada en cuyo fondo contiene agua destilada. Se tapa el recipiente y se enrosca un conducto llamado trompa de elefante, donde pasará el vapor a través de un refrigerante y después de 2 a 5 horas el extracto será recolectado en un contenedor para su posterior separación del agua y el extracto aceitoso.

#### *Determinación de la actividad antimicrobiana por el método de dilución en tubo*

Por cada extracto se preparan 4 series de 13 tubos vacíos para evaluar el efecto antimicrobiano de cada microorganismo y con cada uno de los extractos de los diferentes pinos. Las diluciones se realizan por duplicado

Rotular los tubos del 1 al 12, para evaluar las diferentes concentraciones y el tubo 13 será el grupo control, el cual no llevara ningún tipo de extracto.

A los tubos del 2 al 13 se agrega 500  $\mu$ L medio de cultivo Caldo Soya Trypticaseina (CST). Al primer tubo se le añade 500  $\mu$ L el extracto de pino concentrado lo que toca al 100%. El tubo 2 se le adiciona 500  $\mu$ L del extracto de pino y se homogeniza, y del tubo 2 se agregan 500  $\mu$ L al tubo 3, así sucesivamente se hacen diluciones seriadas hasta el tubo 12 donde se evalúa la concentración desde el 50% hasta 0.05% de cada extracto.

Enseguida a todos los tubos se le adiciona 500  $\mu$ L del microorganismo (previamente ajustado a la escala de MacFarland de  $1 \times 10^6$  UFC/mL) con un volumen final por tubo de 1 mL.

Todos los tubos se incuban a 37° C por 24 horas. Transcurrido el tiempo se observa la turbidez que presente y se lee en espectrofotómetro a 620 nm de absorbancia, para determinar el crecimiento desarrollado (UFC/mL).

Se evalúa el efecto inhibitor de cada extracto contra los diferentes microorganismos tomando al tubo 13 solo con microorganismos como el crecimiento al 100% y se hace la correlación de las lecturas obtenidas para determinar la sensibilidad de bacterias *S. aureus*, *S. enteritidis*, *E. coli*, y la levadura *C. albicans* a diferentes concentraciones de extractos de *Pinus pseudostrobus*, *Pinus douglasiana* y *Pinus spp.*

## **Resultados y discusión**

Se evaluó el efecto antimicrobiano de 3 extractos de *Pinus (douglasiana, pseudostrobus y spp)* a diluciones seriadas a partir del 100% directo del extracto hasta 0.05%, contra  $1 \times 10^6$  UFC/mL de 4 diferentes cepas de microorganismos *S. enteritidis*, *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*

El extracto de *Pinus spp.*, tiene un efecto antimicrobiano contra bacterias Gram negativas a una concentración entre 25 y 12.5 %. Al 25% presentó una inhibición de aproximadamente de 72% para *S. enteritidis* y de 84 % en *E. coli*, mientras que para bacterias Gram positivas, *S. aureus* mostró mayor crecimiento

con un rango de 27 al 25% y de 38 para 12.5%, como se representa en la Figura 1. A concentraciones mayores de 25% mostró crecimiento alrededor de 60 al 40 % lo que se observa que a concentraciones menores tiene un efecto antimicrobiano mayor. Sin embargo a concentraciones menores de 6.25% se mantiene el efecto de inhibición similar a 12.5%. Este extracto tiende a disminuir el crecimiento bacteriano de levaduras de *C. albicans* del 75% al 85%.

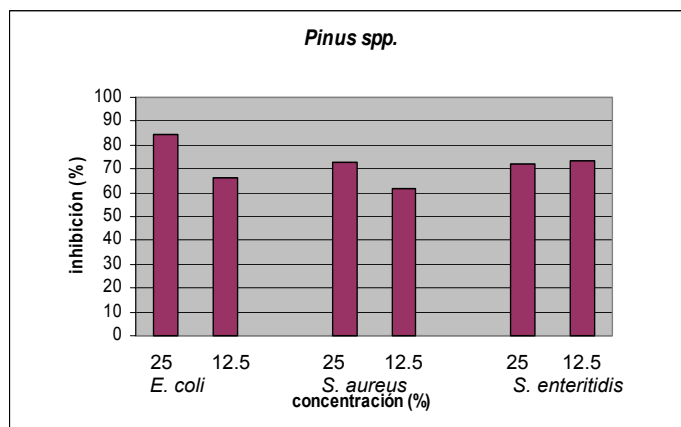


Figura 1. Efecto antimicrobiano del extracto de *Pinus spp.* a concentraciones de 25 y 12.5% probado con diferentes microorganismos.

El extracto de *Pinus douglasiana* tiene un efecto antimicrobiano menor en comparación con el *Pinus spp.*, a concentración entre 25 y 12.5 % no mostró inhibición en *S. enteritidis*, mientras para *E. coli* solamente fue de 58 y 56% respectivamente. Para *S. aureus* se observó una inhibición de 73% a una concentración de 25% y a 12.5% una inhibición de 53%(Figura 2). Al evaluar el extracto no fue efectivo a concentraciones mayores de 25%, sin embargo a concentraciones menores de 6.25 % su rango de inhibición fue de entre 20 y 40%. La levadura de *C. albicans* fue mas resistente al extracto de *P. douglasiana* mostrando una inhibición de 10%.

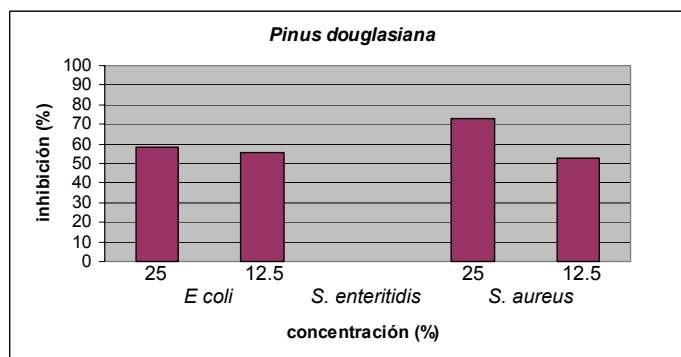


Figura 2. Efecto antimicrobiano del extracto de *Pinus douglasiana* a concentraciones de 25 y 12.5% probado con diferentes microorganismos.

El extracto de *Pinus pseudostrabus* a concentración entre 25 y 12.5 % mostró una inhibición del 62% y 38% en *S. enteritidis*, como se observa en la figura 3, mientras *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans* fueron resistentes al extracto. Y a concentraciones superiores de 25% los microorganismos no fue afectado el desarrollo microbiano en presencia del extracto y a concentraciones menores de 6.25% mostró una inhibición alrededor de 25%.

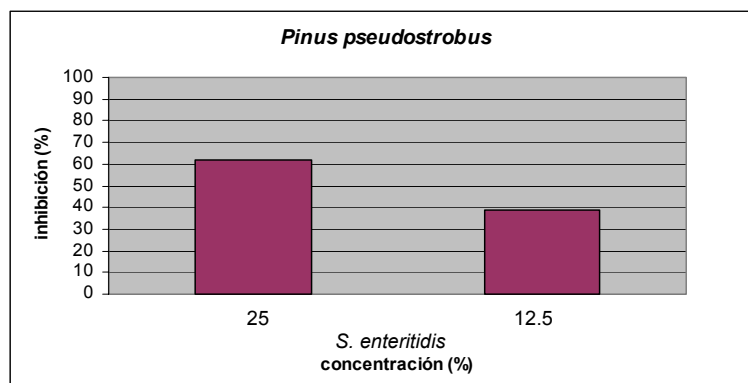


Figura 3. Efecto antimicrobiano del extracto de *Pinus pseudostrabus* a concentraciones de 25 y 12.5% probado con diferentes microorganismos.

No existen trabajos de referencia sobre actividad antimicrobiana de este tipo de extractos, que nos permitan comparar los resultados obtenidos. Sin embargo existen reportes sobre estos tipos de microorganismos probados en este trabajo y la diferencia puede radicar en la diferente composición que presentan ambos extractos, y en relación con el efecto inhibitor contra las cepas bacterianas, el cual puede deberse a la estructura y composición de su pared celular.

## Conclusiones

El extracto de *Pinus pseudostrabus* a la concentración del 25% tiene un efecto inhibitor del 50% en *S. enteritidis*, y mientras que en *S. aureus* y *E. coli* a bajas concentraciones tiene un mejor efecto antimicrobiano, y la levadura *C. albicans* es resistente a este extracto.

El extracto de *Pinus spp.*, fue efectivo con los cuatro microorganismos probados inhibiendo el 83% hasta el 97%, mostrando sensibilidad los microorganismos.

El efecto antimicrobiano del extracto de *Pinus douglasiana*, a una concentración del 25% muestra una inhibición en *S. aureus* de 73%, mientras que *E. coli* y *C. albicans* del 60% aproximadamente, y a concentración de 3.12% tiene mejor efecto antimicrobiano con *S. enteritidis* con un 34% de inhibición.

## Bibliografía

- Díaz R., Gamazo C., y López I.** 1999. *Manual práctico de Microbiología*. 2ª edición. Editorial Masson. España. Pag., 141-142.
- García B. L., García G. L., Rojo D. D., y Sánchez G. E.** 2001 *Plantas con propiedades antioxidantes*". Revista Cubana de Investigación Biomédica., Vol. 20, No. 3, Pag, 231-235.
- Macchioni, F., Cioni, P., Flamini, G., Morelli, I., Perrucci, S., Franceschi, A., Macchioni, G., y Ceccarini, L.** 2002, *Acaricidal Activity of Pine Essential Oils and their Main components against Tyrophagus putrescentiae, a Stores Food Mite*. Journal Agriculture Food Chemistry. Vol. 50, No. 16, Pag, 4586-4588.
- Manas, A. y Exconde, E.** 1984. *Production and chemistry of Essential Oils of the plant Family Pinaceae (1) Benguet Pine [Pinus kesiya Royle (Ex. Gordon)] and (2) Mindoro Pine [Pinus merkussi (Jungh de Vriese)]*. FPPRDI Journal. Vol. XIII, No. 3 y 4, pag, 52-61
- Olaya J. y Mendez J.** 2003, *Guía de plantas y productos medicinales*. Convenio Andrés Bello. Colombia. Pag. 5-12
- Oliveira M., Velázquez D., Bermúdez A.** 2005, *La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales*. Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América., Vol. 30, No. 8, Pag. 453-459.

